



HAL
open science

Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur transcriptionnel des gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*

Rana Herro

► **To cite this version:**

Rana Herro. Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur transcriptionnel des gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. Français. NNT: . tel-00132340

HAL Id: tel-00132340

<https://theses.hal.science/tel-00132340>

Submitted on 21 Feb 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Unité de Microbiologie et Génétique Moléculaire
INAPG, centre de Grignon BP01
78850 Thiverval Grignon

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI
ECOLE DOCTORALE GENES GENOMES CELLULES
SPECIALITE : MICROBIOLOGIE ET GENETIQUE MOLECULAIRE

Présentée par

Rana HERRO

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris XI

**Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur
transcriptionnel des gènes de virulence de
*Listeria monocytogenes***

Soutenue le 21 décembre 2006, devant le jury composé de :

Pr Gérard LEBLON
Pr Isabelle MARTIN VERSTRAETE
Pr André KLIER
Pr Pascale COSSART
Dr Philippe GLASER
Dr Josef DEUTSCHER
Dr Marie-Joëlle VIROLLE

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse
Membre invité

Remerciements

Ma profonde et sincère gratitude s'adresse à Monsieur Claude Gaillardin, chef du département MICA, pour son accueil et son encouragement et pour avoir financé ma thèse.

Je présente mes remerciements les plus distingués à Monsieur Jean-Marie Beckerich, directeur du laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, pour son soutien et son dynamisme.

Je remercie Madame Isabelle Martin-Verstraete, et Monsieur André Klier pour m'avoir honorée de rapporter cette thèse. J'adresse également mes sincères remerciements pour Madame Pascale Cossart, Madame Marie-Joëlle Virolle, Monsieur Philippe Glaser et Monsieur Gérard Leblon d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci Philippe et Carmen pour vos précieux conseils et vos encouragements. Merci Pascale pour votre disponibilité, votre encadrement, ce fut un grand plaisir de travailler avec vous.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Josef Deutscher pour son encadrement. Merci de m'avoir formée et suivie durant ces trois ans. Ce fut très enrichissant, tant scientifiquement que personnellement. Vous m'avez aidé à placer la base solide d'une carrière solide, pour que ma maison tienne haut et s'élève haut et encore plus haut. « Choukrane » !!

Je voudrais particulièrement remercier tous les membres du MGM pour l'agréable séjour que j'ai passé au laboratoire, merci pour votre partage et votre écoute. Merci Colin pour ton aide, tant scientifique qu'humaine. Merci Dominique pour tous tes conseils scientifiques et tes idées toujours efficaces, tes corrections pertinentes, pour les belles discussions, les chansons aussi... Merci Mathias pour avoir rendu mon séjour plus convivial et chaleureux. Alexa, merci beaucoup pour tout, je ne sais quoi dire, qu'est ce que je ferai sans toi...tu as préservé mon avenir Dieu sait ! (gros bisou Pucca). Merci Armel pour ton amitié, pour tous les moments partagés. Merci Greg pour les batailles d'avion, avoue que j'ai le meilleur planeur ! Marie-T, tu m'as fait rire dans les moments les plus durs, grand merci (à GG aussi). Pour les bons moments à San Diego, merci beaucoup Ivan et Dina, pour les bonnes ballades, merci Vicente. Je n'oublie pas les membres de mon équipe, Alain et Sandrine, grand merci pour votre disponibilité, votre aide, et pour tous les bons resto partagés... Nonote, ma Nonote, merci pour les gâteaux, les soirées, toute l'attention que tu m'as apportée. Mes étudiants que j'ai encadrés, Djamila (bon courage pour la suite), Isabella et Thomas, merci bcp ! Anne et Vincent, grand merci de m'avoir épaulée ces deux derniers mois !

Je tiens à remercier aussi tous les membres du laboratoire Interaction Bactéries-Cellules de l'Institut Pasteur, notamment Christel, Nadia, et Edith ! Promis Edith plus de rendez vous sur les quais des trains ... ! Grand merci pour tout.

Il me tient à coeur de remercier tous mes amis et mes compagnons de route qui en m'entourant d'une ambiance affectueuse hors du commun, m'ont permis de mener à bien ce travail. Je cite Marie José et Gisèle, mes deux compatriotes, MJsé je n'ai jamais pu t'écrire ou te témoigner mon amitié et ma gratitude, c'est peut-être l'occasion, mais les paroles me manquent...De toute façon, on ne remercie pas sa chitit frangine, elle le sait y a pas besoin.. Merci Athmane, Haythem, Chakib, Karine, Sam, Carole, Naziha, Ned, Soulaf, Ali, Kenza, Hatim, Halima, Vincent.. Je te remercie sincèrement Guillaume pour ton amour, ta patience et ton aide.

Enfin je remercie tendrement mon père Eliott, ma mère Thérésa, mon frère Farfour et ma sœur Larouti, Téo mon p'tit bout de chou, sans qui rien n'aurait été possible et à qui je dédie cette thèse.

SOMMAIRE

I. LISTERIA MONOCYTOGENES ET LA LISTERIOSE	8
I.1. Historique et Taxonomie	8
I.2. Habitat	9
I.3. Caractères bactériologiques	10
A- Morphologie	10
B- Culture	11
C- Marqueurs Biologiques Biochimiques et Identification des <i>Listeriae</i>	11
I.4. Listériose humaine	12
A. Diversité des souches	12
B. Personnes à risque	13
C. Listériose foeto-maternelle	13
D. Listériose chez L'adulte	13
I.5. Cycle Infectieux	14
A. Cycle infectieux <i>in vivo</i>	14
B. Cycle infectieux <i>in vitro</i>	15
1. Pénétration dans les cellules	17
<i>InlA</i>	18
<i>InlB</i>	21
2. Multiplication intracellulaire	26
Listériolysine O (LLO)	26
Phospholipases et métalloprotéase	28
3. Motilité intracellulaire	28
<i>ActA</i>	30
4. Passage de cellule en cellule	30
I.6. Régulation de la virulence de <i>L. monocytogenes</i>	31
I.7. Le régulon <i>prfA</i>	34
<i>PrfA</i>	35
1) Régulations transcriptionnelles de <i>prfA</i>	37
2) Thermorégulation de <i>prfA</i>	39
3) Régulations post-transcriptionnelles de <i>prfA</i>	40
II. PTS ET REPRESSION CATABOLIQUE	40
II.1. PTS	41
II.2 Historique	42
II.3. Description des différents composants du PTS	44
II.3.A. Protéines générales : EI et HPr	44
<i>EI</i>	45
<i>HPr</i>	46
Protéines paralogues à <i>HPr</i>	49
II.3.B. Enzymes spécifiques du PTS : EII	50
II.4. Propriétés fonctionnelles du PTS	57
	1

Fonctions de EI	58
Fonctions de HPr, EIIA et EIIB	60
II.5. Répression catabolique	65
II.5.A. Répression catabolique chez les firmicutes	67
<i>Les séquences cre</i>	68
<i>CcpA et P-Ser-HPr</i>	74
<i>HprK/P</i>	77
II.5.B. Répression catabolique chez <i>L. monocytogenes</i>	80
III. MATERIELS ET METHODES	84
III.1. Souches utilisées	84
III.2. Méthodes concernant l'ADN	86
III.2.A. Extraction de l'ADN chromosomique de <i>B. subtilis</i>	86
III.2.B. Extraction d'ADN chromosomique de <i>L. monocytogenes</i>	87
III.2.C. « Miniprep » de plasmide à partir d' <i>E. coli</i> : protocole Qiaprep-spin Plasmid kit (Qiagen)	87
III.2.D. PCR sur ADN génomique ou plasmidique	87
III.2.E. Electrophorèse de l'ADN	89
III.2.F. Purification des produits de PCR : kit Qiaquick	90
III.2.G. Purification d'une bande d'ADN sur un gel : QIAquick Gel Extraction Kit	90
III.2.H. Digestions et ligatures	90
III.2.I. Ligation par PCR	91
III.3. Plasmides	92
Construction des plasmides	94
<i>A. pI2 et pIWT7</i>	94
<i>B. pRHptsI</i>	94
<i>C. pAG58prfA*</i>	95
III.4. Milieux de culture et croissance	95
III.5. Conservation des souches	97
III.6. Méthodes concernant les cellules	98
III.6.A. Préparation des extraits totaux de cellules (<i>B. subtilis</i> et <i>L. monocytogenes</i>)	98
III.6.B. Préparation de cellules électrocompétentes d' <i>E. coli</i>	98
III.6.C. Électroporation de cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	98
III.6.D. Milieux Minimums pour préparer des cellules compétentes de <i>B. subtilis</i>	99
III.6.E. Préparation des cellules compétentes de <i>B. subtilis</i>	99
III.6.F. Transformation des cellules compétentes de <i>B. subtilis</i>	99
III.6.G Préparation des cellules compétentes de <i>L. monocytogenes</i>	100
III.6.H. Électroporation des cellules compétentes de <i>Listeria</i>	100
III.7. Méthode de criblage des transformants, intégrants ou mutants	102
III.7.A. Résistance aux antibiotiques	102
III.7.B. PCR	102
III.7.C. Séquençage	102
III.7.D. Croissance en milieu minimum	103
III.7.E. Southern Blot	103
III.7.F. Test de complémentation fonctionnelle du PTS spécifique des β -glucosides	104
III.7.G. Test de l'activité gluconate kinase	105
III.7.H. Test de l'activité inositol déshydrogénase	105
III.7.I. Test de transfert de groupement phosphate	105
III.8. Analyse phénotypique des mutants	106

III.8.A. Test de l'activité β -galactosidase	106
III.8.B. Test de l'activité β -glucuronidase	107
III.9. Méthodes concernant les protéines	107
III.9.A. Purification de protéines par chromatographie d'affinité	107
III.9.B. Purifications de protéines portant une queue poly-histidine	108
III.9.C. Purifications de protéines portant une queue GST	108
III.9.D. Méthodes d'électrophorèse	109
<i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS</i>	109
<i>Electrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide</i>	109
<i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide urée</i>	109
III.9.E. Coloration des gels au bleu de Coomassie	110
III.9.F. Transfert électrophorétique des protéines sur membrane et Western Blot	110
III.9.G. Phosphorylation de HPr par HprK/P	111
III.9.H. Synthèse de [32 P] PEP	111
III.9.I. Phosphorylation de HPr par EI	112
III.9.J. Déphosphorylation de la P-Ser-HPr	113
III.10. Méthodes Bio-informatiques	113
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	115
IV.1. Objectifs	115
IV.2. Intercation avec un cofacteur : activateur ou répresseur ?	116
IV.3. Modification de PrfA	125
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	130
V.1. Approche génétique et moléculaire	130
V.2. Approche biochimique	131
V.3. Modèle animal in vivo	132
VI.1. ANNEXE 1	133
VI.2. ANNEXE 2	137
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139

Liste des figures et des tableaux

Fig. 1 : Murray et Lister (http://history.amedd.army.mil/booksdocs/misc/evprev).....	8
Fig. 2 : Formation d'un biofilm de <i>L. monocytogenes</i> à 20°C sur de l'acier inoxydable (Photos MEB : P. Chavant, M. Hébraud, B. Martinie, INRA, site de Theix)	10
Tableau 1 : Pourcentage de produits contaminés par <i>L. monocytogenes</i> à la distribution (Rapport de la commission Listeria de l'AFSSA, 27 avril 2000)	10
Fig. 3 : Microscopie électronique de <i>L. monocytogenes</i> (National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services, February 2004).....	11
Tableau 2 : Caractères bactériologiques différenciant les espèces de <i>Listeria</i> (+ : positif ; - : négatif) (Rocourt et Jacquet 2000).....	12
Fig. 4 : Différentes étapes du cycle d'infection cellulaire <i>in vivo</i> de <i>L. monocytogenes</i>	15
Fig. 5 : Différentes étapes du cycle d'infection cellulaire (microscopie électronique) (Kocks et al., 1992 ; Cossart and Kocks, 1994).....	16
Fig. 6 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection cellulaire de <i>L. monocytogenes</i> et des principaux facteurs bactériens associés	17
Fig. 7 : Mécanismes d'invasion bactérienne (trigger and zipper mechanism)	17
Fig. 8 : Représentation schématique des internalines dont InlA et InlB	19
Fig. 9 : Voies de signalisation cellulaire activées par l'interaction InlA/E-Cadhérine (Sousa et al., 2005)	20
Fig. 10 : Représentation schématique du locus <i>inlAB</i> et de ses promoteurs (Lingnau et al., 1995)	21
Fig. 11 : Structure tridimensionnelle de la région LRR de l'InlB (Lingnau et al., 1995)	22
Fig. 12 : Voies de signalisation cellulaire activées par l'interaction InlB/Met (Bierne and Cossart, 2002).....	23
Fig. 13 : Représentation des comètes d'actine en microscopie électronique.....	29
Fig.14 : <i>L. monocytogenes</i> commençant à développer une queue d'actine, se meut dans toutes les directions dans le cytoplasme de macrophages infectés (Tilney and Portnoy, 1989)	29
Fig. 15 : Stress rencontrés par <i>L. monocytogenes</i> dans l'hôte (Gahan and Hill, 2005).....	31
Fig. 16 : Représentation schématique des différents processus de réponse aux stress de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> (Hill et al., 2002).....	34

<i>Fig. 17. Principaux gènes de virulence de L. monocytogenes régulés par PrfA (Khelef et al., 2006)</i>	35
<i>Fig. 18 : Comparaison entre PrfA et Crp d'E. coli</i>	36
<i>Fig. 19 : Changements conformationnels de PrfA induits par la mutation prfAG145S</i>	38
<i>Fig. 20 : Mécanisme de thermorégulation de l'UTR de prfA (Johansson et al., 2002)</i>	39
<i>Fig. 21 : Cartes physiques des génomes de L. monocytogenes (rouge) et L. innocua (vert) (Glaser et al, 2001)</i>	42
<i>Fig. 22 : Cascade de phosphorylation et différentes classes du PTS</i>	43
<i>Fig. 23 : Alignement des régions entourant l'histidine phosphorylée de ptsI de L. monocytogenes et B. subtilis</i>	46
<i>Fig. 24 : Alignement des séquences de HPr (et Crh de B. subtilis) chez différentes bactéries</i>	47
<i>Fig. 25 : Structure de HPr de B. subtilis</i>	48
<i>Fig. 26 : Organisation des différents PTS retrouvés chez E. coli et B. subtilis</i>	51
<i>Tableau 3 : Protéines des PTS de E. coli et de B. subtilis</i>	52
<i>Tableau 4 : Représentation des différents PTS chez L. monocytogenes</i>	53
<i>Kegg PATHWAY (http://www.genome.jp/kegg-bin), d'après Glaser et al., Science 294:849-52 (2001)</i>	53
<i>Tableau 5 : Représentation des PTS de la classe cellobiose chez L. monocytogenes, L. innocua et B. subtilis</i>	57
<i>Fig. 27 : Opéron csr et bvr de L. monocytogenes</i>	57
<i>Fig. 28 : Rôle du PTS dans la chimiotaxie chez E. coli</i>	59
<i>Fig. 29 : Représentation schématique du phénomène d'exclusion d'inducteur chez les firmicutes</i>	60
<i>Fig. 30 : Rôle du PTS dans la régulation de LevR</i>	61
<i>Fig. 31 : Rôle du PTS dans la régulation de la glycérol-kinase</i>	62
<i>Fig. 32 : Représentation schématique du phénomène d'exclusion d'inducteur chez les entérobactéries</i>	63
<i>Tableau 6 : Les composants du PTS avec leurs partenaires non-PTS, interactants ou cibles de phosphorylation</i>	64
<i>Fig. 33 : Croissance d'E. coli sur milieu supplémenté avec du glucose et du xylose (Monod, 1942)</i>	65

<i>Fig. 34 : RC des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif</i>	67
<i>Fig. 35 : Mécanisme de répression/activation catabolique chez B. subtilis (Deutscher et al., 2002)</i>	68
<i>Tableau 7 : Liste de gènes possédant un site cre et dont l'expression est sensible à une mutation ΔccpA ou ptsH1 (Deutscher et al., 2002)</i>	73
<i>Fig. 36 : Structure tridimensionnelle du complexe CcpA/P-Ser-HPr/cre ((Schumacher et al., 2004)</i>	77
<i>Fig. 37 : Le complexe HPr-HprK/P de L. casei. Les trois sous-unités de l'hexamère de HprK/P de L. casei colorées en rouge, vert et bleu, fixent trois molécules de HPr de B. subtilis HPr, dorées</i>	78
<i>Tableau 8 : Liste des souches de B. subtilis utilisées dans cette étude</i>	13
<i>Fig. 38 : Modèle de la régulation de l'activité de l'HprK/P chez B. subtilis ... Error! Bookmark not defined.</i>	
<i>Fig. 39 : Organisation génétique de la région entourant hprK chez des bactéries à Gram-</i> 80	
<i>Tableau 9 : Liste des gènes et des protéines codées correspondantes utilisés dans cette étude</i>	13
<i>Tableau 10 : Liste des oligonucléotides utilisés pour construire les plasmides pI2, pIWT7, pRHptsI, et pAG58PrfA*</i>	88
<i>Tableau 11 : Liste des oligonucléotides utilisés pour vérifier des mutants de B. subtilis et L. monocytogenes</i>	88
<i>Tableau 12 : Liste des oligonucléotides utilisés pour cloner différents gènes comme prfA, hprK et ptsH dans les vecteurs d'expression correspondants</i>	89
<i>Tableau 13 : Programme PCR type utilisé pour effectuer une ligation par PCR</i>	91
<i>Fig. 40 : Ligation par PCR</i>	91
<i>Fig. 41 : Représentation schématique du plasmide pQE30</i>	93
<i>Fig. 42 : Représentation schématique du plasmide pGEX-2T</i>	94
<i>Fig. 43 : Représentation schématique du pMAD</i>	95
<i>Fig. 44 : Protocole de mutagénèse avec le pMAD</i>	101
<i>Fig. 45 : Test de complémentation de l'activité PTS spécifique des β-glucosides</i>	104
<i>Tableau 14 : Solutions utilisées pour la purification des protéines portant une queue poly-histidines ou une queue GST</i>	108
<i>Fig. 46 : Schéma du montage d'un transfert protéique</i>	110

Fig. 47 : Synthèse du γ -[³² P] PEP	112
Tableau 15 : Bases de données disponibles sur le World Wide Web utilisées dans cette étude.....	114
Fig. 48 : Hypothèse de travail	116
Fig. 49 : Représentation schématique de la souche BUG1199 de <i>Bacillus subtilis</i> (Sheehan et al., 1995)	117
Fig. 50 : Effet du fructose et glucose sur l'expression de la fusion hly-lacZ de BUG1199	118
Test de l'activité β -galactosidase	118
Fig. 51 : Activité de l'HPrK/P de <i>L. monocytogenes</i>	119
Fig. 52 : Effet des mutations hprKV267F, Δ ccpA (en présence ou absence de glucose 1%) et ptsHI sur l'expression de la fusion hly-lacZ de BUG1199	120
Fig. 53 : Expérience de retard d'élution de HPr et P-Ser-HPr sur une colonne PrfA.....	120
Fig. 54 : Effet des mutations Δ ptsI, Δ ptsGHI, et Δ ptsH sur l'expression de la fusion hly-lacZ de BUG1199 cultivée dans du LB sans glucose additionnel	122
Fig. 55 : Effet de la mutation ptsHHI5A sur l'expression de la fusion hly-lacZ de BUG1199 cultivée dans du LB sans glucose additionnel	122
Fig. 56 : Expérience de retard d'élution de HPr et P~His-HPr sur une colonne PrfA	123
Fig. 57 : Test de phosphorylation de PrfA de <i>L. monocytogenes</i> par EI, et HPr de <i>B. subtilis</i> en présence de [³² P] PEP (Cf. M&M, paragraphe III.9.1).....	126
Fig. 58 : Effet des sucres sur l'expression de la fusion hly-gus de l'AML73	128
Fig. 59 : Cascade de phosphorylation du PTS transportant la dihydroxyacétone chez <i>E. coli</i>	133
Fig. 60 : Hypothèse de travail	137
Fig. 61. Environnement génique de hprK chez <i>A. tumefaciens</i>	137

I. *Listeria monocytogenes* et la listériose

I.1. Historique et Taxonomie

L. monocytogenes est une bactérie à Gram-positif qui a été isolée pour la première fois en juillet 1924, en Angleterre, par Murray et ses collaborateurs, lors d'une épidémie chez des lapins et des cobayes de laboratoire (Fig. 1 ; Murray *et al.*, 1926). Murray décrit le germe, comme étant l'agent responsable d'une élévation anormale du taux de monocytes chez les animaux malades, et le nomma *Bacterium monocytogenes* (Murray *et al.*, 1926). En Afrique du Sud, en 1927, Pirie isolait la même bactérie du foie d'une gerbille, et proposait que le mode de contamination par cet organisme soit probablement oral (Seeliger, 1955). Il le renomma *Listerella hepatolytica*, *Listerella* en l'honneur du chirurgien anglais Lord Joseph Lister, pionnier de l'antisepsie (Seeliger, 1955), et *hepatolytica* en référence à la pathologie qui affectait le foie des rongeurs (Pirie, 1927). Il proposa en 1940, le nom de *Listeria monocytogenes* qui sera retenu et inscrit dans les « Approved Lists of Bacterial Names ». Ce document qui a recensé tous les organismes procaryotes identifiés au 1^{er} Janvier 1980, a été publié dans le « International Journal of Systematic Bacteriology » (Skerman *et al.*, 1980).

Fig. 1 : Murray et Lister (<http://history.amedd.army.mil/booksdocs/misc/evprev>)



Lister J. Murray E.G.D.

Sur la base de quelques caractères morphologiques, le genre *Listeria* avait d'abord été considéré proche des corynébactéries. Les études taxonomiques et surtout le séquençage total de l'ARNr 16S ont prouvé que le genre *Listeria* appartenait au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Bacillales* qui inclut le genre *Bacillus*. En 1983, des

études d'hybridation ADN-ADN ont permis de définir cinq espèces appartenant au genre *Listeria* : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, et *L. welshimeri*. La classification des espèces *L. grayi* et *L. murrayi* a été plus difficile. En 1973, des études d'hybridation ADN-ADN montrent que les deux espèces présentent de fortes homologies entre elles, mais que la distance génomique entre *L. monocytogenes* d'une part, et *L. grayi* et *L. murrayi* d'autre part, semble trop importante pour les regrouper. Des analyses ultérieures, comme le séquençage de l'ARNr 16S, ont confirmé que ces deux espèces appartiennent bien au genre *Listeria* (Jones, 1988). En 1992, sur la base de fortes similitudes génomiques, Rocourt et ses collaborateurs ont proposé de réunir ces deux espèces sous l'unique dénomination *L. grayi* (Rocourt *et al.*, 1992). Par conséquent, le genre *Listeria* compte actuellement six espèces *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, et *L. grayi*. Seules les espèces *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes (Seeliger and Jones, 1986). *L. monocytogenes* infecte principalement l'homme ainsi que les animaux alors que *L. ivanovii* infecte les animaux (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

I.2. Habitat

L. monocytogenes est un bacille à Gram-positif non sporulant (Rocourt and Seeliger, 1985). Ses conditions de croissance peu exigeantes, lui permettent en effet de coloniser de nombreuses niches écologiques (Berche *et al.*, 2000). Ainsi, *L. monocytogenes* est communément répandue dans l'environnement (végétaux particulièrement ceux en décomposition, pâturages, eaux douces, eaux de mer, vase, eaux d'égouts), dans les locaux d'élevage (litière, sol, mangeoires, abreuvoirs...) et dans les locaux d'habitation (périphérie des conduites d'évacuation, réfrigérateur, brosses à dents, etc.)

L. monocytogenes est également présente dans les matières fécales de nombreux animaux (ovins, bovins, porcins, poulets...) et de l'homme (Rocourt and Seeliger, 1985). Chez l'homme, environ 10% des individus sont porteurs asymptomatiques de *L. monocytogenes* (Grif *et al.*, 2003).

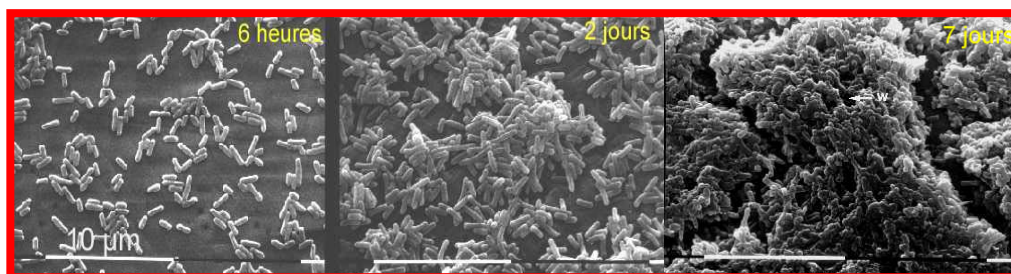
Cette bactérie est un contaminant récurrent des chaînes agroalimentaires. Certains aliments, qu'ils s'agissent de produits laitiers, de viandes, de poissons ou de crustacés, peuvent être contaminés par *L. monocytogenes* (Tableau 1). La capacité de *L. monocytogenes* à se multiplier dans une large gamme de température (1°-45°) et à résister à des conditions environnementales sévères (pH, sels), pose un sérieux problème aux industries

agroalimentaires pour la conservation de leurs produits (Bell and Kyriakides, 1998). La contamination peut survenir à tous les stades de la fabrication et de la distribution, mais elle peut également avoir lieu chez le consommateur (locaux d'habitation). Les bactéries peuvent coloniser des surfaces inertes où elles s'organisent en biofilm (Fig. 2) (Stepanovic *et al.*, 2004).

Type de produit	Pourcentage de produits contaminés	Type de produit	Pourcentage de produits contaminés
Produits carnés	16 %	Produits laitiers	5 %
charcuterie crue hachée	45 %	Fromages au lait cru	8 %
viande hachée	36 %	croûte fleurie	14 %
charcuterie consommée en l'état	15 %	croûte lavée	10 %
Produits de la mer	10 %	Fromages au lait pasteurisé	3 %
Saurisserie fumée	16 %	croûte fleurie	4 %
		croûte lavée	5 %

Tableau 1 : Pourcentage de produits contaminés par *L. monocytogenes* à la distribution (Rapport de la commission Listeria de l'AFSSA, 27 avril 2000)

Fig. 2 : Formation d'un biofilm de *L. monocytogenes* à 20°C sur de l'acier inoxydable (Photos MEB : P. Chavant, M. Hébraud, B. Martinie, INRA, site de Theix)



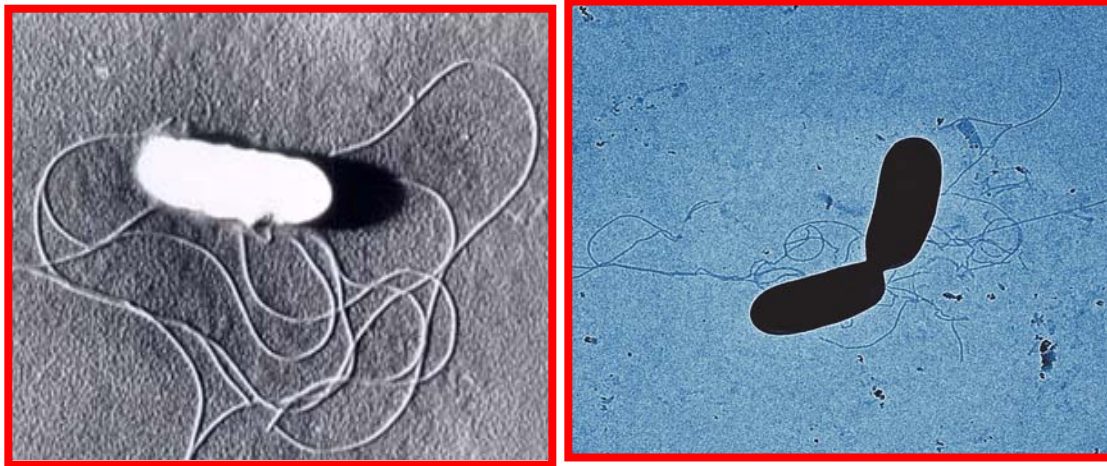
I.3. Caractères bactériologiques

A- Morphologie

L. monocytogenes est un bacille à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif, mobile à 22°C grâce à la présence de flagelles péritriches, dont le nombre est compris entre 1 et 5 (Fig. 3), immobile à 37°C, aux extrémités arrondies, non capsulé, non sporulant, mesurant 0.5-2.5 µM / 0,5 µM. Sa mobilité est caractéristique car la bactérie semble tourner sur elle même. Certaines souches de *L. monocytogenes* ne sont pas soumises à l'influence de la température car elles restent mobiles à 37°C (Way *et al.*, 2004).

Le pourcentage en G + C des espèces de *Listeriae* est compris entre 36 et 42. La paroi renferme des acides téichoïques et lipotéichoïques, les acides mycoliques sont absents, les acides gras sont saturés et non ramifiés.

Fig. 3 : Microscopie électronique de *L. monocytogenes* (National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services, February 2004)



B- Culture

Ces bactéries psychotrophes halotolérantes, se cultivent facilement sur milieux ordinaires pouvant contenir jusqu'à 20% de sels (optimum 0.5% NaCl) (McClure *et al.*, 1991), entre 1°C et 45°C (optimum 30-37°C) (Seeliger and Jones 1986). Elles donnent des colonies de 1-2 mm, *smooth*, transparentes, à bords réguliers, irisées, β-hémolytiques sur gélose au sang (cheval 5%). *L. monocytogenes* survit dans des milieux dont le pH varie entre 4,5 et 9. Son pH optimal de croissance est de 7 (McClure *et al.*, 1991). Ces colonies sont catalase positive et produisent une lécithinase. C'est une bactérie aéro-anaérobie, fermentant le glucose et l'esculine sans produire du gaz. Les caractères fermentaires des sucres permettent de distinguer les espèces du genre *Listeria* (Tableau 2).

C- Marqueurs Biologiques Biochimiques et Identification des *Listeriae*

La structure antigénique des acides téichoïques permet de définir 13 sérovars. Près de 75% des souches pathogènes pour l'homme appartiennent au sérovar 4b, les autres appartenant au sérovar 1/2 (25%). L'identification des souches est réalisée par l'analyse des profils de restriction du chromosome par électrophorèse en champ pulsé.

	Hémolyse	CAMP test <i>S. aureus</i> *	CAMP test <i>R. equi</i> **	D-xylose	L-rhamnose	α méthyl D-mannosi de	Ribose	Mannitol
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i> (subsp <i>ivanovii</i>)	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i> (subsp <i>londoniensis</i>)	+	-	+	+	-	variable	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	variable	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	variable	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	non défini	-	+

* *Staphylococcus aureus* ; ** *Rhodococcus equi*

Tableau 2 : Caractères bactériologiques différenciant les espèces de *Listeria* (+ : positif ; - : négatif) (Rocourt et Jacquet 2000)

I.4. Listériose humaine

Durant de nombreuses années, la listériose a été considérée comme une zoonose, maladie qui touche surtout les animaux et qui est transmissible à l'homme. Un grand nombre d'espèces animales sont sensibles à *L. monocytogenes*, comme les mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, porcins, lapins), les oiseaux (poulets) et les animaux sauvages (gibiers). Des animaux en bonne santé apparente présentant des symptômes bénins peuvent être porteurs et excréteurs de *L. monocytogenes* notamment dans les fèces.

Dans les années 1980, l'apparition d'épidémies à *L. monocytogenes* permit d'incriminer l'alimentation comme source de contamination et il fut officiellement conclu que *L. monocytogenes* est un pathogène d'origine alimentaire (Jacquet *et al.*, 1999 ; Rocourt and Cossart, 1998).

A. Diversité des souches

En France, 97% des cas de listériose humaine de l'année 1998 ont été provoqués par les seuls sérotypes, 1/2a, 1/2b et 4b (Jacquet *et al.*, 1999). Il apparaît donc que toutes les souches de *L. monocytogenes* ne sont pas équivalentes dans leur capacité à causer une infection chez l'homme. Cette observation a donné lieu à plusieurs études qui analysent la diversité génétique des souches de *Listeria* en fonction de leur niveau de virulence (Buchrieser *et al.*, 2003 ; Doumith *et al.*, 2004b ; Nelson *et al.*, 2004).

B. Personnes à risque

Les listérioses humaines s'observent essentiellement (mais pas uniquement) chez les femmes enceintes (quel que soit le terme de la grossesse), les nouveau-nés contaminés par leur mère et les individus présentant des troubles du système immunitaire. Ces derniers sont classés, par le Centre National de Référence des *Listeria*, en trois groupes avec un niveau de risque décroissant : 1) personnes atteintes d'hémopathies, transplantées, atteintes de SIDA ; 2) personnes atteintes de cancers solides, d'hépatopathies et les hémodialysés ; 3) personnes diabétiques mal équilibrées et les alcooliques. Classiquement, les personnes âgées sont considérées comme faisant partie des sujets à risque et certains chiffres publiés dans la littérature scientifique font état d'une incidence des listérioses 11 fois plus élevée à partir de 70 ans qu'entre 20 et 40 ans. Toutefois, selon les données de l'Institut de Veille Sanitaire, de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et du Centre National de Référence des *Listeria*, les sujets âgés bien-portants n'ont pas un risque beaucoup plus élevé que celui de la population générale. Il convient de noter que les enfants, mêmes jeunes, ont un risque identique voire plus faible que celui de la population générale.

Nous distinguons deux formes de listériose : La listériose foeto-maternelle et la listériose chez l'adulte.

C. Listériose foeto-maternelle

En France, depuis 1994, le nombre des listérioses foeto-maternelles est en diminution. Les femmes se contaminent durant les six premiers mois de grossesse et l'infection entraîne fréquemment un avortement, la naissance d'enfants mort-nés ou la naissance d'un enfant contaminé (soit par voie sanguine, soit au moment de l'accouchement à partir d'un foyer endométrial). La contamination de l'amnios est silencieuse mais, un épisode fébrile d'allure pseudogrippale est souvent observé avant l'avortement ou l'accouchement. Chez le nouveau-né infecté, la listériose se traduit par une forme septicémique précoce avec formation de granulomes disséminés sur de nombreux organes (granulomatose septique infantile) ou par des formes méningées plus tardives.

D. Listériose chez L'adulte

La contamination des adultes se fait le plus souvent par voie digestive et résulte soit de l'ingestion d'aliments contaminés soit d'une infection endogène liée à un portage intestinal.

Dans ce dernier cas, des altérations de la muqueuse intestinale (liées par exemple à des infections gastro-intestinales) ou des altérations du système immunitaire local (immunothérapie, immunodépression) permettraient une invasion de la barrière intestinale. La réalité des infections endogènes est suggérée par les cas de listériose observés en 1987 à Philadelphie (36 cas de listériose dont 16 mortels). Ces cas étaient dus à de nombreuses souches ce qui excluait le rôle d'une unique source de contamination et, dans la plupart des cas, ils ont été observés chez des patients atteints de troubles gastro-intestinaux et présentant une érosion de la muqueuse intestinale.

Des infections nosocomiales ont également été décrites (transmission par des intubateurs, des couveuses ou des thermomètres) mais elles sont rares et témoignent d'un non-respect des règles d'hygiène.

Chez l'adulte, la listériose se traduit, le plus souvent, par une septicémie ou des infections du système nerveux central (méningites, méningo-encéphalites, parfois encéphalites, rarement abcès de cerveau). D'autres formes ont été décrites : gastro-entérites, endocardites, infections cutanées (papules ou pustules sur les bras et les mains observées chez des vétérinaires ou des éleveurs ayant été en contact avec des avortons contaminés), arthrites, péritonites (notamment chez des patients présentant une cirrhose du foie)...

I.5. Cycle Infectieux

A. Cycle infectieux *in vivo*

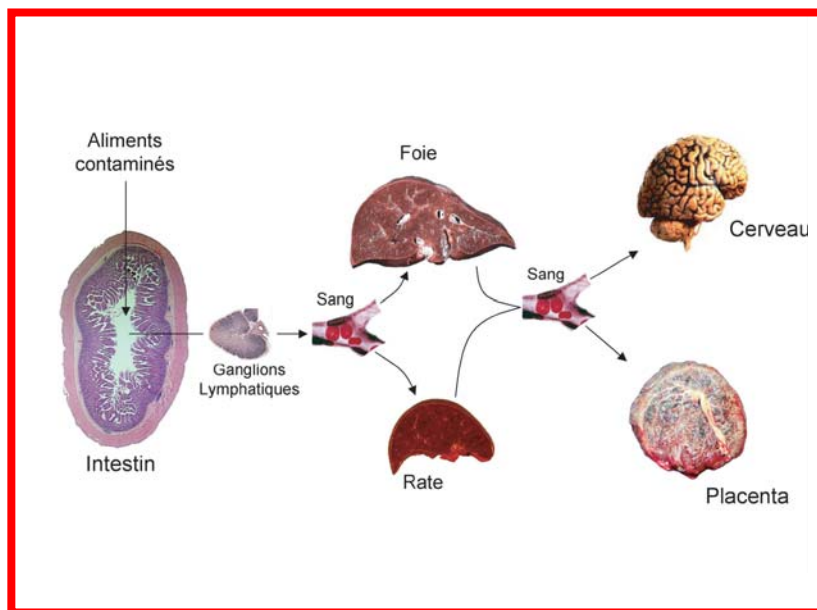
Si le cycle d'infection par *L. monocytogenes*, au niveau cellulaire, est de nos jours bien caractérisé, de nombreuses incertitudes subsistent pour ce qui concerne le déroulement de l'infection *in vivo* (Fig. 4) (Khelef *et al.*, 2006 ; Kocks *et al.*, 1992 ; Lecuit and Cossart, 2001 ; Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

Des modèles d'infection *in vivo* ont été développés pour mesurer l'atténuation de la virulence. En parallèle, des modèles cellulaires *in vitro* ont été développés pour déterminer les étapes du cycle infectieux.

L'infection par *L. monocytogenes* constitue de nos jours un modèle d'études pour d'autres bactéries pathogènes intracellulaires.

Les études menées sur différents modèles animaux, tels le lapin, le rat, le cobaye et la souris, ont permis d'envisager le scénario d'infection animale le plus probable (Fig. 4).

Fig. 4 : Différentes étapes du cycle d'infection cellulaire *in vivo* de *L. monocytogenes* (d'après Lecuit *et al.*, 2004)



Les bactéries ingérées avec le bol alimentaire sont largement détruites par l'acidité naturelle de l'estomac. La glutamate décarboxylase de *L. monocytogenes* permet *in vitro* de limiter les effets bactériolytiques de l'acidité gastrique en éliminant une partie des protons (Cotter *et al.*, 2001). Une fois dans l'intestin, *L. monocytogenes* est capable de franchir la barrière de l'épithélium intestinal de l'hôte infecté probablement directement par invasion entérocytaire (Lecuit *et al.*, 2001 ; Racz *et al.*, 1972). Une fois l'épithélium digestif traversé, les bactéries prolifèrent particulièrement au niveau des plaques de Peyer, où elles colonisent massivement les cellules dendritiques (Pron *et al.*, 1998, 2001). Ces cellules phagocytaires permettraient à *L. monocytogenes* d'être véhiculée jusqu'aux ganglions mésentériques où elle coloniserait d'autres phagocytes tels les neutrophiles et les monocytes (Drevets, 1999 ; Pron *et al.*, 2001). Ces phagocytes circulant permettraient la dissémination de *L. monocytogenes* aux tissus endothéliaux et faciliteraient ainsi l'invasion ultérieure d'organes tels la rate et le foie (Drevets, 1999). *L. monocytogenes* se développe particulièrement dans les hépatocytes et lors d'une seconde phase de dissémination, elle peut gagner le système nerveux.

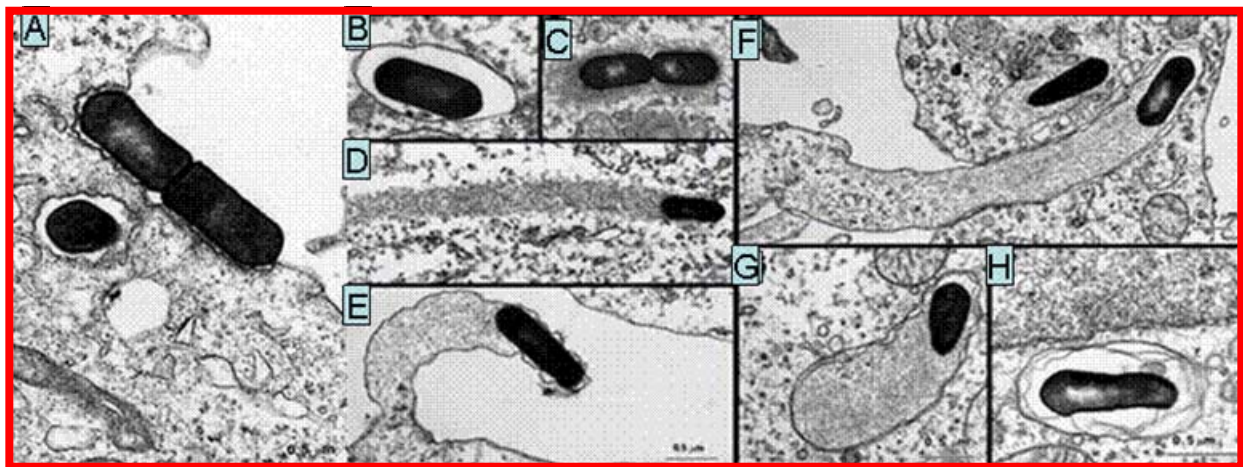
B. Cycle infectieux *in vitro*

Le cycle de réplication intracellulaire de *L. monocytogenes* se fait comme suit (Fig. 5, 6) : Les bactéries adhèrent par l'intermédiaire de l'internaline A (InlA), à certaines cellules

possédant la E-cadhérine (Fig. 5A). Ceci induit la phagocytose des bactéries. Une deuxième protéine de surface, l'internaline B (InIB), agit pour favoriser l'entrée dans certaines cellules telles que les hépatocytes. Les bactéries sont dans les phagosomes et gagnent le cytoplasme grâce à la listériolysine O (LLO) et d'une phospholipase C (PI-PLC). Dans le cytoplasme, les bactéries se multiplient et polymérisent l'actine F en actine G, créant des "comètes" d'actine (Fig. 5D) qui propulsent les bactéries vers la membrane des cellules. Ceci est due à la protéine ActA et permet la dissémination des bactéries de cellules à cellules (Fig. 5F). Dans les cellules adjacentes, les bactéries sont entourées d'une double membrane (Fig. 5G) qu'elles détruisent par l'action de la listériolysine O et d'une autre phospholipase (PC-PLC) (Fig. 5H). Un nouveau cycle de vie intracellulaire débute. Les différentes étapes du cycle cellulaire sont :

1. Pénétration dans les cellules
2. Multiplication intracellulaire
3. Motilité intracellulaire
4. Passage de cellule en cellule

Fig. 5 : Différentes étapes du cycle d'infection cellulaire (microscopie électronique) (Kocks et al., 1992 ; Cossart and Kocks, 1994)

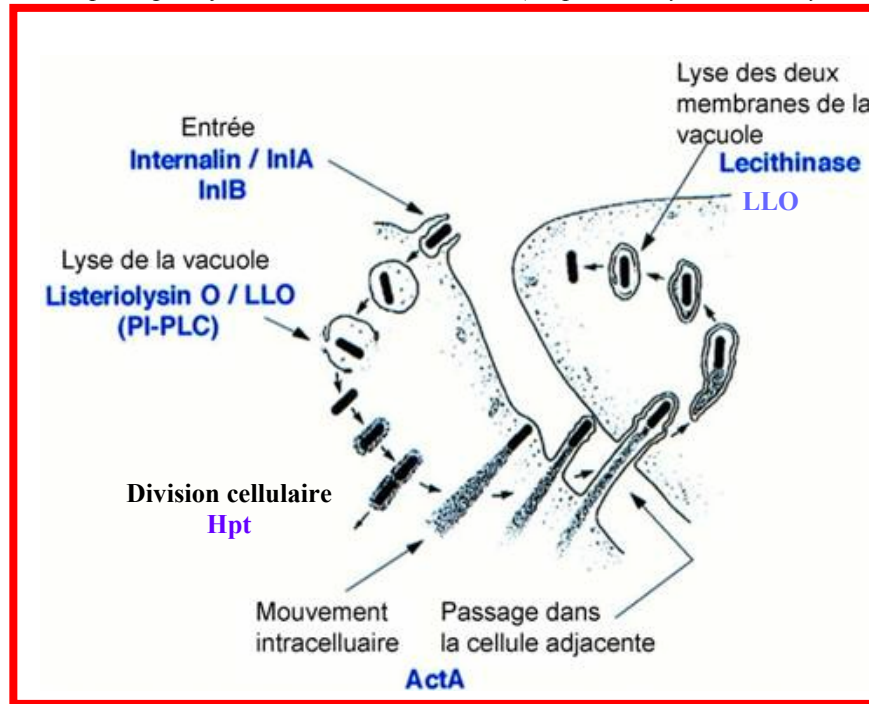


- A. Adhésion et entrée.
- B. Bactérie à l'intérieur de la première vacuole.
- C. Multiplication intracellulaire.
- D. Polymérisation d'actine et mouvement intracellulaire.
- E. Formation de la protrusion.
- F. Passage de cellule en cellule.

G. Bactérie à l'intérieur de la seconde vacuole à deux membranes.

H. Lyse de la seconde vacuole

Fig. 6 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection cellulaire de *L. monocytogenes* et des principaux facteurs bactériens associés (d'après Tinley and Portnoy, 1997)

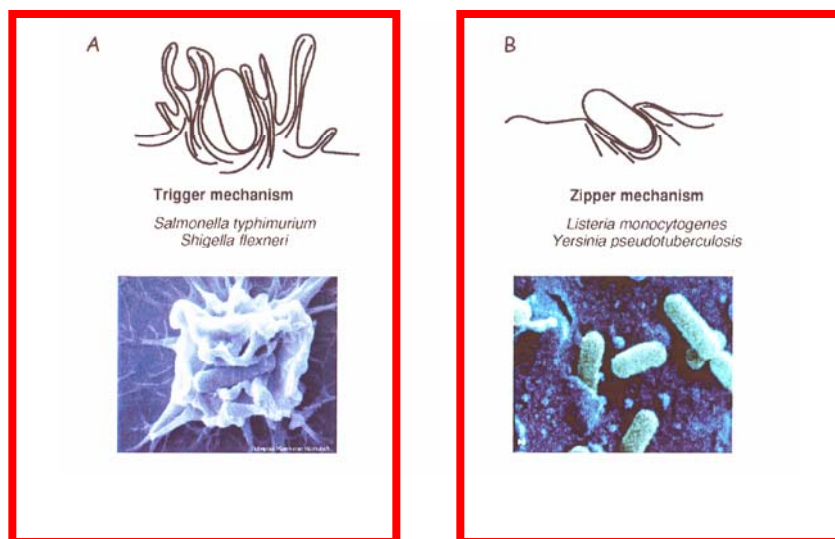


1. Pénétration dans les cellules

L. monocytogenes est capable de franchir différents types de cellules *in vivo* ou en culture. Dans un premier temps, *L. monocytogenes* adhère aux cellules *via* plusieurs interactions directes entre un ligand bactérien et un récepteur cellulaire et provoque sa propre phagocytose selon le mécanisme dit de « fermeture éclair » ou « zipper » (Fig. 7) (Finlay and Cossart, 1997 ; Mengaud *et al.*, 1996).

L'invasion nécessite des remaniements du cytosquelette d'actine cellulaire ; toutefois ces remaniements ne sont pas aussi importants que ceux décrits lors de l'entrée d'autres bactéries pathogènes, telles que *Shigella* ou *Salmonella* (Fig. 6) (Swanson and Baer, 1995). En effet des cellules prétraitées à la cytochalasine D, une drogue bloquant la polymérisation d'actine, sont très faiblement permissives à l'invasion par *L. monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1987). L'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules non-phagocytaires est permise grâce à deux protéines de surface majeures InlA et InlB.

Fig. 7 : Mécanismes d'invasion bactérienne (trigger and zipper mechanism)



En 1991, Jean Louis Gaillard isolait des mutants de *L. monocytogenes* non invasifs dans les cellules Caco-2 (Carcinome colique humain). (Gaillard *et al.*, 1991). L'analyse génétique des mutants révéla l'insertion d'un transposon en amont de deux phases ouvertes de lecture codant les gènes *inlA* et *inlB*, organisés en opéron. Les deux protéines InlA et InlB jouent un rôle prépondérant dans l'entrée de *L. monocytogenes* (Dramsi *et al.*, 1995 ; Gaillard *et al.*, 1991). Malgré leur similarité significative, InlA et InlB possèdent un tropisme cellulaire différent. InlA permet l'entrée dans les cellules épithéliales exprimant l'E-cadhérine (Mengaud *et al.*, 1996), tandis que InlB module l'entrée dans un grand nombre de types cellulaires, comme les hépatocytes, les cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastiques. InlA et InlB interagissent avec des récepteurs cellulaires différents.

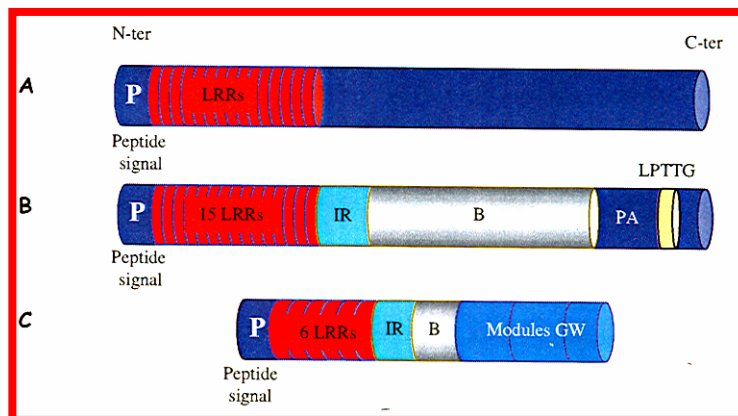
InlA

Le gène *inlA* code une protéine InlA de 800 acides aminés. La complémentation en *trans* d'un mutant isogénique de la souche sauvage EGD, dépourvu d'InlA (EGD Δ *inlA*), par un plasmide exprimant *inlA* a permis de démontrer que ce gène serait impliqué dans l'invasion des cellules Caco-2 par *L. monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1991). De plus, l'expression de *inlA* chez la bactérie non invasive, *L. innocua*, suffit à promouvoir l'invasion de cette bactérie dans les cellules Caco-2. D'autres travaux permirent de montrer que la protéine

InlA est suffisante pour promouvoir l'invasion dans les cellules Caco-2, de billes de latex recouvertes de protéines InlA purifiées (Lecuit *et al.*, 1997).

InlA est organisée en plusieurs domaines fonctionnels (Fig. 8) : un peptide signal, une région de 15 répétitions de 22 acides aminés riches en leucine (LRR), une région inter-répétitions (IR), une région de trois répétitions de deux fois 70 acides aminés et de 49 acides aminés (B), et un domaine C-terminal contenant le motif LPXTG. InlA est une protéine de surface de *L. monocytogenes* maintenue par une liaison covalente de son motif d'ancrage LPXTG au peptidoglycane (Dhar *et al.*, 2000 ; Lebrun *et al.*, 1996). La présence de cette ancre est nécessaire à la fonction d'InlA, car un mutant exprimant une chimère d'InlA dépourvue d'ancre est non invasif dans des cellules Caco-2 (Lebrun *et al.*, 1996).

Fig. 8 : Représentation schématique des internalines dont InlA et InlB



A. Représentation schématique des internalines.

B. Représentation schématique de InlA

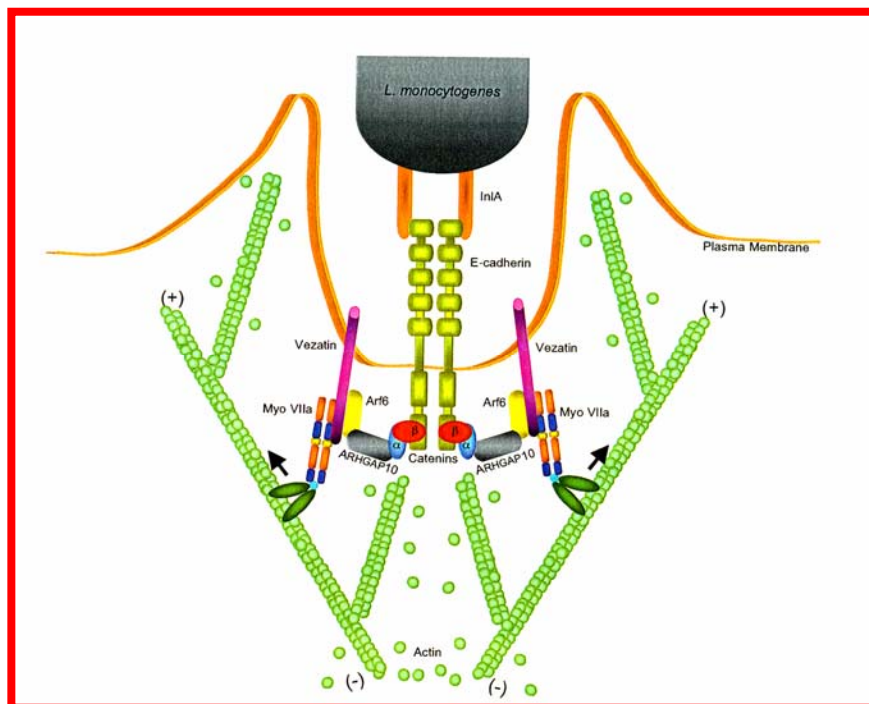
C. Représentation schématique de InlB

LRRs : Région de répétitions riches en leucine ; IR : Région inter-répétitions ; B : Région des répétitions ; PA : Région de pré-ancrage ; LPXTG : Signal d'ancrage à la surface ; GW : Modules GW d'association à la surface

Le récepteur cellulaire de l'internaline est l'E-cadhérine (Mengaud *et al.*, 1996), une molécule des jonctions adhérentes située sur la face basolatérale de cellules épithéliales polarisées. Le domaine LRR-IR de l'internaline est suffisant pour lier la E-cadhérine (Lecuit *et al.*, 1997). La spécificité d'interaction InlA/E-cadhérine est très étroite. Ainsi la N-cadhérine neuronale, une molécule proche structurellement de la E-cadhérine ne fixe pas l'internaline (Mengaud *et al.*, 1996). De plus, l'interaction InlA/E-cadhérine requiert la

présence d'un résidu proline en position 16 dans la E-cadhérine (Lecuit *et al.*, 1999). La E-cadhérine murine qui ne possède pas la proline en position 16, mais un acide glutamique, ne permet pas l'invasion InlA-dépendante. Une mutation ponctuelle substituant l'acide glutamique en proline suffit à rendre cette E-cadhérine murine fonctionnelle pour l'interaction avec InlA (Lecuit *et al.*, 1999). Le domaine intracytoplasmique de la E-cadhérine interagit avec l' α - et la β -caténine. La β -caténine liant directement l'actine, il a été proposé que l'interaction InlA/E-cadhérine pouvait provoquer directement les réarrangements du cytosquelette nécessaires à l'invasion bactérienne, selon un mécanisme caténines-dépendant (Lecuit *et al.*, 2000). Il a été également démontré que la myosine VIIa était requise pour l'entrée de *Listeria* dépendante de InlA (Sousa *et al.*, 2004). La vézatine, un ligand de la myosine VIIa, joue aussi un rôle crucial dans le recrutement de la myosine VIIa au site d'entrée de *Listeria* (Sousa *et al.*, 2004). Récemment, ARHGAP10 a été identifié, comme étant un nouveau ligand de l' α -caténine, qui est nécessaire à l'entrée InlA-dépendante de *Listeria* (Sousa *et al.*, 2005). Le modèle proposé pour l'entrée InlA-dépendante de *Listeria* et qui induit la polymérisation de l'actine dans les cellules épithéliales est représenté dans la figure ci-dessous (Fig. 9).

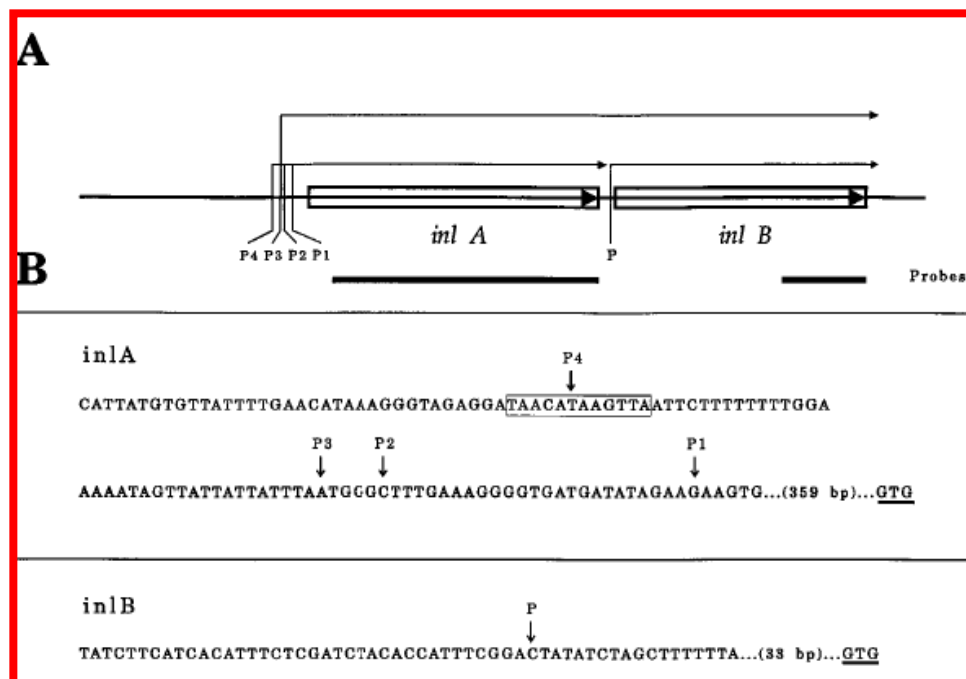
Fig. 9 : Voies de signalisation cellulaire activées par l'interaction InlA/E-Cadhérine (Sousa *et al.*, 2005)



InlB

InlB a été identifiée dans le cadre de l'étude des mutants non invasifs dans les cellules Caco-2 (Gaillard *et al.*, 1991). Le gène *inlB* est situé en aval d'*inlA* dans l'opéron *inlAB* (Gaillard *et al.*, 1991). L'expression d'*inlB* dépend de deux promoteurs (Fig. 10). Le promoteur le plus actif en amont de l'opéron *inlAB* est sous le contrôle positif du régulateur transcriptionnel PrfA (Dramsi *et al.*, 1993 ; Lingnau *et al.*, 1995). Le deuxième promoteur, situé entre les gènes *inlA* et *inlB*, est indépendant de PrfA. *In vitro*, le contact entre *L. monocytogenes* et les cellules hôtes active la synthèse d'InlB d'une manière PrfA-dépendante (Renzoni *et al.*, 1999). La fonction d'InlB a été caractérisée en 1995 (Dramsi *et al.*, 1995 ; Lingnau *et al.*, 1995). *In vitro*, InlB permet l'invasion de différents types de cellules (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). *In vivo*, dans un modèle murin, des bactéries dépourvues d'InlB sont moins virulentes et se développent moins efficacement dans le foie que la souche sauvage isogénique (Dramsi *et al.*, 2005 ; Gaillard *et al.*, 1996 ; Gregory *et al.*, 1997 ; Lingnau *et al.*, 1995). Un mutant isogénique de la souche sauvage EGD, dépourvu d'InlB (EGD Δ *inlB*) est fortement affecté dans l'invasion des cellules épithéliales, endothéliales ou fibroblastiques (Ireton and Cossart, 1997). Le dénombrement des bactéries dans le foie et la rate de souris, après injection intrapéritonéale et trois jours d'infection, montre qu'un mutant Δ *inlB* est cent fois moins présent dans ces organes que la souche sauvage isogénique (Lingnau *et al.*, 1995).

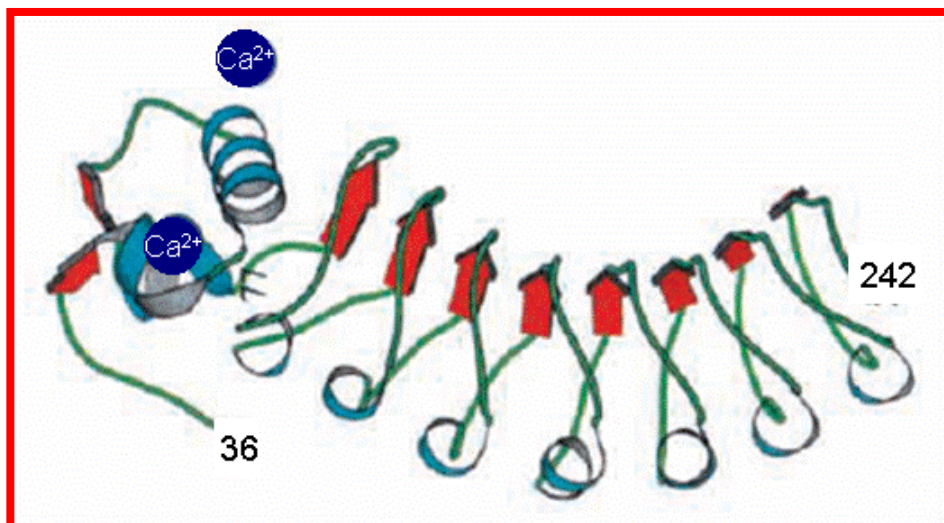
Fig. 10 : Représentation schématique du locus *inlAB* et de ses promoteurs (Lingnau *et al.*, 1995)



A : Représentation schématique de l'organisation transcriptionnelle du locus *inlAB*
B : Séquences nucléotidiques des régions précédant les gènes *inlA* et *inlB*. P : Promoteur ; P4 : boîte PrfA.

InlB est une protéine de 630 acides aminés, associée de manière labile à la surface bactérienne (Braun *et al.*, 1997). InlB est dotée de plusieurs domaines fonctionnels présentant des similitudes avec les domaines d'InlA (Fig. 8) : un peptide signal, un domaine contenant 8 répétitions de 22 acides aminés riches en leucine (LRR), un domaine inter-répétitions (IR), une « répétition B » et un domaine C-terminal de 232 acides aminés. Ce domaine C-terminal est spécifique à InlB, il est constitué de motifs répétés d'environ 80 acides aminés, commençant par les acides aminés GW (modules GW ; Braun *et al.*, 1997 ; Glaser *et al.*, 2001 ; Cabanes *et al.*, 2002). La production de différents domaines d'InlB a permis de déterminer que les 213 acides aminés du domaine LRR étaient suffisants pour promouvoir l'invasion InlB-dépendante (Braun *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle du domaine LRR a été déterminée et a montré l'existence de deux demi-sites de liaison au calcium (Fig. 11) (Marino *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, le rôle potentiel de ces sites dans le processus d'invasion cellulaire n'a pas encore été déterminé. Les 232 derniers acides aminés d'InlB sont, quant à eux, nécessaires et suffisants pour maintenir InlB à la surface bactérienne (Braun *et al.*, 1997). Une protéine InlB dépourvue de modules GW est entièrement sécrétée dans les surnageants de culture (Braun *et al.*, 1997).

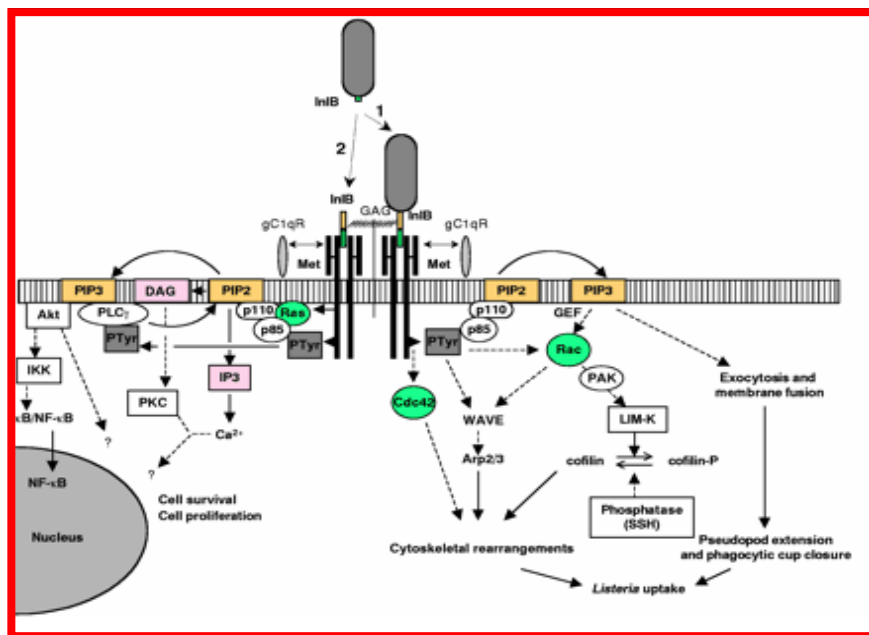
Fig. 11 : Structure tridimensionnelle de la région LRR de l'InlB (Marino *et al.*, 1999)



InIB interagit avec trois molécules de la surface cellulaire : Met (Shen *et al.*, 2000), le récepteur du facteur de croissance HGF (Hepatocyte Growth Factor), gC1qR le récepteur de la partie globulaire de C1q, le premier composant du complément (Braun *et al.*, 2000), et les glycosaminoglycanes (Jonquieres *et al.*, 2001).

Les cascades de signalisation induites en aval de InIB ont été analysées en détails (Fig. 12) (Bierne and Cossart, 2002 ; Pizzaro-Cerda *et al.*, 2004). L'entrée dépendante de InIB induit la phosphorylation sur un résidu tyrosine de Met et des molécules adaptatrices Gab1, Cb11 et Shc, mais également la phosphorylation des lipides, les phosphatidylinositols phosphates par la PI3-kinase (PI3K). Plusieurs protéines ont été identifiées comme jouant un rôle au cours de l'infection par *L. monocytogenes*. Parmi ces protéines, des kinases, comme la PAK kinase et la LIM kinase, jouent un rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine permettant l'entrée de la bactérie.

Fig. 12 : Voies de signalisation cellulaire activées par l'interaction InIB/Met (Bierne and Cossart, 2002)



D'autres voies de signalisation en aval de l'activation de la PI3K ont été identifiées. Elles font intervenir les protéines kinases PKC et Akt (Cossart *et al.*, 2003). La participation de ces événements cellulaires dans la survie et la prolifération des cellules infectées par *L. monocytogenes* est encore mal comprise. La phosphorylation de protéines ou de lipides ne serait pas la seule modification induite au cours de l'entrée InIB-dépendante. La protéine InIB purifiée a été montrée capable d'induire la mono-ubiquitination dépendante de

l'ubiquitine ligase Cb1 du récepteur Met et son endocytose (Veiga and Cossart, 2005). Dans cette étude, le rôle de la machinerie d'endocytose dans le processus d'internalisation de *L. monocytogenes* a été mis en évidence pour la première fois.

D'autres composants de surface ont été décrits et participeraient à la pénétration dans des cellules eucaryotes :

- La protéine P60 est une muréine hydrolase (Kuhn and Goebel, 1989 ; Wuenscher *et al.*, 1993) (enzyme qui, en coupant le peptidoglycane, est essentielle à la multiplication bactérienne) et les mutants incapables de la synthétiser ont une virulence réduite et pénètrent mal dans des fibroblastes (Pilgrim *et al.*, 2003b). Il a été montré plus tard que la protéine P60 purifiée adhère aux cellules Caco-2 (Park *et al.*, 2000).
- La protéine ActA, essentielle à la mobilité intracellulaire (qui sera aussi détaillée dans le paragraphe suivant) pourrait également participer au pouvoir invasif car des mutants *actA* sont incapables de pénétrer dans des cellules épithéliales Caco-2 ou Véro.
- Une protéine sécrétée, de 30 kDa, dénommée Irp (Internalin related protein) ou aussi InIC, montre des analogies avec les protéines InIA et InIB et pourrait être impliquée dans les mécanismes de pénétration (Engelbrecht *et al.*, 1996).
- L'alpha-D-galactose, présent à la surface des bactéries, intervient dans la fixation sur des cellules de la lignée HepG2 (cellules d'hépatocarcinome humain) et facilite la pénétration dans les cellules dendritiques (Cowart *et al.*, 1990).
- La FbpA (Fibronectin binding protein A), une protéine de surface de 55,3 kDa, est capable de se lier à la fibronectine et permettrait une adhésion aux cellules. Elle est requise pour la colonisation de la rate et du foie des souris (Dramsai *et al.*, 2004). La fibronectine est associée à de très nombreuses cellules et cette adhésion pourrait constituer un stade préliminaire à la pénétration proprement dite en facilitant l'interaction des protéines InIA, InIB, P60... avec leurs récepteurs spécifiques.
- SvpA (Surface virulence-associated protein A), une protéine de surface, ancrée de façon non covalente grâce à la sortase B, est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Le défaut de croissance du mutant *svpA* rend difficile l'interprétation de son rôle dans la virulence (Borezee *et al.*, 2001 ; Bierne *et al.*, 2004).
- La LpeA (Lipoprotein mediating entry A) est la première lipoprotéine pour laquelle un rôle dans l'entrée d'une bactérie pathogène intracellulaire a été mis en évidence.

Cette protéine favorise l'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires, mais n'influence pas son entrée dans les macrophages (Reglier-Poupet *et al.*, 2003). Un mutant présentant une insertion dans le gène *lpeA* aurait une croissance supérieure à celle de la souche sauvage dans les organes de la souris. Les raisons qui expliquent ce phénotype ne sont pas connues.

- La LAP (*Listeria* Adhesion Protein), anciennement nommée P104, joue un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, mais n'est pas requise pour l'attachement à d'autres types de cellules comme les hépatocytes (Jaradat *et al.*, 2003 ; Pandiripally *et al.*, 1999). La protéine de choc thermique Hsp60 a été identifiée, comme étant le récepteur cellulaire de la LAP dans une lignée de cellules épithéliales intestinales (Wampler *et al.*, 2004).
- La protéine Vip est une protéine de surface possédant un motif LPXTG. Elle pourrait constituer un facteur de virulence potentiel car elle est absente chez *L. innocua* mais est présente dans toutes les souches de *L. monocytogenes*, à l'exception de celles des sérovars 4a et 4c (Cabanes *et al.*, 2005). Elle serait requise pour l'entrée de *L. monocytogenes* dans certains types cellulaires. La protéine chaperon Gp96 a été identifiée comme étant son récepteur cellulaire (Cabanes *et al.*, 2005)
- La protéine Ami est une amidase ancrée à la membrane par des motifs GW. L'inactivation d'Ami réduit l'entrée InlA et/ou InlB dépendante de *Listeria*. Ce résultat suggère que dans les étapes très précoces, des autolysines comme Ami, participent à l'adhésion des bactéries en reconnaissant des molécules analogues aux acides téichoïques et lipotéichoïques à la surface des cellules (Milohanic *et al.*, 2001).

Toutes ces interactions contribuent à l'invagination de la membrane, aboutissant à l'emprisonnement de la bactérie dans une vacuole primaire de phagocytose.

La publication du génome de *L. monocytogenes* a permis de recenser diverses autres protéines apparentées aux internalines. Parmi ces internalines, InlC, InlH et InlJ contribuent également à la virulence de la bactérie, mais leur rôle dans l'infection par *L. monocytogenes* n'est pas aussi bien caractérisé que celui de InlA et InlB (Engelbrecht *et al.*, 1996 ; Sabet *et al.*, 2005 ; Schubert *et al.*, 2001). D'autre part la listériolysine O se lie au cholestérol des membranes ; cette liaison est suivie de l'insertion, l'oligomérisation et la formation d'un

pore qui pourrait permettre le passage d'ions comme le Ca^{2+} . Dans ce contexte, le rôle du Ca^{2+} dans l'entrée InIB-dépendante de *L. monocytogenes*, a été étudié. Il a été montré que l'entrée des bactéries induisait des flux de Ca^{2+} médiés par la LLO (Dramsi and Cossart, 2003).

2. Multiplication intracellulaire

Dans le phagosome, *L. monocytogenes* est exposée aux mécanismes de défense de l'hôte, tels que l'acidification de la vacuole et la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Beauregard *et al.*, 1997). Pour survivre, *L. monocytogenes* s'échappe rapidement de sa vacuole de phagocytose en lysant sa membrane grâce à l'action de deux protéines : la listériolysine O et phosphatidyl-inositol phospholipase C (PI-PLC) (Camilli *et al.*, 1993 ; Cossart *et al.*, 1989). La lyse a lieu en une trentaine de minutes (Gaillard *et al.*, 1987 ; Tilney and Portnoy, 1989). Plusieurs expériences démontrent que *L. monocytogenes* module le trafic intracellulaire et retarde la maturation du phagosome en phagolysosome pour survivre au sein des macrophages (Alvarez- Dominguez *et al.*, 1997). Une fois libres dans le cytoplasme, les bactéries entament une phase de multiplication avec un temps de génération d'environ une heure (Gaillard *et al.*, 1987).

Listériolysine O (LLO)

La destruction de la vacuole est principalement due à la LLO codée par le gène *hly* (également appelé *hlyA*).

La sécrétion de la LLO est responsable du phénotype β -hémolytique aisément identifiable sur la boîte de gélose au sang, par la formation d'un halo clair autour des colonies. La LLO appartient à la famille des hémolysines SH-dépendantes dont le prototype est la streptolysine O produite par *S. pyogenes* (Smyth *et al.*, 1978). Cette famille regroupe 18 hémolysines produites par quatre genres de bactéries à Gram-positif, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* et *Listeria*.

Ces toxines possèdent une activité cytolytique, c'est-à-dire qu'elles sont capables de lyser un grand nombre de cellules eucaryotes dont les érythrocytes. Le dosage de l'activité est généralement effectué par la lyse des érythrocytes et la libération de l'hémoglobine qu'ils contiennent. On parle alors d'activité hémolytique.

Pour ce qui concerne les *Listeriae*, plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude de la LLO, pour deux raisons. En effet toutes les souches de *L. monocytogenes* isolées à partir de

prélèvements cliniques, donc virulentes, sont hémolytiques, et toutes les souches de *L. monocytogenes* non hémolytiques, isolées sur des porteurs sains ou de l'environnement, sont avirulentes lorsqu'elles sont testées dans un modèle animal (Gaillard *et al.*, 1986 ; Kthariou *et al.*, 1987 ; Portnoy *et al.*, 1988). La deuxième raison est que ce facteur de virulence est associé à un phénotype facilement identifiable sur boîte de gélose au sang.

La listériolysine O est donc une hémolysine thiol-dépendante, de 58 kDa. Comme toutes les hémolysines thiol dépendantes, elle n'est active que sur les membranes contenant du cholestérol et elle possède une séquence ECTGLAWEWWR localisée vers l'extrémité C-terminale. Les cytolysines de la famille CDC (Cytolysines Dépendantes du Cholestérol) possèdent des structures primaires respectives, hautement conservées. Partant de ce fait, tous les membres de cette famille étaient supposés avoir le même mécanisme d'action. Pourtant une différence majeure distingue la LLO car elle est la seule dont l'activité est optimale à pH acide (Geoffroy *et al.*, 1987). Il a été montré que la leucine en position 461 de la LLO est responsable de cette activité optimale à pH acide (Glomski *et al.*, 2002). Rapidement après l'internalisation, le phagosome contenant *Listeria* s'acidifie (pH compris entre 5.5 et 6) et l'activité de la LLO permet la formation des pores. L'augmentation du pH vacuolaire due à la formation des pores, va progressivement désactiver la LLO (Beauregard *et al.*, 1997 ; Dramsi and Cossart, 2002). Plusieurs évidences montrent que la régulation de l'activité de la LLO en fonction du pH est nécessaire pour empêcher qu'elle perméabilise aussi la membrane plasmique de la cellule hôte (Glomski *et al.*, 2002). Une étude récente a permis de montrer que des bactéries n'exprimant pas la LLO, n'échappe pas efficacement de la vacuole. Le retard de la fusion LLO-dépendante, de la vacuole avec le lysosome permet à la bactérie de passer plus de temps dans les cellules qu'elle pénètre, en lui conférant la connaissance nécessaire à sa défense contre les macrophages (Henry *et al.*, 2006)

La LLO joue aussi un rôle clé dans la signalisation induite dans les cellules infectées par *L. monocytogenes*. Plusieurs voies de signalisation sont en effet activées par une stimulation avec de la LLO, comme l'apoptose (Guzman *et al.*, 1996), la sécrétion d'interleukine-1 dans les macrophages (Yoshikawa *et al.*, 1993) et la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinase) (Tang *et al.*, 1996). La plupart des réponses cellulaires induites par la LLO sont dépendantes du calcium.

Phospholipases et métalloprotéase

Grâce à la LLO mais aussi à l'action de deux autres enzymes appartenant à la famille des phospholipases, *Listeria* parvient à s'échapper de la vacuole. Pendant l'infection, *L. monocytogenes* sécrète deux phospholipases impliquées dans la lyse de la vacuole, la PI-PLC spécifique du phosphatidylinositol (PI), codée par *plcA*, et la PC-PLC (appelée aussi lécithinase) spécifique de la phosphatidylcholine (PC), codée par *plcB* (Geoffroy *et al.*, 1991 ; Grundling *et al.*, 2003 ; Leimeister-Wachter *et al.*, 1991 ; Mengaud *et al.*, 1991c). Cette dernière phospholipase possède une activité optimale pour un pH compris entre 5.5 et 7, elle clive la phosphatidyl-choline, la phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanolamine. La phospholipase C est synthétisée sous forme d'un précurseur immature qui doit être clivé pour engendrer la phospholipase C active. La métalloprotéase Mpl est impliquée dans la maturation de PI-PLC (Raveneau *et al.*, 1992). La PI-PLC joue un rôle dans la lyse de la vacuole primaire de phagocytose et est requise pour la virulence (Camilli *et al.*, 1991 ; Smith *et al.*, 1995). La lécithinase est un facteur de virulence qui est nécessaire pour la lyse de la vacuole à double membrane et pourrait intervenir également dans la lyse de la vacuole primaire (Marquis *et al.*, 1995 ; Smith *et al.*, 1995). Les mutants incapables de synthétiser la phospholipase C s'accumulent dans les vacuoles et ne peuvent pas gagner le cytosol. La métalloprotéase Mpl (codée par *mpl*), de 35 kDa intervient également dans la virulence selon d'autres modalités. En effet, Coffey et ses collaborateurs (2000) ont montré que cette enzyme était capable de dégrader l'actine et que les produits de clivage de l'actine sont aptes à favoriser la croissance de *L. monocytogenes in vitro*.

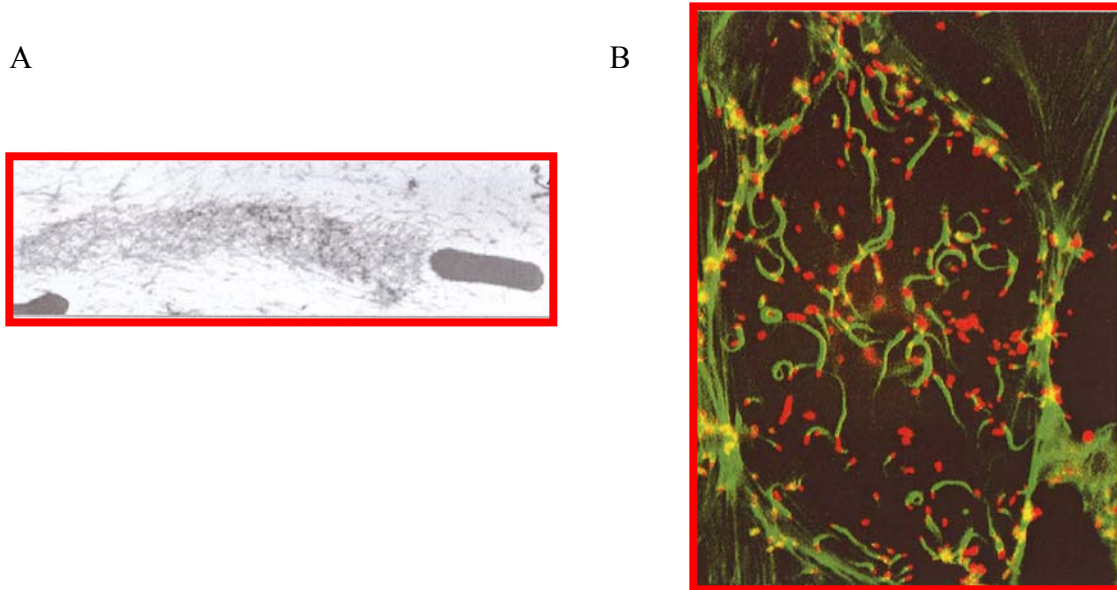
3. Motilité intracellulaire

Une fois libre dans le cytoplasme où elle se divise, *L. monocytogenes* exploite la machinerie cellulaire de l'hôte en recrutant des protéines qui vont être nécessaires à sa motilité. Elle commence à polymériser l'actine cellulaire sous l'action de la protéine bactérienne ActA (Kocks *et al.*, 1992). Les filaments d'actine cellulaire produits par *L. monocytogenes*, forment des « comètes » qui propulsent la bactérie au sein du cytoplasme (Fig. 13).

La comète est constituée de filaments d'actines mais aussi d'autres protéines cellulaires nécessaires à la nucléation et à la polymérisation de l'actine (Gouin *et al.*, 2005 ; Lasa and Cossart, 1996). Cet assemblage polaire génère une force suffisante pour propulser la bactérie dans toutes les directions et la rendre motile à l'intérieur du cytoplasme (Fig. 14)

(Tilney and Portnoy 1989). La vitesse du déplacement, variable selon la nature des cellules infectées, varie de 6 à 90 μm par minute (Kocks *et al.*, 1992).

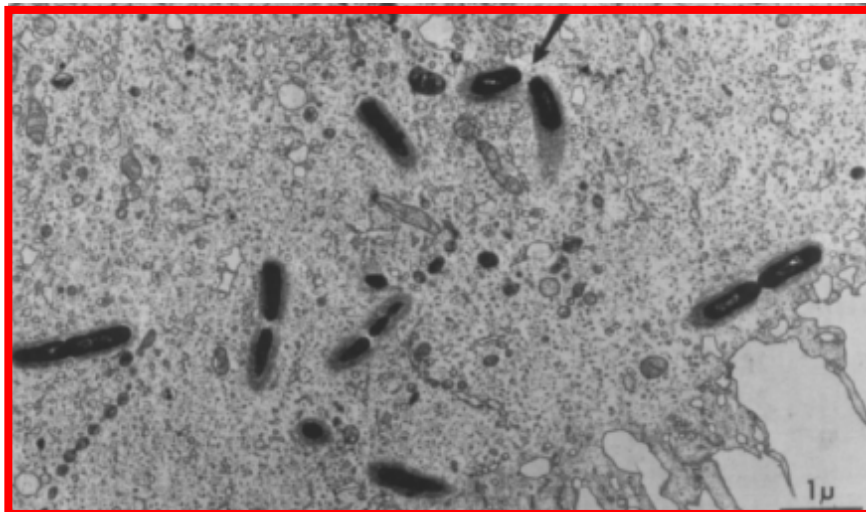
Fig. 13 : Représentation des comètes d'actine en microscopie électronique



A : comètes d'actine en microscopie électronique (Gouin *et al.*, 1999)

B : comètes d'actine de *L. monocytogenes* (Vert : actine, Rouge : bactéries) (Khelef *et al.*, 2006)

Fig.14 : *L. monocytogenes* commençant à développer une queue d'actine, se meut dans toutes les directions dans le cytoplasme de macrophages infectés (Tilney and Portnoy, 1989)



ActA

Le gène *actA* code pour une protéine ActA (Domann *et al.*, 1992 ; Kocks *et al.*, 1992) de 610 acides aminés qui s'ancre dans la membrane bactérienne par son extrémité hydrophobe C-terminale. Ainsi ActA est capable de recruter l'actine cellulaire et d'autres protéines importantes pour la polymérisation d'actine (Lasa *et al.*, 1995 ; Lasa and Cossart, 1996). Les mutants incapables de synthétiser ActA sont invasifs, aptes à lyser les vacuoles mais, ils ne se déplacent pas, n'envahissent pas les cellules adjacentes et leur multiplication dans le cytosol conduit à la formation de microcolonies. D'autres études ont montré que la protéine ActA possède une distribution asymétrique à la surface de la bactérie, elle serait localisée à un pôle cellulaire correspondant au pôle où a lieu la formation de la queue d'actine (Kocks *et al.*, 1993). A cet endroit, ActA est active ; à elle seule, elle est capable de polymériser l'actine car 1) la transfection de cellules eucaryotes avec le gène *actA* provoque la polymérisation de l'actine et 2) l'expression de ActA dans *L. innocua* permet à cette bactérie de polymériser l'actine dans un milieu constitué d'extraits d'œufs de xénopes et de se mouvoir dans ce milieu. Lorsque *L. monocytogenes* se meut, la partie N-terminale de ActA active continuellement un complexe présent au niveau des comètes, le complexe Arp2/3 (Welch *et al.*, 1997 ; Gouin *et al.*, 2005).

Toutefois diverses protéines cellulaires (VASP pour vasodilatator-stimulated phosphoprotein, le complexe Arp2/3 pour actin-related proteins, le groupe cofiline/ADF pour actin depolymerizing factor...) sont impliquées dans la formation des queues d'actine mais les mécanismes intimes sont encore mal connus (David *et al.*, 1998 ; Gouin *et al.*, 1999).

4. Passage de cellule en cellule

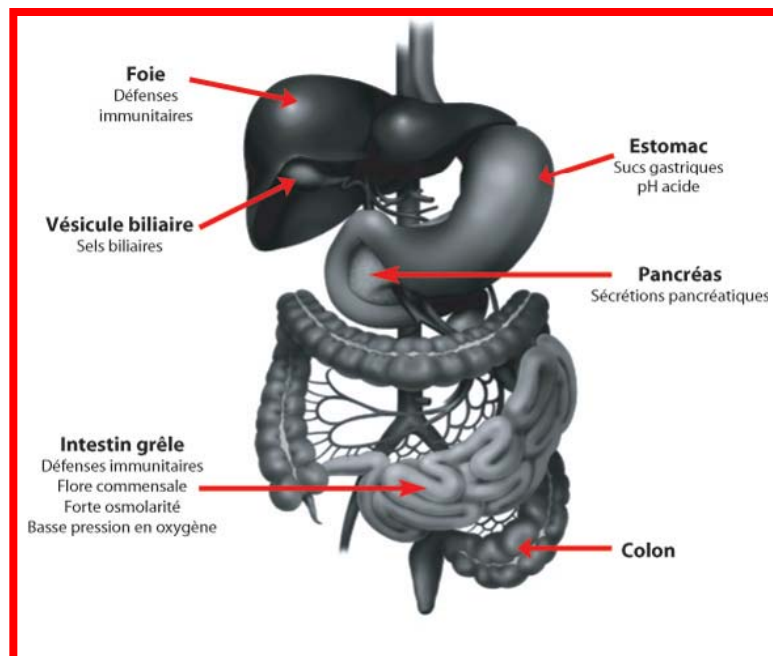
Le déplacement de la bactérie à la périphérie cellulaire entraîne la formation d'une protrusion membranaire qui résulte du contact de la bactérie avec la membrane cellulaire. Si la protrusion atteint la membrane plasmique d'une cellule voisine, la bactérie est alors internalisée dans cette nouvelle cellule. *L. monocytogenes* et une partie de sa comète d'actine sont alors entourées d'une double membrane, la membrane de la protrusion et la membrane de la nouvelle vacuole de phagocytose (Tilney and Portnoy, 1989). Un nouveau cycle de vie intracellulaire débute, où *L. monocytogenes* lyse la double membrane de phagocytose, puis prolifère dans le cytoplasme. La lyse de la double membrane est facilitée par l'action de la LLO et de la PC-PLC bactérienne (Vasquez-Boland *et al.*, 1992).

La capacité de *L. monocytogenes* à se mouvoir intracellulairement en utilisant l'actine de l'hôte et à lyser les vacuoles de phagocytose, sont deux éléments cruciaux pour la survie intracellulaire de cette bactérie. En effet des mutants de *L. monocytogenes* dépourvus d'ActA ou de LLO sont totalement avirulents dans des modèles à la fois *in vitro* et *in vivo* (Gaillard *et al.*, 1986 ; Kocks *et al.*, 1992).

I.6. Régulation de la virulence de *L. monocytogenes*

Nous considérons comme facteur de virulence toute molécule bactérienne « facilitant l'invasion d'une cellule hôte et la multiplication bactérienne au sein de l'hôte » (Casadevall and Pirofski, 1999). Groisman et ses collaborateurs ont défini les facteurs de virulence d'une bactérie pathogène comme étant des effecteurs bactériens requis pour son pouvoir invasif et/ou toxigène (Groisman, 2001b). La plupart des facteurs de virulence de *L. monocytogenes* sont des protéines codées par des gènes dont l'inactivation entraîne une atténuation de la listériose chez l'animal (Dussurget *et al.*, 2004 ; Khelef *et al.*, 2006).

Fig. 15 : Stress rencontrés par *L. monocytogenes* dans l'homme (Gahan and Hill, 2005)



L. monocytogenes est une bactérie saprophyte, capable de coloniser différentes variétés de microenvironnements pas forcément propices à sa croissance et où elle est confrontée à différents types de stress (Fig. 15). C'est pourquoi elle adopte un cycle de vie adapté aux différents paramètres physico-chimiques qui caractérisent chacun de ces

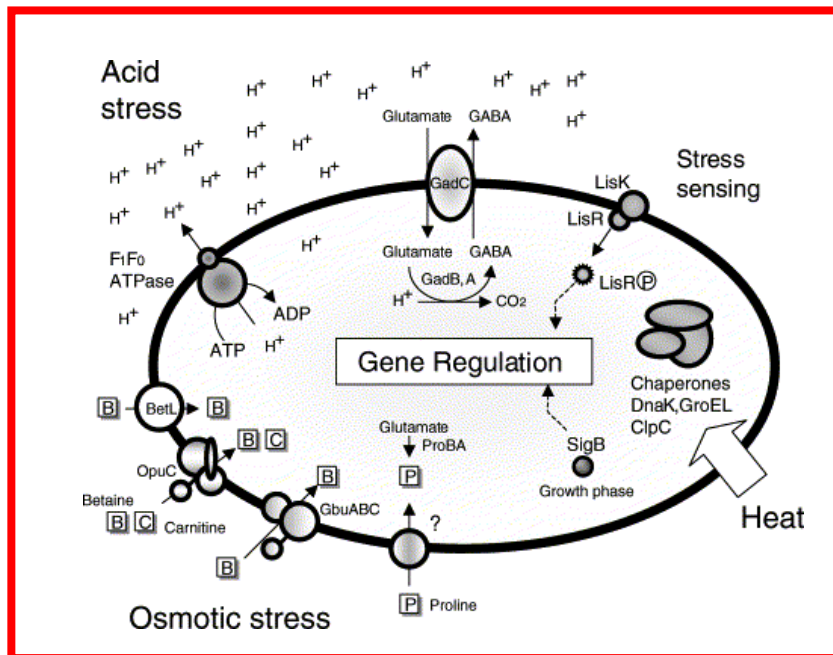
microenvironnements. En effet, elle est capable de survivre en s'adaptant à différents stress comme le lysozyme de la salive, l'acidité de l'estomac, la forte osmolarité et la basse pression en oxygène de l'intestin et des tissus (Gahan and Hill, 2005). Au niveau de l'intestin, *L. monocytogenes* entre en compétition avec la flore résidente, notamment pour les nutriments. Elle doit également se protéger contre l'effet délétère des sels biliaries. Au cours de l'infection et à maintes reprises, *L. monocytogenes* rencontre des macrophages et des neutrophiles, et peut être internalisée dans une vacuole de phagocytose. *L. monocytogenes* est alors exposée à l'acidité du phagosome et à la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces composés pourraient endommager les protéines, les lipides des membranes et l'ADN de *L. monocytogenes* (Miller and Britigan, 1997). De plus, il a été montré que les systèmes qui génèrent les espèces réactives de l'oxygène induisent également un influx de potassium à l'intérieur de la vacuole de phagocytose. Cet influx augmente le pH de la vacuole jusqu'à un pH optimal pour permettre l'activation des protéases. Cette activation joue un rôle prépondérant dans la lyse de *Staphylococcus aureus*, et pourrait être un mécanisme général de défense contre les bactéries pathogènes (Reeves *et al.*, 2002).

Toutefois *L. monocytogenes* peut utiliser les nutriments présents dans le cytoplasme de son hôte pour survivre et se répliquer. Le seul transporteur bactérien impliqué dans ce processus, découvert jusqu'à présent, est l'Hpt (Hexose phosphate transporter). Hpt permet à *L. monocytogenes* d'importer et d'utiliser le glucose-1-phosphate intracellulaire, disponible dans le cytoplasme de la cellule (Chico-Calero *et al.*, 2002). La virulence d'un mutant de *hpt* par insertion d'un transposon est atténuée (Taylor *et al.*, 2002). Récemment il a été démontré qu'*in vivo*, le facteur de virulence Hpt induit le transport de la fosfomycine dans *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* qui semble être résistante à la fosfomycine *in vitro*, est en fait sensible à cet antibiotique *in vivo*, durant l'infection (Scotti *et al.*, 2006). Un autre transporteur appartenant à la classe des ABC transporteurs a été mis en évidence dans le cadre d'une étude permettant d'identifier des gènes préférentiellement exprimés par les *Listeriae* intracellulaires (dans les macrophages). Il s'agit de ArpJ, impliqué dans le transport de l'arginine (Klarsfeld *et al.*, 1994). ArpJ serait impliqué dans la virulence de *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes possède différents effecteurs impliqués dans le processus d'adaptation aux stress environnementaux, parmi lesquels nous distinguons :

- les chaperons comme DnaJ, DnaK, GroEL et GroES impliquées dans la réponse aux stress thermique et acide (Hanawa *et al.*, 1999, Gahan *et al.*, 2001).
- Les chaperons de la famille Clp (Caseinolytic protein) qui interviennent dans le repliement des protéines endommagées par un stress ou alors dans leur protéolyse (Chastanet *et al.*, 2004 ; Derre *et al.*, 1999a ; Gaillot *et al.*, 2000 ; Nair *et al.*, 1999 ; Nair *et al.*, 2000 ; Rouquette *et al.*, 1996 ; Rouquette *et al.*, 1998). En absence de ClpP, la virulence de *L. monocytogenes* est atténuée car moins de LLO active est produite (Gaillot *et al.*, 2000). L'expression de gènes de la famille Clp est sous contrôle du répresseur CtsR (Class three stress gene Repressor) (Derre *et al.*, 1999b), dont la mutation engendre une atténuation de la virulence de *L. monocytogenes* (Karatzas *et al.*, 2003).
- La protéase à sérine HtrA dont l'expression est régulée par un système à deux composants LisR/K impliqué dans la réponse aux changements de l'intégrité de la paroi bactérienne (Sleator and Hill, 2005).
- La ferritine Fri impliquée dans la tolérance au stress oxydatif, dans la régulation du taux d'expression et de la stabilité de plusieurs protéines de stress et de la LLO (Dussurget *et al.*, 2005).
- La Glutamate décarboxylase (Gad) joue un rôle dans la résistance à l'acide et à la survie de *L. monocytogenes* dans l'estomac.
- Les transporteurs d'osmolytes Gbu, BetL et OpuC jouent un rôle dans l'adaptation au stress osmotique en important la glycine bêtaïne, la carnitine et la proline (Angelidis and Smith, 2003b ; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002).
- L'hydrolase des sels biliaires, Bsh, qui est absente chez *L. innocua*, et dont l'expression du gène (*bsh*) est sous contrôle de PrfA et du facteur sigma alternatif σ^B (Dussurget *et al.*, 2002). Dans l'intestin, la tension en oxygène diminue de 4 à 40 fois, par rapport à celle à l'extérieur de l'hôte. L'hypoxie peut être considérée comme un signal reconnu par la bactérie lors du processus infectieux. En conditions d'hypoxie, il a été montré que la Bsh est plus active (Dussurget *et al.*, 2002). Trois autres gènes *pva*, *btlB* et *bilEA/B* codent des protéines impliquées dans la tolérance à la bile (Begley *et al.*, 2005 ; Sleator *et al.*, 2005).

Fig. 16 : Représentation schématique des différents processus de réponse aux stress de *L. monocytogenes* (Hill et al., 2002)



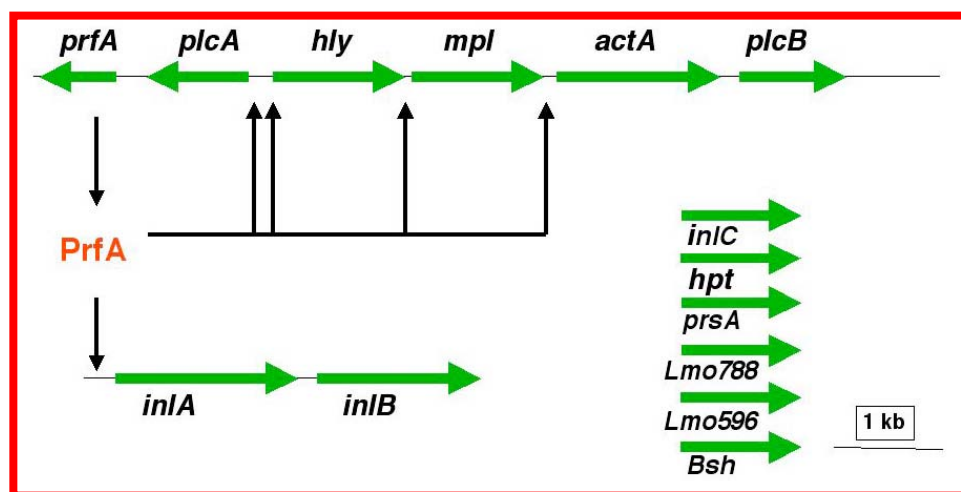
L. monocytogenes a par conséquent développé une large palette de réponses adaptatives qui assurent sa survie au cours des différentes étapes de l'infection (Fig. 16). L'analyse du génome de *L. monocytogenes* a révélé l'existence de plus de 200 gènes codant des protéines régulatrices putatives (Glaser et al., 2001). Parmi les bactéries dont le génome a été séquencé, *L. monocytogenes* possède un génome dont les gènes codant des protéines régulatrices représentent 7% du génome total bactérien, soit la seconde plus grande proportion d'éléments régulateurs après celle de *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%). Cette surreprésentation des gènes régulateurs pourrait être corrélée avec la grande capacité d'adaptation de la bactérie.

I.7. Le régulon *prfA*

La grande partie des facteurs de virulence jouant un rôle dans le processus infectieux sont codés par des gènes situés sur un même locus de 9kb (ou îlot de pathogénicité) parfois nommé LIPI-1 (*Listeria Pathogenicity Island 1*) (Fig. 17).

PrfA identifié suite à l'analyse d'une souche non hémolytique (Leimeister-Wachter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991b), est le régulateur transcriptionnel de l'expression de tous les gènes du LIPI-1, y compris l'expression de son propre gène (Kreft and Vazquez-Boland, 2001; Leimeister-Wachter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991b). Des mutants n'exprimant pas PrfA sont de fait avirulents (Chakraborty *et al.*, 1992). Il a été par la suite montré que PrfA contrôle aussi l'expression d'autres gènes situés sur le chromosome, dont le locus *inlAB* (Fig. 17) (Milohanic *et al.*, 2003; Pearson and Marth, 1990).

Fig. 17. Principaux gènes de virulence de *L. monocytogenes* régulés par PrfA (Milohanic *et al.*, 2003)



La régulation transcriptionnelle des gènes de virulence PrfA-dépendants se fait en contrôlant l'activité de PrfA. Elle dépend de la phase de croissance, de la température, de la disponibilité en sucres rapidement métabolisés tels les β -glucosides, du charcoale activé et du facteur σ^B . Toutefois, d'autres études ont montré que la régulation traductionnelle de ces gènes était aussi importante que la régulation transcriptionnelle (Schnupf *et al.*, 2006). En effet des mutations silencieuses dans *hly* ne modifiant pas sa transcription, mais permettant de surproduire de la LLO (sans toucher au taux d'ARNm de *hly*), ont perdu leur virulence.

PrfA

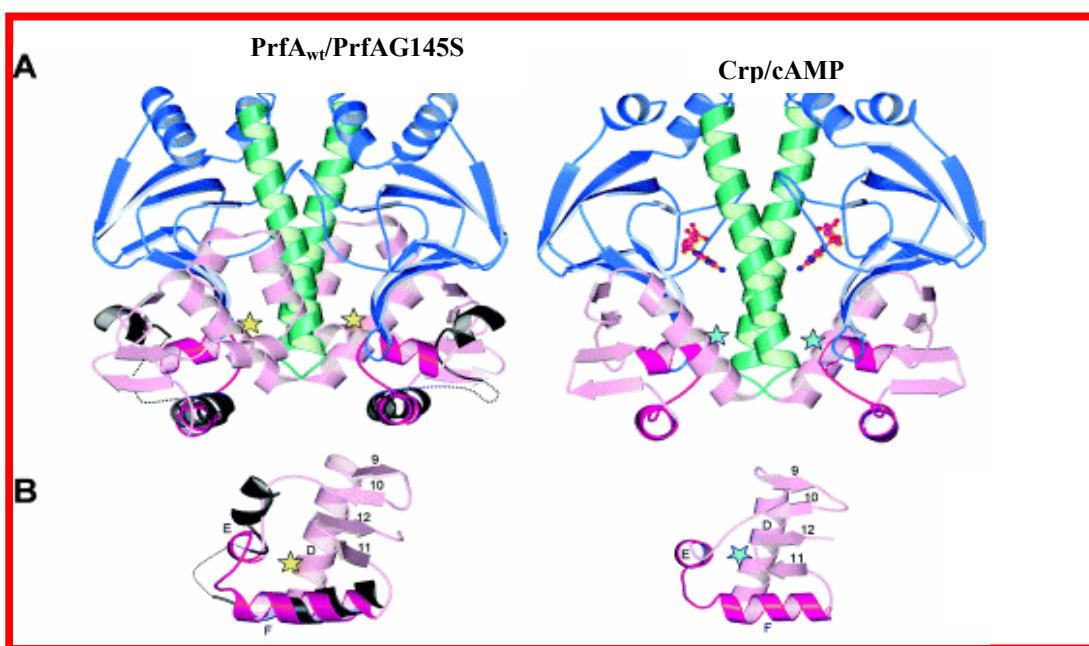
PrfA ou « Positive regulatory factor A » active la transcription des gènes codant les principaux facteurs de virulence comme *inlA*, *inlB*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *hpt* et *bsh* (Bohne *et al.*, 1996)

Bien que l'homologie entre PrfA et la protéine réceptrice à l'AMP cyclique (Crp) d'*Escherichia coli* au niveau de la séquence primaire en acides aminés soit basse (35%), les propriétés fonctionnelles et structurales de PrfA classent clairement cette protéine dans la

famille des régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr (Eiting *et al.*, 2005; Lampidis *et al.*, 1994). Chez *E. coli*, la protéine Crp est impliquée dans la répression catabolique (Kolb *et al.*, 1993) alors que Fnr est le régulateur de la réponse à la croissance anaérobie (Spiro and Guest, 1990). Les régulateurs de la famille Crp/Fnr se fixent sur des motifs spécifiques de la séquence d'ADN *via* leur domaine C-terminal hélice-tour-hélice (HTH) (Fig. 18).

Un dimère de PrfA reconnaît une séquence consensus de 14 paires de bases, la « PrfA box » (Bockmann *et al.*, 2000 ; Dickneite *et al.*, 1998 ; Freitag *et al.*, 1992; Sheehan *et al.*, 1996), localisée en position -41 pb du site d'initiation de la transcription des promoteurs des gènes contrôlés par PrfA (Freitag *et al.*, 1993 ; Lampidis *et al.*, 1994 ; Luo *et al.*, 2004 ; Sheehan *et al.*, 1996) et le site recouvre partiellement la région promotrice -35.

Fig. 18 : Comparaison entre PrfA et Crp d'*E. coli*



A. Les deux facteurs de transcription PrfA et Crp sont représentés avec des domaines colorés orientés de façon similaire. Le motif HTH de PrfA_{wt} est représenté en noir. B. Les motifs HTH sont agrandis et orientés de façon similaire en dessous des structures complètes correspondantes. Les mutations sont représentées par des étoiles jaune pour PrfA_{G145S} et bleu pour CrpA_{144T} (Eiting *et al.*, 2005).

L'utilisation de membranes haute densité portant des séquences ADN correspondant à tous les gènes de *L. monocytogenes* EGD-e a permis d'étudier le profil d'expression des gènes d'une souche mutante de *prfA* comparativement à la souche sauvage. Cette étude globale a

permis de déterminer l'ensemble du régulon PrfA (Milohanic *et al.*, 2003). Trois groupes de gènes différemment régulés par PrfA ont ainsi pu être identifiés. Le groupe I comprend 12 gènes positivement régulés par PrfA, dont 10 codent des facteurs de virulence connus, précédés d'une boîte PrfA (Fig. 17). Le groupe II comprend 8 gènes régulés négativement. Enfin le groupe III comprend 53 gènes dont certains sont précédés d'une boîte σ^B , le facteur σ de stress chez *L. monocytogenes* (van Schaik and Abee, 2005). Néanmoins dans de nombreux cas les effets observés étaient sans doute indirects puisque aucune boîte PrfA n'a été identifiée en amont de nombreux gènes.

La synthèse et l'activité de PrfA sont régulées par plusieurs mécanismes : 1) régulation transcriptionnelle, 2) une thermorégulation de l'ARNm de *prfA* (Johansson *et al.*, 2002), 3) des conditions environnementales qui affectent l'activité de PrfA, indiquant que PrfA aurait recours à un cofacteur pour être fonctionnelle (Ermolaeva *et al.*, 2004 ; Milenbachs *et al.*, 1997 ; Renzoni *et al.*, 1997).

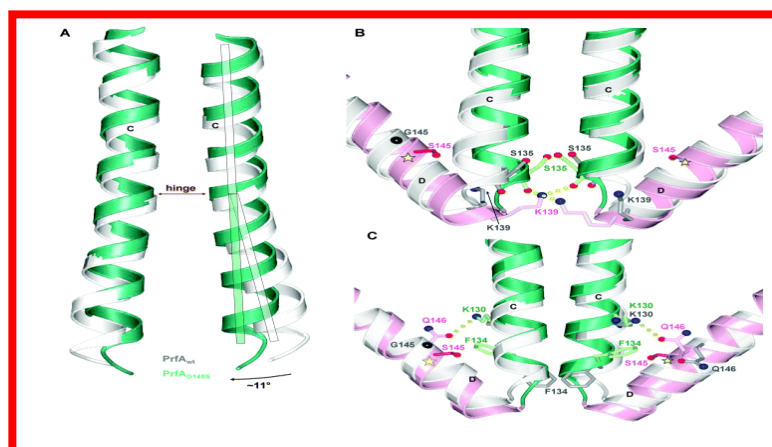
1) Régulations transcriptionnelles de *prfA*

Ainsi la synthèse de PrfA est autorégulée par les promoteurs PrfA-dépendants en amont d'un opéron bi-cistronique comportant les gènes *plcA* et *prfA* (Camilli *et al.*, 1993 ; Freitag and Portnoy, 1994 ; Mengaud *et al.*, 1991). De plus, deux promoteurs P1 et P2, localisés en amont de *prfA* lui-même, transcrivent constitutivement le gène à un faible taux (Freitag *et al.*, 1993 ; Freitag and Portnoy, 1994 ; Nadon *et al.*, 2002 ; Renzoni *et al.*, 1997 ; Vega *et al.*, 1998). Ce faible taux de PrfA est nécessaire à l'activation du promoteur *plcA*.

Des mutations dans des régions spécifiques de *prfA* ont été obtenues (Mueller and Freitag, 2005 ; Ripio *et al.*, 1997 ; Shetron-Rama *et al.*, 2003 ; Vega *et al.*, 1998 ; Vega *et al.*, 2004 ; Wong and Freitag, 2004) et ont conduit à des formes constitutivement actives de PrfA (nommées PrfA*) dont l'activité n'est plus modulée par les facteurs exogènes comme la présence de cellobiose. Parmi celles-ci, nous pouvons distinguer PrfAK122L (comité de thèse, 2004), PrfAG145S (Ripio *et al.*, 1997a) et PrfAE77K et PrfAG155S (Mueller and Freitag 2005). Ces deux dernières formes de PrfA 1) augmentent l'invasion bactérienne au niveau des cellules épithéliales *via* la surexpression de plusieurs gènes PrfA-dépendants (*inlA*, *inlB*, *actA* et *hly*) ; 2) stimulent la sortie des vacuoles des cellules épithéliales et induisent la sortie des vacuoles en absence de LLO ; 3) facilitent l'association des bactéries à l'actine cellulaire de l'hôte (Mueller and Freitag, 2005). Tous ces effets augmentent la

virulence des mutants *prfAE77K* et *prfAG155S* dans un modèle murin (Shetron-Rama *et al.*, 2003). Des souches de *L. monocytogenes* ayant une forme constitutivement active de PrfA, possèdent des phénotypes distincts *in vitro* et *in vivo*. Cela suggère que normalement PrfA se trouve sous une forme inactive ou moins active que celle de PrfA* (Mueller and Freitag, 2005). Le mutant *PrfAG145S* est hyperhémolytique, et présente une virulence accrue due à la surexpression de gènes PrfA-dépendants même dans des conditions avirulentes (basse température, milieu riche) qui régulent négativement ces gènes (Behari and Youngman, 1998 ; Ripio *et al.*, 1997b). Des expériences de retard sur gel ont montré que PrfAG145S possède une affinité vis-à-vis de l'ADN plus élevée que PrfA (Vega *et al.*, 1998 ; Vega *et al.*, 2004). Un overview commentant la structure tridimensionnelle de PrfA a été publié en 2002 (Cossart 2002) alors que la structure tridimensionnelle de la forme PrfAG145S a été récemment résolue (Eiting *et al.*, 2005). Il semble que la substitution de la glycine en position 145 induise un réarrangement conformationnel de PrfA engendrant une stabilisation et un repositionnement du domaine HTH de fixation à l'ADN. Ce résultat suggère que la conformation adoptée par PrfAG145S ressemble à celle adoptée par Crp. Les mécanismes d'induction de Crp et PrfAG145S présentent également de fortes similitudes, ce qui laisse présumer que PrfA aurait besoin d'un cofacteur qui l'activerait. Cette hypothèse est soutenue par la présence dans PrfA et Crp de deux tunnels similaires quoique différemment positionnés. La taille du tunnel laisse présager qu'un cofacteur de petite taille, partiellement hydrophobe et probablement aromatique serait requis pour l'activation de PrfA (Fig. 19) (Eiting *et al.*, 2005). Nous ne pouvons pas toutefois écarter la possibilité que PrfA soit naturellement active et aurait besoin d'un répresseur pour contrôler son activité (Ermolaeva *et al.*, 2004).

Fig. 19 : Changements conformationnels de PrfA induits par la mutation *prfAG145S*

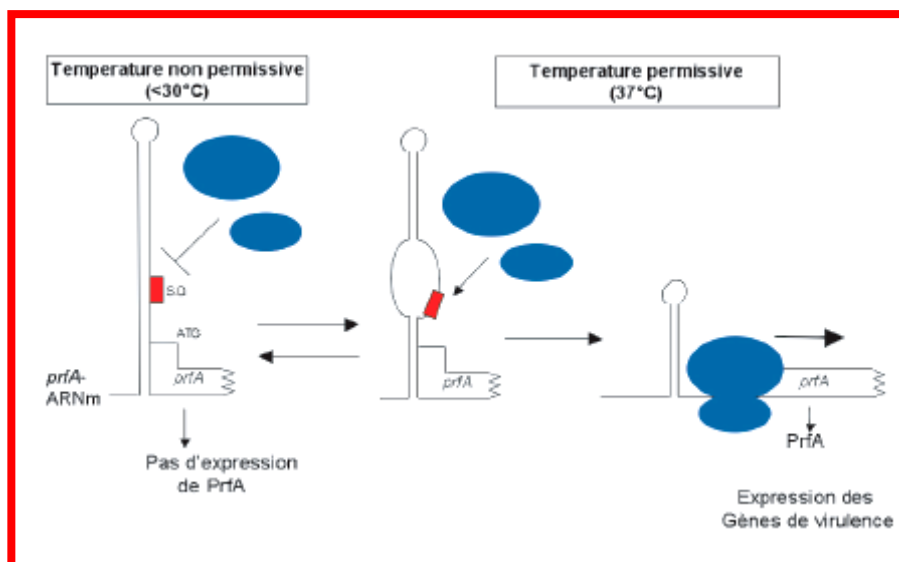


A. Dans la protéine sauvage, l'hélice C contient au milieu une courbure. La mutation G145S diminue l'angle de cette courbure de 11° et par conséquent dans le dimère de PrfA les parties C-terminales de l'hélice C s'approchent significativement.. PrfAG145S est représentée en couleur tandis que PrfA est représentée en gris clair. B. et C. Aminoacides impliqués dans le changement conformationnel.

2) Thermorégulation de *prfA*

L'expression des facteurs de virulence régulés par PrfA, tels que LLO, PI-PLC et PC-PLC, augmente avec la température et est optimale à 37°C, température de l'hôte. Au-dessous de 30°C, les niveaux d'expression de ces facteurs sont faibles et correspondent à une production diminuée de la protéine PrfA. De manière intéressante, le transcrite du gène *prfA* reste détectable dans les extraits bactériens à 30°C (Renzoni *et al.*, 1997). Johansson et ses collaborateurs ont pu montrer qu'à 30°C, la région 5' non traduite du transcrite (appelée 5'-UTR) de *prfA* adopte une structure secondaire en « tige-boucle » qui masque le site de fixation du ribosome (Shine-Dalgarno) (Fig. 20) (Johansson *et al.*, 2002). Le ribosome ne pouvant accéder à l'ARN messager, *prfA* n'est pas traduit, expliquant les niveaux faibles de PrfA à cette température. A des températures plus élevées, la structure secondaire de la région non traduite de l'ARN change et le site de fixation au ribosome est libéré, permettant à la protéine d'être traduite (Fig. 20) (Johansson *et al.*, 2002).

Fig. 20 : Mécanisme de thermorégulation de l'UTR de *prfA* (Johansson *et al.*, 2002)



Cette structure a donc été nommée « thermosenseur ». La fusion de la séquence UTR thermosenseur au gène de la protéine à fluorescence verte (*gfp*) chez *E. coli* permet de

mettre en évidence le même phénomène de thermorégulation de manière ectopique, indiquant que probablement aucun autre cofacteur, protéique ou ARN, n'est requis pour ce type de régulation. Le mécanisme thermosenseur pourrait permettre à *L. monocytogenes* d'utiliser la température comme un signal d'activation de la virulence. Cette régulation post-transcriptionnelle de *prfA* pourrait avoir l'avantage de permettre une expression très rapide du facteur de transcription et donc des facteurs de virulence lorsque la bactérie entre en contact avec l'hôte.

3) Régulations post-transcriptionnelles de *prfA*

La nature des composants chimiques présents dans l'environnement joue aussi un rôle critique dans l'induction de l'expression de *prfA*. La croissance en milieu minimum ou en présence de charbon actif permet une induction du régulon *prfA* (Bohne *et al.*, 1994; Ripio *et al.*, 1997). De manière inverse, la présence dans le milieu de croissance de sucres tels le glucose, le cellobiose, le maltose, le fructose, le mannose ou le tréhalose réprime l'expression des gènes de virulence dépendants de PrfA (Milenbachs *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1992; Ripio *et al.*, 1997). Cette répression n'est pas due à une modification de l'expression de *prfA* (Renzoni *et al.*, 1997). Il a récemment été montré que PrfA a besoin de l'EI et HPr du PTS pour être active (Deutscher *et al.*, 2005; Herro *et al.*, 2005). La structure de la protéine PrfA a récemment été élucidée (Eiting *et al.*, 2005). Cette étude semble confirmer l'hypothèse d'une activation de PrfA par un cofacteur non identifié, de manière similaire aux autres régulateurs de la famille Crp/Fnr.

II. PTS et Répression Catabolique

Face aux différentes niches écologiques qu'elles colonisent, les bactéries possèdent un pouvoir d'adaptation remarquable. D'une part elles sont capables d'utiliser une grande variété de sources de carbone, ce qui implique une adaptation de leurs métabolismes carbonés, d'autre part et afin de maintenir un état physiologiquement actif, les bactéries détectent et s'adaptent aux changements brusques survenant dans leur milieu de croissance. Les systèmes de transport des hydrates de carbone ont une importance cruciale dans ces processus d'adaptation. Il existe ainsi chez les bactéries plusieurs systèmes de transport des hydrates de carbone :

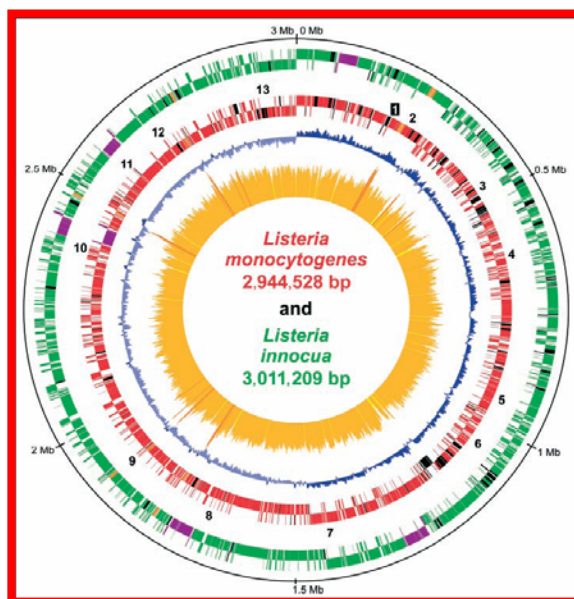
- des systèmes communs aux eucaryotes et procaryotes tels que le symport, l'antiport, l'uniport (diffusion facilitée) et le transport par les « transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) ».
- un système spécifique des bactéries, le système phosphoénolpyruvate-carbohydate phosphotransférase plus communément appelé « PTS » qui constitue le système majeur de transport des sucres.

II.1. PTS

Le PTS est un système enzymatique complexe qui permet le transport et la phosphorylation concomitante de substrats carbonés appelés sucres-PTS (Fig. 21). La nature des sucres-PTS peut varier d'une espèce bactérienne à l'autre. Par exemple, chez certaines souches de *Lactococcus lactis* (de Vos *et al.*, 1990), *Lactobacillus casei* (Chassy and Thompson, 1983) et *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 2003), le transport du lactose est assuré par le PTS, toutefois chez *E. coli*, ce sucre est transporté par une protéine de symport à lactose/H⁺ (Padan *et al.*, 1979 ; Postma *et al.*, 1993), et chez *Staphylococcus thermophilus* par une protéine qui ressemble à une protéine de symport mélibiose/Na⁺ d'*E. coli* (Poolman *et al.*, 1989).

Chez *L. monocytogenes*, 26 % des gènes (soit 88 sur 331) codant des protéines impliquées dans le transport de carbohydrates sont des protéines du PTS. *L. monocytogenes* possède en effet 39 enzymes II (EII) putatives complètes ou incomplètes. Il apparaît donc que *L. monocytogenes* possède environ le double des perméases du PTS d'*E. coli* et le triple de *Bacillus subtilis*. Chez *L. monocytogenes*, 8 EII, dont 5 pourraient être impliqués dans le transport de β-glucosides, sont absents chez *L. innocua* la souche non-invasive, avirulente (Fig. 21) (Glaser *et al.*, 2001). Or, les carbohydrates et plus particulièrement les β-glucosides ont un impact majeur sur la virulence. Tous ces résultats suggèrent que le PTS de *L. monocytogenes* responsable du transport de ces carbohydrates, pourrait jouer un rôle dans la virulence de cette bactérie.

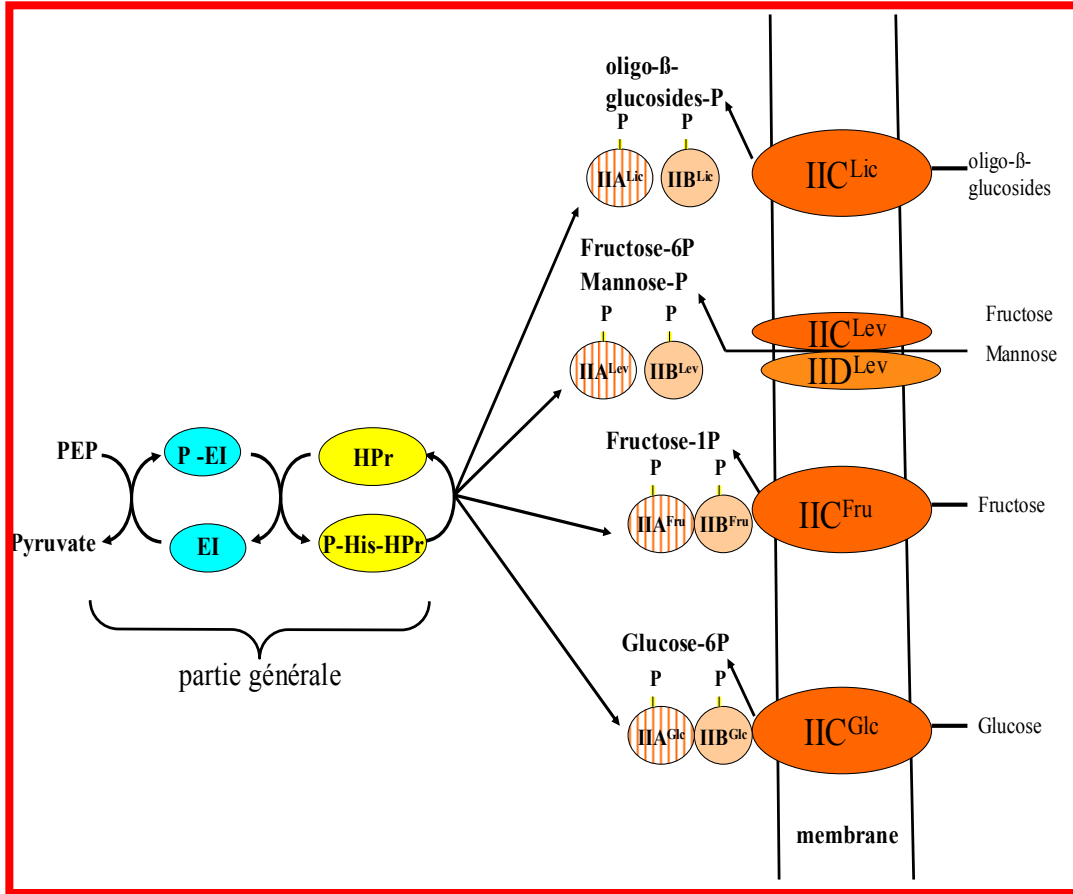
Fig. 21 : Cartes physiques des génomes de *L. monocytogenes* (rouge) et *L. innocua* (vert) (Glaser et al, 2001)



II.2 Historique

Le PTS a été découvert en 1964 chez *E. coli*, par l'équipe de Roseman (Kundig *et al.*, 1964). Au cours des années 70, différentes protéines intervenant dans ce système ont été identifiées. Depuis, le PTS a été mis en évidence chez de nombreuses espèces bactériennes (firmicutes et protéobactéries) (Lengeler and Jahreis, 1996 ; Postma *et al.*, 1993). Il a ainsi fait l'objet de nombreuses études chez les deux organismes modèles que sont *E. coli* (Tchieu *et al.*, 2001), et *B. subtilis* (Deutscher *et al.*, 2002 ; Reizer *et al.*, 1999). Le PTS est constitué de plusieurs protéines qui peuvent être regroupées en deux classes selon leur expression et leur spécificité vis à vis du substrat. Ainsi, en se basant sur ces critères, nous distinguons d'une part les protéines générales du PTS, l'enzyme I (EI) et HPr (Histidin containing Protein) (Fig. 22), et d'autre part les protéines spécifiques d'un sucre donné, les EII.

Fig. 22 : Cascade de phosphorylation et différentes classes du PTS



Le phosphoénolpyruvate (PEP) sert à la fois de donneur de phosphate et de source d'énergie pour le transport. L'EI va d'abord s'autophosphoryler sur l'azote ϵ_2 d'un résidu histidine en utilisant le PEP comme donneur de phosphate, puis phosphoryler la protéine HPr sur l'azote δ_1 de l'histidine en position 15. Ce phosphate est ensuite transféré sur l'azote ϵ_2 d'une histidine d'une enzyme IIA (EIIA), puis transmis aux enzymes IIB (EIIB). Le site de phosphorylation des EIIB est principalement une cystéine mais peut être aussi l'azote δ_1 d'une histidine. La P⁻EIIB phosphoryle le sucre qui pénètre dans la cellule *via* le pore transmembranaire que forme l'enzyme IIC (EIIC) et l'enzyme IID (EIID) (Postma *et al.*, 1993). Ces réactions sont thermodynamiquement réversibles. En revanche, la phosphorylation d'un sucre donné est irréversible. En présence de sucres rapidement métabolisés, les protéines du PTS sont principalement sous forme déphosphorylée (Hogema *et al.*, 1998). Ainsi le PTS fonctionne comme un système de transduction du signal médiée par phosphorylation (Meadow *et al.*, 1990). Le taux de phosphorylation des différents

composants dépend de la disponibilité du sucre à l'extérieur, et de la vitesse de son métabolisme.

II.3. Description des différents composants du PTS

II.3.A. Protéines générales : EI et HPr

EI et HPr sont cytoplasmiques. Elles participent au transport de tous les sucres-PTS.

EI est codée par le gène *ptsI* tandis que HPr par *ptsH*. Ces deux gènes ont été clonés et séquencés chez de nombreuses espèces bactériennes comme *E. coli* (De Reuse *et al.*, 1985), *B. subtilis* (Gonzy-Tréboul and Steinmetz, 1987 ; Gonzy-Tréboul *et al.*, 1989), *Streptococcus salivarius* (Gagnon *et al.*, 1992 ; Gagnon *et al.*, 1993), *Staphylococcus carnosus* (Kohlbrecher *et al.*, 1992), *Mycoplasma capricolum* (Zhu *et al.*, 1994), *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1999), *Lactobacillus sakei* (Stents *et al.*, 1997), *L. casei* (Viana *et al.*, 2000) et *L. monocytogenes* (Christensen *et al.*, 1998). Ils sont souvent organisés en opéron, l'opéron *pts* ou *ptsHI* (Postma *et al.*, 1993). L'organisation des gènes *ptsH* et *ptsI* dans l'opéron *pts* (ou *ptsHI*) a été mise en évidence chez les firmicutes tels que *B. subtilis* (Gonzy-Tréboul *et al.*, 1989), *S. carnosus* (Eisermann *et al.*, 1991), *S. salivarius* (Gagnon *et al.*, 1995), *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1999) et *L. monocytogenes* (Christensen *et al.*, 1998) et plusieurs autres espèces.

Chez les firmicutes, l'opéron *pts* est en général, constitué uniquement des deux gènes *ptsH* et *ptsI* (Vadeboncoeur *et al.*, 2000). Toutefois *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* et *Geobacillus stearothermophilus* font exception à cette règle ; nous constatons chez ces bactéries la présence de deux gènes en amont de *ptsH*, les gènes *ptsT* (Lai and Ingram, 1995) et *ptsG* (Stülke *et al.*, 1997). *ptsT* ou *glcT* coderait pour l'antitermineur GlcT, tandis que *ptsG* code une enzyme IICBA de la classe glucose (Gonzy-Tréboul *et al.*, 1989 ; Zagorec and Postma, 1992). L'opéron *pts* est alors dénommé *ptsGHI* chez les *Bacilli*. Les gènes *ptsH* et *ptsI* sont exprimés de manière constitutive à partir du promoteur précédant *ptsHI*. En revanche, la formation d'un transcrite comprenant *ptsGHI* à partir d'un promoteur localisé en amont du gène *ptsG* est régulée par la disponibilité en glucose via l'antitermineur GlcT (Bachem and Stülke, 1998). Chez *E. coli*, le gène *crr* localisé en aval de *ptsHI* code pour l'EIIA^{Glc} (De Reuse *et al.*, 1984). L'expression de *crr* à partir du promoteur P2 localisé en amont de ce gène est constitutive. Les gènes *ptsI*, *ptsH* et *crr* sont quant à eux transcrits à partir de deux promoteurs P0 et P1

situés en amont de *ptsH*. L'expression de ces gènes à partir du promoteur P0 est régulée d'une part par le complexe Crp-AMPc (Fox *et al.*, 1992), et d'autre part par le glucose *via* le régulateur Mlc (Lee *et al.*, 2000 ; Plumbridge , 1999 ; Tanaka *et al.*, 1999 ; Tanaka *et al.*, 2000). L'expression à partir du promoteur P1 est régulée par le répresseur Cra (appelé anciennement FruR) (Ryu *et al.*, 1995).

Une autre exception étant *M. capricolum*, où le gène *ptsH* est monocistronique (Zhu *et al.*, 1993) alors que les gènes *ptsI* et *crr* sont organisés en opéron à un autre endroit du génome (Zhu *et al.*, 1994). Chez *Streptomyces coelicolor*, le gène *ptsH* est également monocistronique (Butler *et al.*, 1999 ; Parche *et al.*, 1999). Chez *Oceanobacillus iheyensis*, les gènes *ptsH* et *ptsI* sont également séparés.

L. monocytogenes ne suit pas la règle pour autant. Christensen et ses collaborateurs ont étudié non seulement l'organisation opéronique des deux gènes *ptsH* et *ptsI*, mais également leur transcription. Il s'est avéré que ces gènes sont organisés en un seul transcrit dont l'expression requiert la présence de glucose ou d'intermédiaires glycolytiques. La transcription de ces deux gènes diminue avec le pH du milieu. Toutefois, les mécanismes de régulation de la transcription de *ptsHI* restent non élucidés.

La grande similarité de l'opéron *ptsHI* de *L. monocytogenes* avec ceux des firmicutes, suggère des similarités de fonction (Fig. 23, 24). Toutefois l'absence de séquence terminatrice à l'extrémité C-terminal du gène *ptsI*, séquence caractéristique des firmicutes, suggère que la régulation de l'expression de *ptsHI* serait différente entre *L. monocytogenes* et ces bactéries (Christensen *et al.*, 1998).

EI

La phosphorylation de HPr sur son résidu His-15 par l'EI requiert la dimérisation et l'autophosphorylation de EI sur l'histidine de son site actif.

La taille du monomère varie de 62 à 85 kDa selon les espèces bactériennes (Postma *et al.*, 1993). Chez *B. subtilis* et *L. monocytogenes*, le gène *ptsI* code respectivement pour des protéines de 570 et 572 acides aminés et d'environ 63 kDa. Les EI sont conservées sur la totalité de leur séquence d'une espèce à l'autre. Néanmoins, nous constatons une région de plus forte homologie au niveau de l'histidine phosphorylée (l'histidine en position 189 chez *E. coli* (Alpert *et al.*, 1985) et *B. subtilis*, cette région est hautement conservée entre *L. monocytogenes* et *B. subtilis* (Fig. 23)).

Fig. 23 : Alignement des régions entourant l'histidine phosphorylée de *ptsI* de *L. monocytogenes* et *B. subtilis*

<i>L.monocytogenes</i>	QLNRNFVKGFVTDIGGRTS	H	SAIMARSLEIPAVVGTK
<i>B. subtilis</i>	QLNREFVKGFVTDIGGRTS	H	SAIMARSLEIPAVVGTK

Cette histidine est située dans la partie centrale de la protéine, au sein de la séquence signature GGXT(SC)H(STA)X(LIVM)(LIVM)(ASTG) des protéines de la famille PEP (PPS-EI-PPDK) (Nguyen and Saier, 1995). Cette famille est constituée des EI mais aussi de deux autres enzymes interagissant avec le PEP, la phosphoénolpyruvate synthase (PPS) et la pyruvate phosphate dikinase (PPDK). Elles sont toutes les trois phosphorylées sur l'histidine de leur domaine central. Le domaine C-terminal des protéines de cette famille permet l'interaction avec le PEP. Un domaine de fixation à HPr est situé dans la partie N-terminale de EI alors que pour les deux autres protéines de la famille PEP, on trouve un domaine de fixation à l'ATP. L'autophosphorylation de EI aux dépens du PEP se fait uniquement en présence d'ions bivalents et si EI est sous forme dimérique (Kukuruzinska *et al.*, 1982 ; Kukuruzinska *et al.*, 1984 ; Kohlbrecher *et al.*, 1992 ; Missset *et al.*, 1980 ; Seok *et al.*, 1998 ; Weigel *et al.*, 1982). Les études stœchiométriques indiquent que chaque sous-unité du dimère fixe une molécule de phosphate (Ginsburg & Peterkofsky, 2002). Par la suite, le dimère se dissocie en phospho-monomère libérant ainsi l'unité catalytique (Chauvin *et al.*, 1994a ; Chauvin *et al.*, 1994b). Les étapes de dimérisation et de dissociation du dimère sont des processus lents et constituent des étapes limitantes de la chaîne de phosphorylation du PTS (Hubner *et al.*, 1995 ; Seok *et al.*, 1998). La partie C-terminale, qui intervient dans la liaison avec le PEP, est également impliquée dans la dimérisation de la protéine, ce qui rend ce domaine indispensable à l'autophosphorylation. Ce domaine n'est cependant pas nécessaire pour transmettre le phosphate à HPr (Ginsburg & Peterkofsky, 2002). La structure tridimensionnelle de la protéine entière EI de *S. carnosus* a été récemment élucidée à 2.5 Å. La grande distance (supérieure à 35 Å) entre le site actif renfermant l'histidine et le domaine de fixation du PEP suggère qu'un large changement conformationnel devrait avoir lieu durant le processus d'autophosphorylation comme c'est le cas pour la pyruvate phosphate dikinase (PPDK).

HPr

La protéine HPr est monomérique, soluble, dont la taille varie de 9 à 10 kDa (celle de *L. monocytogenes* est de 9.4 kDa). Au cours du transport des sucres-PTS, HPr est

phosphorylée de façon transitoire sur le résidu histidine 15 (Gassner *et al.*, 1977 ; Kalbitzer *et al.*, 1982). La P~His-HPr transfère son groupement phosphate aux différentes EIIA. Chez les firmicutes, outre sa phosphorylation sur l'histidine en position 15, la protéine HPr peut également être phosphorylée sur le résidu sérine 46 par une protéine bifonctionnelle kinase/phosphorylase, l'HPrK/P (Deutscher and Saier, 1983 ; Deutscher *et al.*, 1986). Cette phosphorylation sur la sérine 46 joue un rôle régulateur important (Deutscher *et al.*, 1989 ; Deutscher *et al.*, 1997 ; Reizer *et al.*, 1993). En effet la P-Ser-HPr serait impliquée dans la répression catabolique et dans l'exclusion d'inducteur (Deutscher *et al.*, 1997).

La protéine HPr a été purifiée chez un grand nombre de bactéries (Parche *et al.*, 1999 ; Postma *et al.*, 1993 ; Zhu *et al.*, 1995). Un alignement de séquences de HPr de différentes bactéries à Gram positif et à Gram négatif a permis de mettre en avant une homologie de séquences autour de l'histidine 15 (Reizer *et al.*, 1993). Les protéines HPr des firmicutes présentent également une forte homologie de séquences de part et d'autre de la sérine 46 (Fig. 24).

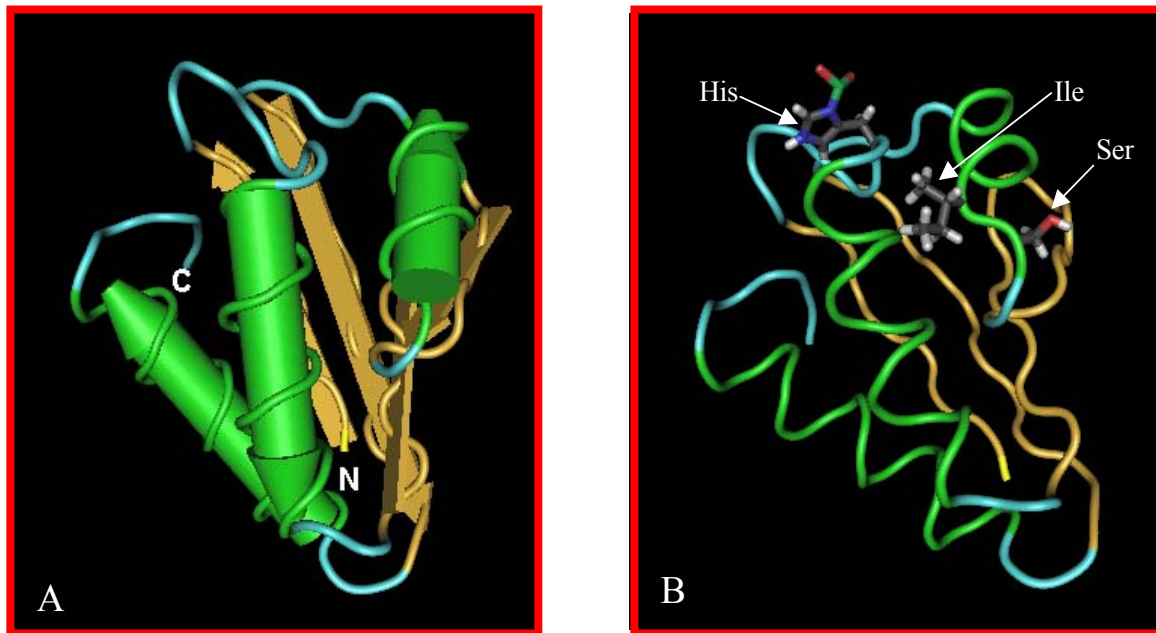
Fig. 24 : Alignement des séquences de HPr (et Crh de *B. subtilis*) chez différentes bactéries

Bactérie à Gram-positif à faible pourcentage en G+C		
<i>L. monocytogenes</i>	DE T GI H AR P ATLL---18	aa---K V N L K S IMGVMSL
<i>B. subtilis</i> HPr	AD S GI H AR P AT V L---18	aa---T V N L K S IMGVMSL
<i>E. faecalis</i>	A E TGI H AR P ATLL---18	aa---S V N L K S IMGVMSL
<i>L. casei</i>	A E TGI H AR P ATLL---18	aa---S V N L K S IMGVMSL
<i>B. subtilis</i> Crh	L K T G L Q AR P AA L E---18	aa---K V N A K S IM G L M S L
consensus	GI H AR P A	
Bactérie à Gram-négatif possédant une HprK/P		
<i>A. ferrooxidans</i>	N R L G L H AR P SA K F---18	aa---R V N G K S IM G L M T L
<i>C. burnetii</i>	N K L G L H ARAA I K L ---18	aa---K V N A K S IM C L H V L
<i>N. meningitidis</i>	N K L G L H ARASS K F---18	aa---R V N G K S IM G V M M L
<i>S. meliloti</i>	N K R G L H ARAS A K F ---18	aa---T V G G T S IM G L M M L
consensus	GL H AR	N S I M G M L
Bactérie à Gram-négatif sans HprK/P		
<i>B. burgdorferi</i>	A V N G L H VR P AST F ---18	aa---S V S G K S L F R L Q T L
<i>E. coli</i>	A P N G L H TR P AA Q F---18	aa A ---S A S A K S L F K L Q T L
<i>H. influenzae</i>	A S N G L H TR P AA Q F---18	aa---S A S A K S L F K L Q T L
<i>Y. pestis</i>	A P N G L H TR P AA Q F---18	aa---S A S A K S L F K L Q T L
consensus	GL H R P A	S K S L F L Q T L

La structure tridimensionnelle de HPr a été établie facilement par RMN compte tenu de sa petite taille. Sa structure a été également déterminée par diffraction aux rayons X. Les structures tridimensionnelles d'HPr d'*E. coli* (el-Kabbani *et al.*, 1987 ; Hammen *et al.*, 1991 ; Jia *et al.*, 1993 ; Klevit and Waygood, 1986 ; van Nuland *et al.*, 1992 ; van Nuland *et al.*, 1994), de *B. subtilis* (Herzberg *et al.*, 1992 ; Wittekind *et al.*, 1990 ; Wittekind *et al.*, 1992), d'*Enterococcus faecalis* (Jia *et al.*, 1994), de *S. aureus* (Kalbitzer *et al.*, 1991 ;

Kalbitzer and Hengstenberg, 1993), et de *S. carnosus* (Kalbitzer *et al.*, 2000) ont été déterminées et permettent ainsi de mettre en évidence l'existence d'une structure relativement conservée entre ces différentes protéines (Jia *et al.*, 1994). Celle de *L. monocytogenes* n'est toujours pas établie. Le mode global de repliement de la protéine HPr est un sandwich β ouvert constitué de 3 hélices α et de 4 feuilletts β organisés selon la topologie $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$. L'histidine en position 15, site de phosphorylation d'HPr par la P~EI, est localisée du côté N-terminal de la première hélice α appelée hélice A. La sérine en position 46, site de phosphorylation par l'HPrK/P est quant à elle située à l'extrémité N-terminal de l'hélice B. Ces deux résidus histidine 15 et sérine 46 sont exposés à la surface de la protéine (Fig. 25).

Fig. 25 : Structure de HPr de *B. subtilis*



L'image A représente les structures secondaires d'HPr. L'image B présente HPr phosphorylée sur son histidine en position 15. La sérine en position 46 est indiquée. Les hélices α , les feuilletts β et les coudes sont représentés en vert, orange et bleu, respectivement. L'extrémité N-terminale est colorée en jaune. Dans l'image A, les extrémités N et C-terminale sont visualisées.

La phosphorylation d'HPr sur l'histidine 15 ne provoque pas de changements majeurs dans la structure globale de la protéine, mais plutôt un changement d'orientation du résidu

histidine. La P~His-HPr s'éloignerait donc des résidus 12 et 18 et se rapprocherait du résidu arginine en position 17 (Rajagopal *et al.*, 1994 ; Waygood, 1998). Le rôle majeur de l'arginine 17 serait donc de positionner correctement HPr permettant ainsi de diriger le groupement phosphate vers l'EIIA (Jones *et al.*, 1997). Il a été d'ailleurs observé que la présence d'une charge positive en position 17 serait essentielle à l'activité d'HPr (Kruse *et al.*, 1993)

La phosphorylation d'HPr sur la sérine 46 n'induit pas non plus des changements de la structure globale de la protéine. Elle aboutit à une stabilisation de la structure et plus particulièrement à une stabilisation de l'hélice B (Audette *et al.*, 2000 ; Pullen *et al.*, 1995). Les résidus histidine 15 et sérine 46 sont relativement proches l'un de l'autre dans la structure tridimensionnelle, et cette proximité pourrait expliquer le fait que la P-Ser-HPr soit un mauvais substrat pour l'EI (Deutscher *et al.*, 1984). En effet la présence d'une charge négative sur la sérine 46, modifiant l'environnement électrostatique proche de ce résidu, aboutirait ainsi à une inhibition des interactions d'HPr avec ses protéines cibles dont notamment l'EI (Napper *et al.*, 1996).

Protéines paralogues à HPr

Plusieurs gènes codant des protéines similaires à HPr ou contenant des domaines HPr-like, ont été identifiés chez différentes bactéries. Le premier gène mis en évidence chez *E. coli* et chez *Salmonella typhimurium* code la protéine DTP (Diphosphoryl Transfer Protein) anciennement appelée FPr (Fructose related HPr). DTP est formée de deux domaines, un domaine HPr-like et un domaine EIIA^{Fru} (Geerse *et al.*, 1989 ; Waygood, 1980). La deuxième protéine possédant un domaine HPr-like est la protéine MTP (Multiphosphoryl Transfer Protein) de *Rhodobacter capsulatus* (Wu *et al.*, 1990). Ces deux protéines sont impliquées dans le transport de fructose. Le troisième gène similaire à *ptsH* code pour la protéine NPr, impliquée dans le métabolisme d'azote (Powell *et al.*, 1995). Le quatrième gène code pour DhaM ; chez *E. coli*, cette protéine possède un domaine central HPr-like, un domaine carboxyterminal similaire à la partie aminoterminal de l'EI et un domaine similaire à l'EIIA^{Man} (Paulsen *et al.*, 2000). DhaM est impliquée dans la phosphorylation de la dihydroxyacétone. Chez *E. coli*, deux autres protéines codées par *frwA*, *fryA* possèdent un domaine HPr-like et appartiennent au PTS de la classe fructose.

Lors du séquençage du génome de *B. subtilis*, une protéine présentant 45% d'identité avec HPr a été mise en évidence. Cette protéine appelée Crh (Catabolite Repression HPr),

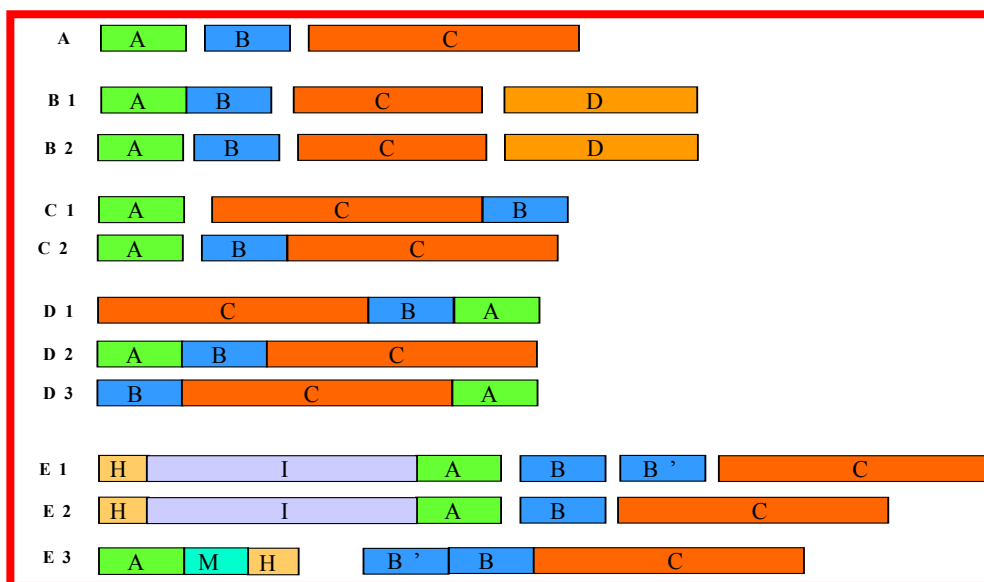
possède une sérine 46. En revanche, l'histidine catalytique en position 15 est remplacée par une glutamine dans Crh. Ainsi, il a été montré que Crh pouvait être phosphorylée sur la sérine 46 par l'HPrK/P en présence d'ATP. Toutefois aucune phosphorylation de Crh par EI n'a pu être mise en évidence (Darbon *et al.*, 2001 ; Galinier *et al.*, 1997; Martin-Verstraete *et al.*, 1999). Cette P-Ser-Crh semble être impliquée dans la répression catabolique et dans l'activation d'un certain nombre de gènes comme *ackA* (Turinsky *et al.*, 1998), *acsA* (Zalieckas *et al.*, 1998), *pta* (Presecan-Siedel *et al.*, 1999) et d'opérons comme l'opéron *xyn* (Galinier *et al.*, 1999), *hut* (Zalieckas *et al.*, 1999), et *lev* (Martin-Vastraete *et al.*, 1999). La comparaison de séquences des protéines HPr et Crh de *B. subtilis* est représentée dans la figure 24. De façon surprenante, ce paralogue à HPr a été retrouvé uniquement chez les Bacillacés proches de *B. subtilis*, à savoir *B. anthracis*, *B. halodurans* et *B. stearothermophilus*, les geobacilles et oceanobacilles. Il est absent chez *L. monocytogenes*.

II.3.B. Enzymes spécifiques du PTS : EII

En plus de EI et HPr, un PTS fonctionnel, nécessite d'autres protéines qui sont impliquées dans le transport d'un seul ou d'un groupe de substrats. Ces protéines appelées enzymes spécifiques du PTS, ou également perméases, sont les EII.

La synthèse de ces complexes enzymatiques est induite par le sucre. Ces complexes sont constituées de plusieurs domaines (ou protéines) fonctionnels appelés IIA, IIB, IIC (et parfois IID). Ces différents domaines peuvent être soit fusionnés entre eux en un seul polypeptide d'environ 630 acides aminés (cas de l'EII^{Mtl} des entérobactéries), soit en plusieurs polypeptides où l'EIIA et EIIB sont parfois fusionnées et solubles alors que l'EIIC et EIID sont des protéines distinctes membranaires (Postma *et al.*, 1993) (Fig. 26).

Fig. 26 : Organisation des différents PTS retrouvés chez *E. coli* et *B. subtilis*



A = EIIA, **B** = EIIB, **C** = EIIC, **D** = EIID, **H** = HPr, **I** = EI, **M** = Protéine à fonction inconnue, **B'** = Duplication de B, **E1**, **E2**, **E3** = PTS de la classe fructose, absents chez *E. coli*

Selon leur spécificité pour le substrat, l'organisation des différentes protéines et l'homologie des séquences des complexes EII, il est possible de regrouper les différents PTS dans 5 grandes classes (Barabote and Saier, 2005) (Tableau 3 et Fig. 26). Les représentants des différents PTS présents chez *E. coli* et *B. subtilis* sont représentés dans le tableau 3 alors que ceux chez *L. monocytogenes* dans le tableau 4.

Classe des PTS		Espèces	Sucres transportés ^(a)	Nombre ^(b)	Organisation des EII au sein des différents PTS ^(c)
Glucose	Glucose	<i>E. coli</i>	Mlt, Glc, Nag,	4	Crr, <i>PtsG</i> (C1); Crr, MalX (C1); NagE (D1); Crr, GlvB, GlvC (A)
		<i>B. subtilis</i>	Glc, Mal, Nag, GlcN	4	<i>PtsG</i> (D1); YpqE?, NagP (C1); GamP (D1); YpqE?, MalP (C1)
	Saccharose	<i>E. coli</i>	Tre, Bgl	3	Crr, TreB (C2); AscF (D3); BglF (D3)
		<i>B. subtilis</i>	Tre, Sac, ABgl	5	YpqE?, SacP (C2); YpqE?, YbbF (C2); YpqE?, TreP (C2); YpqE?, SacX (C2); BglP (D3)
Fructose	<i>E. coli</i>	Fru, Mlt	7	MtlA (D1); FrvA, FrvB (C2); Frx (D2); CmtB CmtA (D3); FruA, FruB (E3); FryA, FryB, FryC (E2); FrwA FrwB, FrwC, FrwD (E1)	
	<i>B. subtilis</i>	Mtl, Man, Fru	3	FruA (D2); MtlA (D1); ManP (D3)	
Mannose	<i>E. coli</i>	Man, Glc, Fru GlcN, Gam, Aga	3	ManX, ManY, ManZ (B1); AgaF, AgaB, AgaC, AgaD (B2); AgaF, AgaV, AgaW, AgaE (B2)	
	<i>B. subtilis</i>	Fru	1	LevD, LevE, LevF, LevG (B2)	
Lactose	<i>E. coli</i>	Cel	1	ChbA, ChbB, ChbC (A)	
	<i>B. subtilis</i>	Bgl, Bma	2	LicA, LicB, LicC (A); YdhM, YdhN, YdhO (A)	
Glucitol	<i>E. coli</i>	Gut	1	GutA, GutB, GutE (A)	
	<i>B. subtilis</i>	-	0		
Galactitol	<i>E. coli</i>	Gat	1	GatA, GatB, GatC (A)	
	<i>B. subtilis</i>	-	0		

Tableau 3 : Protéines des PTS de *E. coli* et de *B. subtilis*

^(a) Les sucres indiqués sont mannitol (Mlt), glucose (Glc), acétylglucosamine (Nag) maltose (Mal) glucosamine (GlcN), β -glucoside (Bgl), tréhalose (Tre), saccharose (Sac), aryl β -glucoside (ABgl), fructose (Fru), mannose (Man), galactosamine (Gam), N-acétylgalactosamine (Aga), cellobiose (Cel), β -mannoside (Bma), glucitol (Gut) et galactitol (Gat). ^(b) Les chiffres indiquent le nombre de PTS présent au sein des différents groupes. ^(c) La lettre et le chiffre entre parenthèse indiquent l'organisation des PTS présentés dans la Fig. 26

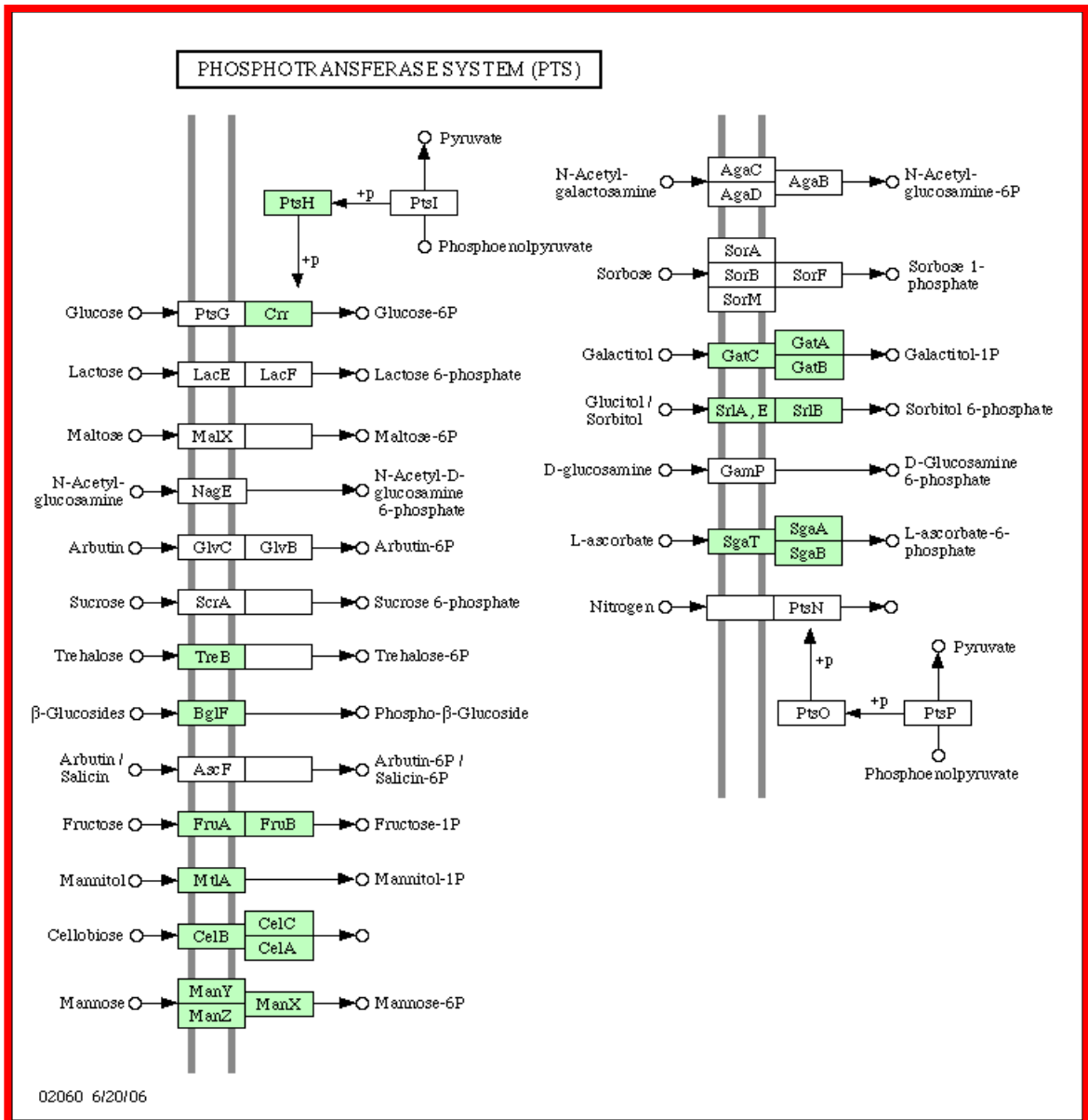


Tableau 4 : Représentation des différents PTS chez *L. monocytogenes*
 Kegg PATHWAY (<http://www.genome.jp/kegg-bin>), d'après Glaser et al., Science 294:849-52 (2001)

Chez *E. coli*, une structure particulière de trois PTS de la classe fructose a été mise en évidence. Les EII de ces PTS sont fusionnés avec des domaines homologues à d'autres protéines dont EI et HPr. Il s'agit de *fruA* (HPr-EI-EIIA), *fruB* (EIIA-M-HPr, M : domaine de fonction inconnue).

Les EII appartenant à un même groupe possèdent normalement au moins 25% d'identité de séquence (Postma et al., 1993). Le nom des différents groupes est attribué en fonction du sucre transporté.

Il est fréquent de retrouver au sein ou dans l'environnement des opérons codant les EII, un gène impliqué dans le métabolisme du sucre transporté par le PTS, ainsi qu'un gène codant un régulateur. Ce régulateur permet généralement l'expression de l'opéron uniquement en présence de son substrat. Certains régulateurs des gènes codant un PTS jouent également un rôle dans le mécanisme de répression catabolique (Deutscher *et al.*, 2002). Deux versions du PTS sont envisageables, soit la version complète (EIIA, EIIB, EIIC (EIID)), soit une version incomplète renfermant des gènes codants des régulateurs ou aussi des gènes impliqués dans le métabolisme du substrat. Dans ce dernier cas, le PTS n'est pas fonctionnel en tant que système de transport (sauf s'il utilise les composants d'un autre PTS de la même classe), mais il exerce certaines fonctions régulatrices se rapportant à ses composants.

Par exemple, certains opérons codant un PTS de la classe glucose, ne renferment pas le gène codant une EIIA. Chez *E. coli*, 4 des 7 PTS de la classe glucose, utilisent la même EIIA^{Glc}, codée par le gène *crr*. Cette EIIA^{Glc} intervient également dans de nombreux autres mécanismes (Postma *et al.*, 1993). De la même manière chez *B. subtilis*, il a été proposé que 6 des 9 PTS de la classe glucose utiliseraient l'EIIA^{Glc} codée par *ypqE* (Deutscher *et al.*, 2002). En se basant sur la séquence du génome de *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001), trois PTS complets pourraient transporter le cellobiose (EIIA^{Cel} = lmo2685, EIIB^{Cel} = lmo2683, et EIIC^{Cel} = lmo2684), (EIIA^{Cel} = lmo2765, EIIB^{Cel} = lmo2762, et EIIC^{Cel} = lmo2763) et (EIIA^{Cel} = lmo2780, EIIB^{Cel} = lmo2782, et EIIC^{Cel} = lmo2783) (Tableau 4). Toutefois il existe un opéron, l'opéron *csr* qui comporte une version incomplète du PTS renfermant un régulateur transcriptionnel LevR-like et deux gènes codant une EIIA^{Cel} et une EIIB^{Cel}. Cet opéron ne peut pas transporter le cellobiose car l'EIIC^{Cel} lui manque. Toutefois, il serait impliqué dans d'autres mécanismes de régulation notamment la levée de la répression des gènes de virulence PrfA-dépendants, exercée par le cellobiose (Fig. 27) (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004). En effet l'inactivation du régulateur transcriptionnel LevR-like se trouvant en amont, lève la répression de l'expression des gènes de virulence, exercée en présence de cellobiose.

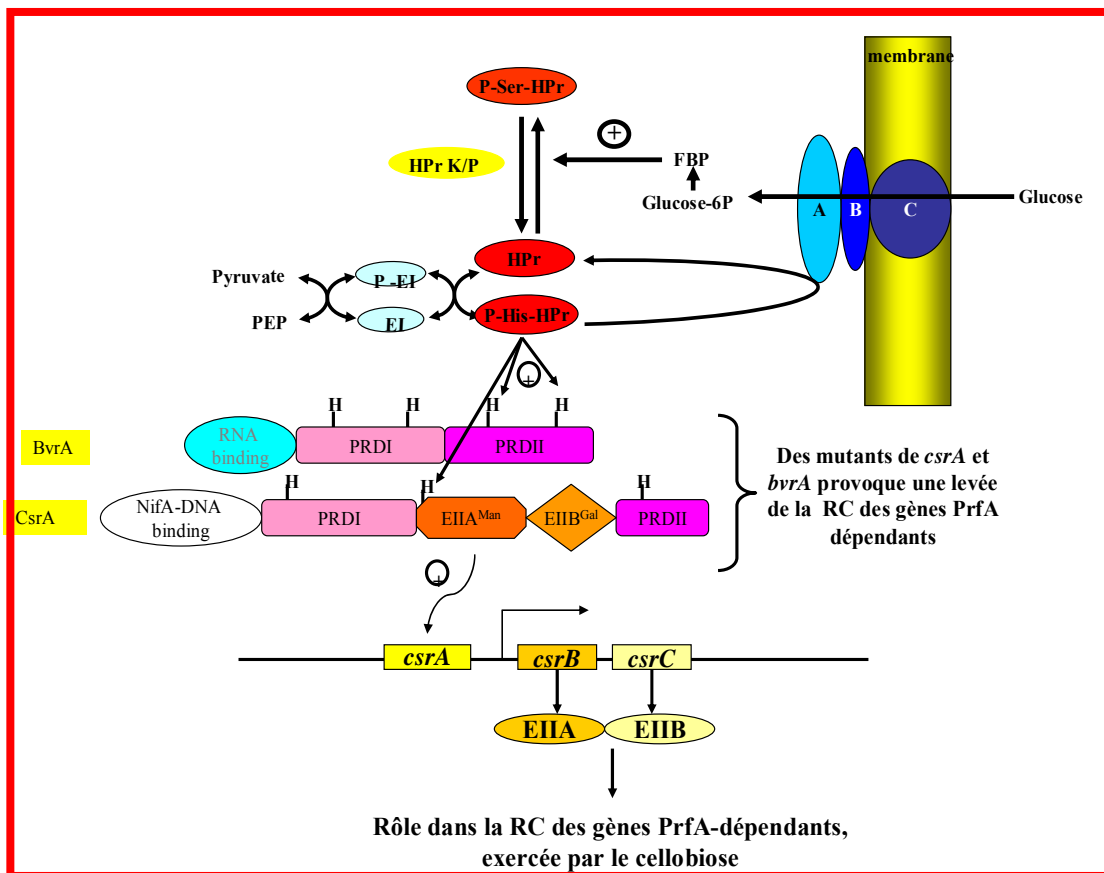
	Structure	Composants du PTS					Substrat
		A	B	C	Enzyme	Régulateur	
<i>L. monocytogenes</i>	R, A, B, C, E	Lmo0074 (109 aa)	Lmo0075 (111 aa)	Lmo0076 (442 aa)	Lmo0077 (243 aa)	Lmo0073 (672 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>	R, A, B, C, E	Lin0072	Lin0073	Lin0074	Lin0075	Lin0071	
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA (35%/103)	LicB(39%/107)	LicC(26%/453)	NagB(20%/240)	LicR(16%/402)	
	B, A, C, E, R	YdhN (36%/93)	YdhM (33%/114)	YdhO(23%/433)	LicH YdhP	YdhA(27%/168)	
<i>L. monocytogenes</i>	R, C, B, E, A	Lmo02780 (103 aa)	Lmo02782 (99 aa)	Lmo02783 (391 aa)	Lmo02781 (757 aa)	Lmo02784 (639 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>	NOT PRESENT						
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA (38%/102)	LicB(46%/98)	LicC(32%/342)		LicK (30%/610)	
	B, A, C, E, R	YdhN (41%/95)	YdhM (40%/100)	YdhO(29%/380)		YdhO	
<i>L. monocytogenes</i>	B, C, A, E, R	Lmo0916 (118 aa)	Lmo0914 (101 aa)	Lmo0915 (423 aa)	Lmo0917 (483 aa)	Lmo0918 (AT) (632 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>	B, C, A, E, R	Lin0917	Lin0914	Lin0916	Lin0918	Lin0919	
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA (26%/102)	LicB(32%/91)	LicC(27%/446)	LicH	LicR(22%/631)	
	B, A, C, E, R	YdhN (26%/94)	YdhM (24%/99)	YdhO(27%/412)	YdhP(29%/495)	YdhO	
<i>L. monocytogenes</i>	R, B, A	Lmo1719 (100 aa)	Lmo1720 (103 aa)			Lmo1721 (692 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>	R, B, A	Lin1630	Lin1631			Lin1632	
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA(59%/96)	LicB(45%/94)	LicC	LicH	LicR (AT) (34%/695)	
	B, A, C, E, R	YdhN (45%/97)	YdhM (36%/113)	YdhO	YdhP	YdhO	
<i>L. monocytogenes</i>	B, C, A	Lmo2695 (100 aa)	Lmo2693 (101 aa)	Lmo2694 (435 aa)			Cellobiose
<i>L. innocua</i>	B, C, A	Lin2633	Lin2631	Lin2632			
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA (51%/97)	LicB(52%/98)	LicC(36%/427)	LicH	LicR	
	B, A, C, E, R	YdhN (36%/97)	YdhM (41%/100)	YdhO(32%/416)	YdhP	YdhO	
<i>L. monocytogenes</i>	E, B, C, A	Lmo2765 (102 aa)	Lmo2762 (100 aa)	Lmo2763 (450 aa)	Lmo2761 (484 aa)		Cellobiose
<i>L. innocua</i>	E, B, C, A	Lin2909	Lin2905	Lin2906	Lmo2904		
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA (36%/101)	LicB(49%/93)	LicC(31%/442)	YckE (60%/468)	LicR	
	B, A, C, E, R	YdhN (35%/96)	YdhM (52%/98)	YdhO(33%/399)	YdhP (35%/485)	YdhO	

<i>L. monocytogenes</i>	A, E, B, C, R	Lmo0301 (114 aa)	Lmo0299 (97 aa)	Lmo0298 (437 aa)	Lmo0300 (463 aa)	Lmo0297 (AT) (615 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>	A, E, B, C, R	Lin0329	Lin0327	Lin0326	Lin0328	Lin0325	
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E	LicA (34%/90)	LicB (37%/97)	LicC (38%/432)	LicH	LicR (24%/60)	
	B, A, C, E, R	YdhN (33%/101)	YdhM (32%/100)	YdhO (27%/418)	YdhP (34%/467)	YdhQ	
<i>L. monocytogenes</i>	R, E, C, B		Lmo0374 (100 aa)	Lmo0373 (444 aa)	Lmo0372 (480 aa)	Lmo0371 (234 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>	R, E, C, B		Lin0383	Lin0382	Lin0391	Lin0390	
<i>B. subtilis</i>	R, B, C, A, E		LicB (52%/97)	LicC (37%/419)	LicH	LicR	
	B, A, C, E, R		YdhM (48%/100)	YdhO (32%/434)	YdhP (56%/462)	YdhQ (37%/236)	
<i>L. monocytogenes</i>	E, C			Lmo0034 (450 aa)	Lmo0033 (801 aa)		Cellobiose
<i>L. innocua</i>	E, C			Lin0033	Lin0032		
<i>B. subtilis</i>				LicC (37%/425)		YdhO (32%/421)	
<i>L. monocytogenes</i>	B		Lmo2373 (104 aa)				Cellobiose
<i>L. innocua</i>	B		Lin2472				
<i>B. subtilis</i>			LicB (58%/67)			YdhM (48%/100)	
<i>L. monocytogenes</i>	C, R			Lmo0901 (428 aa)		Lmo0882 (237 aa)	Cellobiose
<i>L. innocua</i>				Lin0900		Lin0901	
<i>B. subtilis</i>				LicC (31%/434)		LicR	
				YdhO (63%/427)		YdhQ (45%/224)	
<i>L. monocytogenes</i>	C			Lmo2708 (454 aa)			Cellobiose
<i>L. innocua</i>	C			Lin3856			
<i>B. subtilis</i>				LicC (34%/458)		YdhO (34%/452)	

<i>L. monocytogenes</i>	A	Lmo2258 (117 aa)					
<i>L. innocua</i>	A	Lin2360					Cellobiose
<i>B. subtilis</i>		LicA(36%/100) YobM(26%/95)					
<i>L. monocytogenes</i>	B		Lmo1095 (135)				Cellobiose
<i>L. innocua</i>	B		Lin1090				
<i>B. subtilis</i>			LicB(21%/116)				

Tableau 5 : Représentation des PTS de la classe cellobiose chez *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *B. subtilis*

Fig. 27 : Opéron *csr* et *bvr* de *L. monocytogenes*



II.4. Propriétés fonctionnelles du PTS

Outre leur implication dans le transport des sucres, certains composants du PTS exercent diverses autres fonctions.

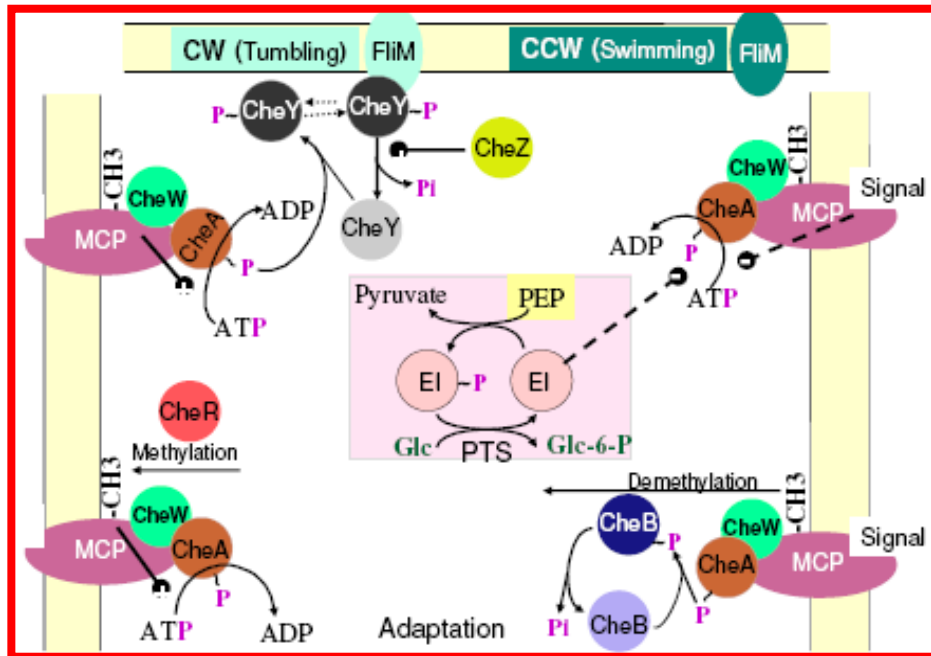
Fonctions de EI

D'un point de vue fonctionnel, à part sa contribution dans le transport des sucres-PTS, l'EI serait impliquée dans la régulation du métabolisme carboné. En effet, Fox et ses collaborateurs ont démontré que chez *E. coli* et *S. typhimurium*, l'EI pourrait être phosphorylée sur son histidine non seulement par la P~His-HPr, mais aussi par l'acétate kinase, enzyme qui catalyse la conversion d'acétate en acétyl phosphate, *via* une phosphorylation ATP ou GTP dépendante. Une fois EI phosphorylée, elle peut à son tour phosphoryler HPr sur son résidu His-15, qui transfère son groupement phosphate vers l'EIIA^{Glc}. Cette réaction de phosphotransfert entre l'acétate kinase et EI est réversible. Elle permettrait de régénérer le pool de PEP (Reizer and Peterkofsky, 1987 ; Fox *et al.*, 1986). Ainsi les auteurs suggèrent que le cycle de Krebs et le PTS sont liés par ce biais. Cependant la vitesse de cette réaction est beaucoup plus faible que l'autophosphorylation de EI à partir du PEP, nous pouvons donc nous interroger sur sa réalité physiologique. Il a été également montré chez *E. coli*, que EI pouvait être phosphorylée réversiblement sur l'histidine de son site actif, par une kinase ATP-dépendante (EI-K), régulée par le NAD⁺/NADH (Dannelly and Roseman, 1992). Ainsi l'ATP et EI-K pourraient remplacer le PEP comme donneur de phosphate dans la cascade de phosphorylation du PTS. De même, comme il s'agit d'une réaction réversible, en absence de NAD⁺, EI-K et ADP empêchent le transport des sucres en déphosphorylant EI. Dannelly et Roseman proposent que cette voie fait le lien entre le PTS et la chaîne de transport des électrons (Dannelly and Roseman, 1996).

L'EI est également impliquée dans la chimiotaxie des sucres, chez *E. coli*. En effet, de nombreux sucres sont perçus par des bactéries motiles telles *E. coli* comme des « chémoattractants », grâce à des récepteurs membranaires. Des molécules chémorépulsantes existent aussi. Les signaux perçus par les récepteurs membranaires sont transduits à la machinerie motrice des flagelles *via* des protéines cytoplasmiques qui sont principalement CheA et CheY. Ces deux protéines forment un système à deux composants : CheA s'autophosphoryle à partir de l'ATP, ensuite transmet son groupement phosphate à CheY. La phosphorylation de CheY induit un changement conformationnel qui lui permet d'interagir avec FliM et de contrôler la machinerie des flagelles, qui change de rotation et d'orientation (Parkinson, 1993). Chez *E. coli*, la machinerie de rotation des flagelles répond à des signaux émis par des substrats transportés par le PTS (Fig. 28). Les sucres-PTS sont perçus lors de leur transport et des expériences *in vitro* ont permis de montrer que l'EI

déphosphorylée était capable d'inhiber l'autophosphorylation de CheA, et par conséquent la phosphorylation de CheY, ce qui conduit à un mouvement « clock wise » des flagelles. La P~EI n'interagit pas avec CheA, CheY est alors phosphorylée, ce qui conduit à un mouvement « tumbling » des flagelles (Lux *et al.*, 1995).

Fig. 28 : Rôle du PTS dans la chimiotaxie chez *E. coli* (Deutscher *et al.*, 2006)



L'analyse de mutants par transposition des gènes *cheY* et *cheA* de certaines souches de *Listeria* a permis de confirmer qu'ils sont impliqués dans la chimiotaxie de cette bactérie (Flanary *et al.*, 1999). Contrairement aux gènes de virulence, la transcription de *flaA*, *cheY* et *cheA* est prononcée à 25°C mais quasi indétectable à 37°C (Dons *et al.*, 1992; Dons *et al.*, 1994). Des mutants de délétion de ces trois gènes montrent une adhésion et une entrée réduite dans certaines lignées cellulaires épithéliales (Caco2). Néanmoins, l'infection de souris par ces mutants ne montre aucune différence de virulence par rapport à la souche sauvage, indiquant que CheY/CheA n'aurait pas de rôle dans la virulence *in vivo* (Dons *et al.*, 1994). Cependant il serait intéressant de voir si le mouvement flagellaire de *L. monocytogenes* serait également régulé par le PTS quoique indirectement.

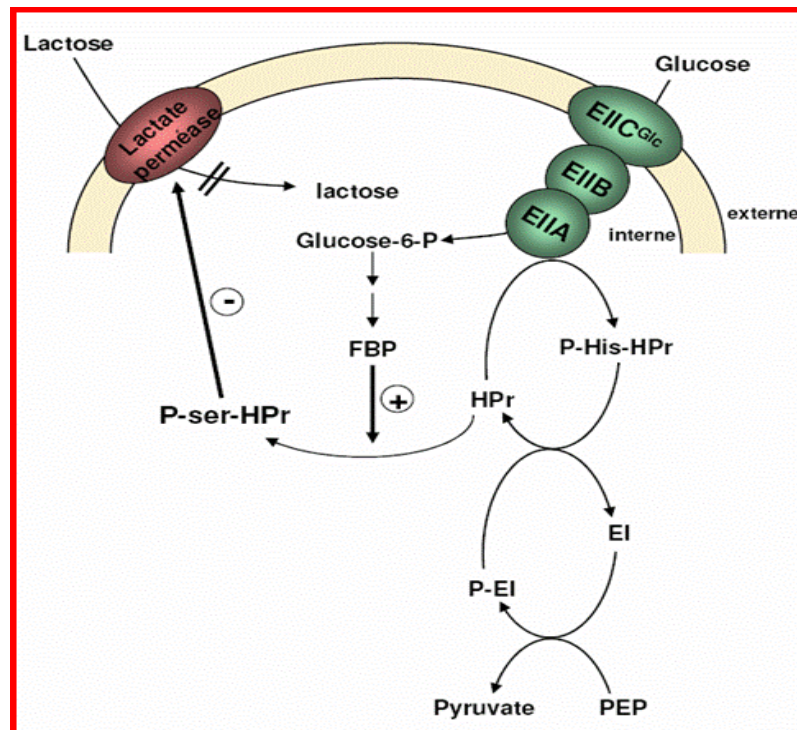
L'EI semble être impliquée dans la virulence de certaines bactéries pathogènes. En effet, Kok et ses collaborateurs ont montré que la délétion du gène *ptsI* entraîne une atténuation de la virulence de *Salmonella enterica serovar typhimurium*, *S. aureus* et *Haemophilus*

influenzae. De manière intéressante, ces travaux suggèrent que le pouvoir pathogène pourrait être corrélé au nombre de PTS (Kok *et al.*, 2003).

Fonctions de HPr, EIIA et EIIB

La P-Ser-HPr est impliquée dans le phénomène de répression catabolique chez les firmicutes (Conférer paragraphe II.6.A). Elle est également impliquée dans le phénomène d'exclusion d'inducteur chez les firmicutes (Fig. 29).

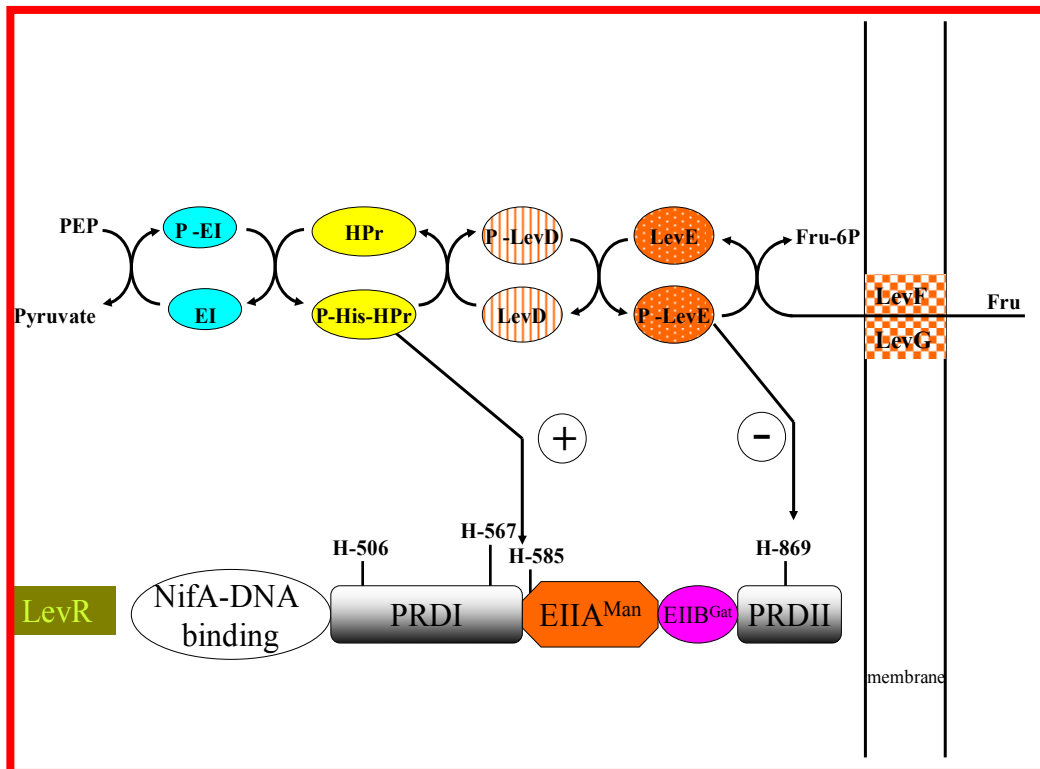
Fig. 29 : Représentation schématique du phénomène d'exclusion d'inducteur chez les firmicutes



Outre leur implication dans le transport des sucres-PTS, la P~His-HPr ainsi que les EII et plus particulièrement EIIA et EIIB, sont impliquées dans de nombreux voies de régulation. Ainsi, ces protéines peuvent exercer un contrôle catabolique. Ce contrôle est lié principalement à la phosphorylation des régulateurs transcriptionnels : les activateurs transcriptionnels comme LevR et LicR (Martin-Verstraete *et al.*, 1998 ; Tobisch *et al.*, 1999), ou des antiterminateurs comme SacT, SacY, GlcT et LicT (Tortosa *et al.*, 1997 ; Arnaud *et al.*, 1996 ; Lindner *et al.*, 1999), par la P~His-HPr ou la P~His-EIIA ou la P~Cys-EIIB. Le taux de phosphorylation de ces régulateurs transcriptionnels et antiterminateurs, dépend de l'état de phosphorylation de HPr, EIIA et EIIB. Ainsi lorsque la capacité de transport par le PTS approche à saturation, la concentration de la forme déphosphorylée de

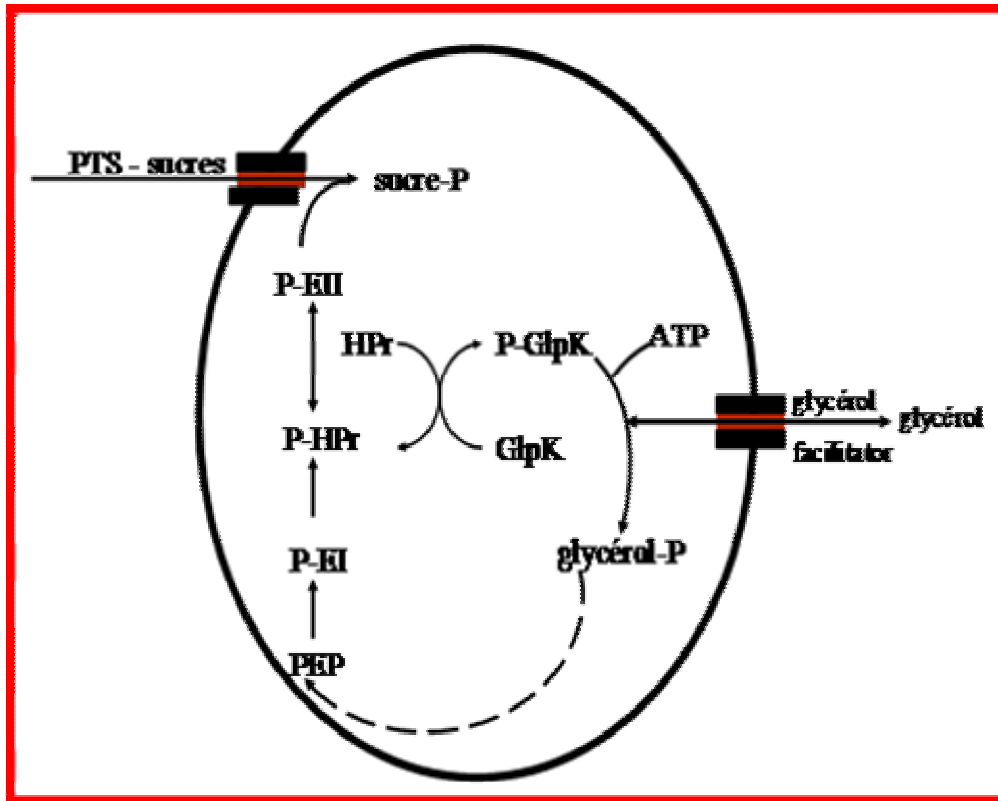
l'EIIA prédomine ; donc moins de P~His-HPr sera disponible pour transférer le groupement phosphate aux effecteurs transcriptionnels. La phosphorylation des régulateurs de la transcription à partir de la P~His-HPr et P~His-EIIA se fait sur leurs domaines conservés dits PRD (PTS Regulation Domain), et peut activer ou inactiver la protéine cible, selon le résidu histidine modifié (Stülke *et al.*, 1998).

Fig. 30 : Rôle du PTS dans la régulation de LevR



Non seulement les régulateurs transcriptionnels sont contrôlés par la phosphorylation PTS-dépendante, mais la glycérol-kinase d'*E. faecalis*, *Enterococcus casseliflavus* et *B. subtilis*, une enzyme qui aiguille le glycérol vers la glycolyse, est aussi activée par une phosphorylation PTS-dépendante (P~His-HPr-dépendante) (Charrier *et al.*, 1997 ; Darbon *et al.*, 2002 ; Deutscher *et al.*, 1986 ; Deutscher and Sauerwald, 1986) (Fig. 31)

Fig. 31 : Rôle du PTS dans la régulation de la glycérol-kinase



La P~EIIA^{Glc} est également impliquée dans le phénomène d'exclusion d'inducteur chez les entérobactéries (Fig. 32).

Nous pouvons constater que le PTS ne permet pas seulement le transport des sucres, c'est également un système de transduction de signal médiée par phosphorylation (Meadow *et al.*, 1990). Il semble être relié à d'autres systèmes de signalisation intracellulaire (Tableau 6) tels que :

- Rôle dans la répression catabolique et l'exclusion d'inducteur chez les firmicutes *via* la P-Ser-HPr.

- Rôle dans la répression catabolique chez les entérobactéries. La P~His-EIIA en activant l'adénylate cyclase, augmente le taux intracellulaire d'AMPc, qui va interagir avec la protéine Crp afin de contrôler la transcription des opérons cataboliques.

- Contrôle de l'activité de la glycérol kinase par la P~His-HPr chez les firmicutes (Charrier *et al.*, 1997b)

- Contrôle d'activateurs transcriptionnels tels LevR (Charrier *et al.*, 1997a ; Martin-Verstraete *et al.*, 1998) ou aussi d'antiterminateurs tels LicT et SacY chez les firmicutes et les protéobactéries (Arnaud *et al.*, 1992 ; Arnaud *et al.*, 1996 ; Tortosa *et al.*, 1997).

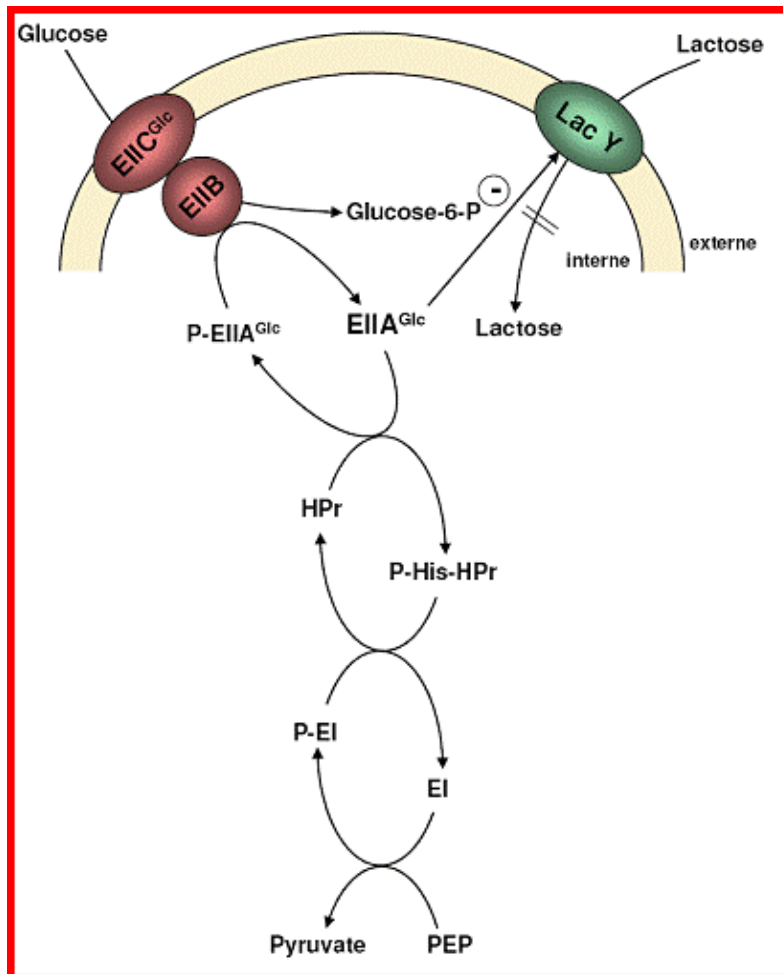
-Rôle dans la chimiotaxie et le transport d'électrons chez *E. coli*

-Rôle dans la virulence de *S. enterica*, *S. aureus* et *H. influenzae* (Kok et al., 2003).

-Rôle dans la virulence de *Neisseria meningitidis* : une délétion de *ptsH* réduit l'adhésion de cette bactérie aux cellules de l'hôte (communication orale Sandrine Poncet, MGM).

Il semble qu'il existe un lien entre PTS, répression catabolique et virulence. Nous avons cherché à trouver ce lien chez *L. monocytogenes*.

Fig. 32 : Représentation schématique du phénomène d'exclusion d'inducteur chez les entérobactéries



PTS Component	Non-PTS Phosphorylation/ Interaction Partner	Phosphorylation or Interaction	Effect of Phosphorylation or Interaction
EI <i>E. coli</i>	CheA, chemotaxis protein	Interaction	Stimulates CheA Autophosphorylation
P~ EI <i>B. subtilis</i>	CheA, chemotaxis protein	Interaction	Inhibits CheA Autophosphorylation
HPr <i>E. coli</i>	Glycogen Phosphorylase	Interaction	Stimulates Glycogen Phosphorylase Activity
P~ His-HPr <i>E. coli</i>	Glycogen Phosphorylase	Interaction	Prevents Binding of HPr to Glycogen Phosphorylase
P~ His-HPr	Antiterminators, BglG, SacY, LicT, etc.	Phosphorylation in PRD2	Stimulates Antitermination ^b , Alternate CCR Mechanism
	Transcription Activators, LevR-like	Phosphorylation in the EIIA ^{Man} Domain	Stimulates Transcription, Alternate CCR Mechanism
	Transcription Activators, Mtr-like	Phosphorylation in PRD2	Stimulates Transcription, Alternate CCR Mechanism
	Transcription Activators, LicR-like	Phosphorylation in PRD1 and PRD2	Stimulates Transcription, Alternate CCR Mechanism
P~ His-HPr (Firmicutes)	Glycerol Kinase GlpK	Phosphorylation, His in the N-Terminal Half	Stimulates GlpK activity Inducer Exclusion
	LacS, RaffP; Transporters for Lactose, Raffinose	Phosphorylation in the EIIA ^{Glc} Domain	Stimulates Substrate/ Galactose Exchange
P~ Ser-HPr (Firmicutes)	CcpA	Interaction	CCR or CCA, Catabolite Co-Repressor
	Non-PTS Transporters for Maltose, Ribose, etc.	Interaction	Inducer Exclusion ^c
	RbsR	Interaction	Physiological Role not yet Established
P~ Ser-Crh, (Bacilli)	CcpA	Interaction	CCR or CCA, Catabolite Co-Repressor
EIIA ^{Glc} , Enterobacteria	Non-PTS Transporters: LacY, MalK, MelB	Interaction	Inducer Exclusion
	Glycerol Kinase, GlpK	Interaction with the C-Terminal Domain	Inducer Exclusion
	Fermentation Respiration Switch Protein, FrsA	Interaction	Probably Causes Increased Respiration
P~ EIIA ^{Glc} , Enterobacteria	Adenylate Cyclase	Interaction	CCR, Activation of Adenylate Cyclase ^d
P~ EIIA ^{Dha}	DhaL, L Subunit of Dihydroxyacetone Kinase	Phosphoryl Transfer	ADP Bound to DhaL is Converted into ATP
EIIB ^{Glc} , Enterobacteria	Mlc	Interaction	Derepression of Genes of the Mlc Regulon
P~ EIIBs, Glc/ Sac/ Lac class	Antiterminators, BglG, SacY, LicT, etc. ^a	Phosphorylation in PRD1 ^e	Inhibits Antitermination, Induction Mechanism
P~ EIIBs, Man/ Lac class	Transcription Activators, LevR-like	Phosphorylation in PRD2 ^e	Inhibits Transcription, Induction Mechanism
P~ EIIBs, Mtl/ Gut class	Transcription Activators, Mtr-like	Phosphorylation in the EIIA ^{Mtl} domain ^e	Inhibits Transcription, Induction Mechanism
P~ EIIBs, Lac/ Cel class	Transcription Activators, LicR-like	Phosphorylation in the EIIA ^{Mtl} domain ^e	Inhibits Transcription, Induction Mechanism

Tableau 6 : Les composants du PTS avec leurs partenaires non-PTS, interactants ou cibles de phosphorylation (Deutscher et al., 2006)

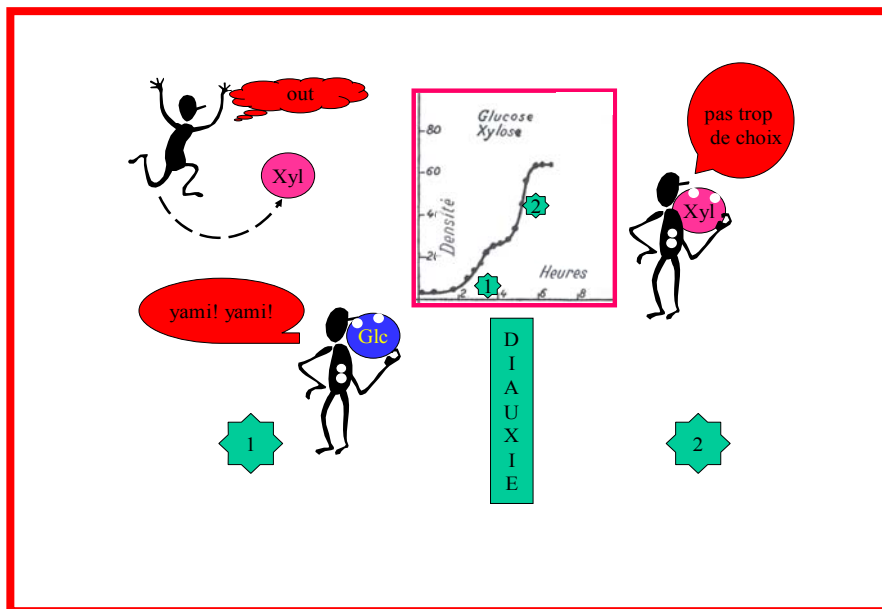
II.6. Répression catabolique

En fonction de la source de carbone présente dans le milieu, les bactéries adoptent un métabolisme leur permettant de cataboliser ce sucre pour assurer leurs besoins énergétiques et leur croissance.

Toutefois, lorsque deux ou plusieurs sources de carbone se retrouvent à la fois dans le milieu, les bactéries mettent en oeuvre des mécanismes leur permettant d'utiliser le substrat le plus rapidement métabolisable et gardent en veille le mécanisme de métabolisation de la deuxième source carbonée. Ce phénomène a été décrit en 1900 chez la levure et un peu plus tard chez les bactéries. En 1942, Monod a découvert la croissance biphasique qu'il appela « diauxie » et s'est aperçu qu'il s'agissait d'un phénomène de répression catabolique (Monod, 1942). Il a montré la capacité de la bactérie à choisir parmi les sucres présents dans le milieu et à utiliser d'abord ceux qui sont plus rapidement métabolisables. Ainsi pour économiser de l'énergie, les bactéries régulent l'expression de l'ensemble de leurs gènes, de manière à ce qu'ils soient exprimés uniquement en cas de besoin pour la cellule.

En effet, *B. subtilis* cultivée dans un milieu contenant du glucose et du xylose, utilise d'abord le glucose (Fig. 33), phase correspondant à une croissance exponentielle. Une fois le glucose épuisé, la croissance s'arrête temporairement, permettant à la bactérie d'adapter son métabolisme, et synthétiser les enzymes nécessaires à l'utilisation du xylose. La croissance reprend ensuite, ce qui correspond à une deuxième phase exponentielle, nourrie par le xylose.

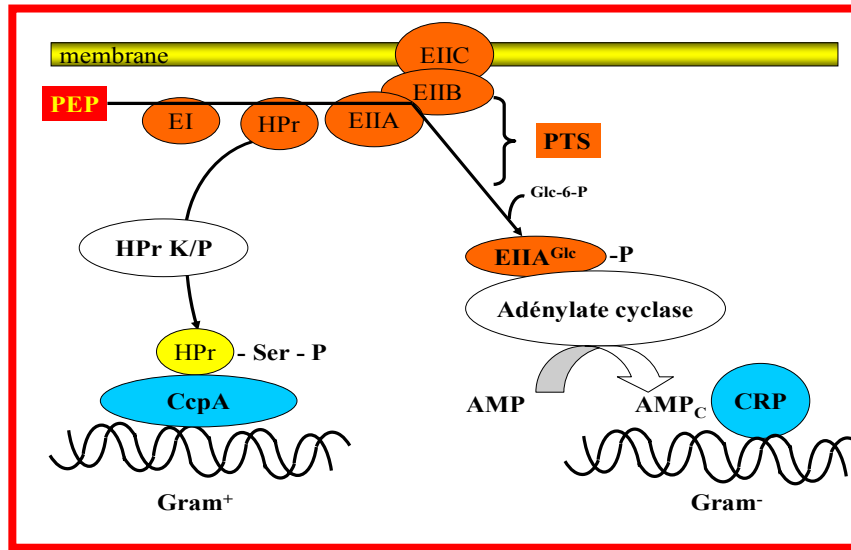
Fig. 33 : Croissance d'*E. coli* sur milieu supplémenté avec du glucose et du xylose (adaptée d'après Monod, 1942)



Le phénomène de diauxie a été également décrit chez *L. monocytogenes*. Gilbreth et ses collaborateurs ont démontré que les métabolismes de l'arbutine, l'arabitol, le cellobiose, le mannose, le maltose, le tréhalose, et la salicine sont respectivement réprimés en présence de glucose. Seulement lorsque le glucose est consommé, les autres sucres fermentent (Gilbreth *et al.*, 2004).

Partant du principe d'utilisation préférentielle d'un sucre donné et de l'inhibition des enzymes impliquées dans l'utilisation d'autres sources de carbone, Monod a classé les sucres en deux catégories : les sucres les plus rapidement métabolisables comme le glucose, le fructose, et le mannose, et les sucres lentement métabolisables comme le lactose, le xylose, le glucitol, l'arabinose, et l'inositol, ... Lorsque la bactérie utilise un sucre rapidement métabolisable, elle inhibe la synthèse (et l'activité *a fortiori*) des perméases transportant d'autres sucres catabolisés ; les gènes du métabolisme carboné primaire codant les protéines nécessaires au catabolisme des sucres rapidement métabolisables, sont activés, alors que les gènes du métabolisme carboné secondaire sont réprimés. Ce phénomène régulateur, exercé au niveau de l'expression des gènes et de l'activité enzymatique a été dénommé « Régulation Catabolique » (Saier *et al.*, 1995 ; Galinier *et al.*, 1998 ; Reizer *et al.*, 1998). La terme « régulation catabolique » renferme à la fois l'activation et la répression des gènes. Dans ce travail, nous désignerons par RC, la répression catabolique, et AC l'activation catabolique. La bactérie hiérarchise l'utilisation des sucres *via* la RC qui intervient au niveau transcriptionnel (Weickert and Chambliss, 1990). En plus de son rôle important dans l'utilisation des sources de carbone, la RC influence divers aspects de la physiologie cellulaire chez les bactéries à Gram-positif et négatif (Fisher and Sonenshine, 1991 ; Saier *et al.*, 1996). L'expression des facteurs de virulence chez différentes bactéries pathogènes (Busque *et al.*, 1995 ; Martinez-Cadena *et al.*, 1981 ; Smith *et al.*, 1986), ainsi que d'importants processus du développement comme l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis* (Fisher and Sonenshine, 1991 ; Schaeffer *et al.*, 1965) sont contrôlés par la RC. Cependant le mécanisme de RC diffère entre les firmicutes et les protéobactéries. Il fait intervenir des composants différents : chez les firmicutes, la RC est médiée par HPr, HPrK/P, CcpA (Control catabolite protein A) et les sites *cre* (catabolite responsive element), alors que chez les entérobactéries, elle met en œuvre l'EIIA^{Glc} et le complexe AMPc-Crp (Fig. 34).

Fig. 34 : RC des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif

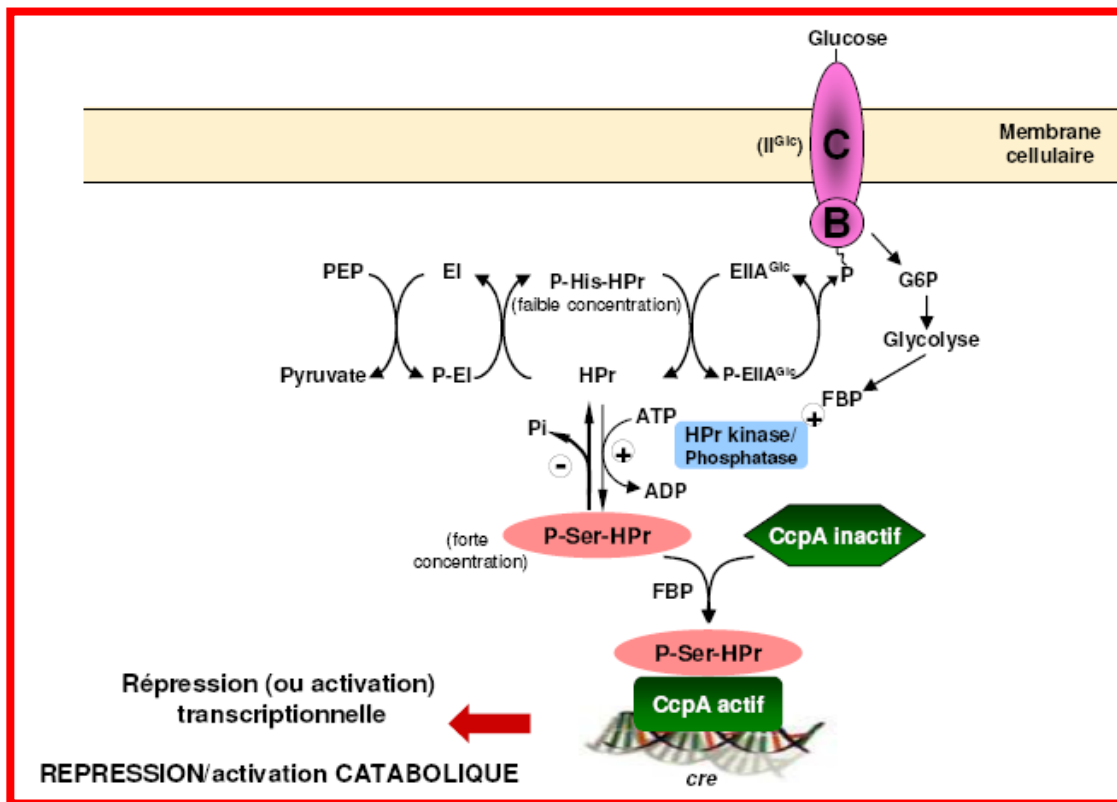


II.6.A. Répression catabolique chez les firmicutes

En présence d'un sucre-PTS comme le glucose dans le milieu extracellulaire, le glucose sera transporté à l'intérieur de la bactérie *via* le PTS qui assure également sa phosphorylation ; le glucose pénètre donc à l'intérieur de la bactérie sous forme de glucose-6-phosphate (G6P). Les concentrations cellulaires des intermédiaires glycolytiques augmentent rapidement (Mijakovic *et al.*, 2002 ; Neves *et al.*, 1999). En effet, le G6P intègre la glycolyse, et les réactions cataboliques nécessaires pour déclencher la RC (Lopez and Thoms, 1977), mènent le sucre importé au stade fructose-1,6-biphosphate (FBP). Le FBP stimule la fonction kinase de l'HPK/P (Galinier *et al.*, 1998 ; Jault *et al.*, 2000). En présence de FBP, l'HPK/P permet une phosphorylation ATP-dépendante de HPr sur sa sérine 46. La formation de la P-Ser-HPr ralentit l'entrée du sucre (feedback inhibition), car l'aptitude de la P-Ser-HPr à participer dans la cascade de phosphorylation du PTS est très faible (Deutscher *et al.*, 1984), ceci dit car la P-Ser-HPr est un mauvais substrat pour l'EI. Détournée de la cascade de phosphorylation du PTS, la P-Ser-HPr interagit spécifiquement avec la protéine CcpA, un membre de la famille des répresseurs LacI/GalR (Deutscher *et al.*, 1995 ; Henkin *et al.*, 1991 ; Jones *et al.*, 1997 ; Weickert and Adhya, 1992). Le complexe CcpA/P-Ser-HPr reconnaît des sites spécifiques de l'ADN cible (Fujita *et al.*, 1995 ; Kraus and Hillen, 1997 ; Weickert and Adhya, 1992) qu'on appelle les sites « *cre* » (Nicholson and Chambliss, 1985 ; Nicholson *et al.*, 1987). En effet, selon la localisation du site *cre*, le complexe CcpA/P-Ser-HPr agit soit comme répresseur soit comme activateur de

la transcription (Fig. 35). Chez *B. subtilis*, il y aurait donc potentiellement plus de 400 gènes soumis à la RC ou à l'AC, soit 10% des gènes contenus dans le génome de *B. subtilis*, ce qui montre l'importance de ce mécanisme. Parmi ces gènes, un très grand nombre appartient au métabolisme du carbone (transport et métabolisme intracellulaire) et au système membranaire de production d'énergie. Mais CcpA médierait aussi la régulation d'autres fonctions comme la sporulation, la chimiotaxie, le métabolisme des acides nucléiques et des coenzymes (Moreno *et al.*, 2001).

Fig. 35 : Mécanisme de répression/activation catabolique chez *B. subtilis* (Deutscher *et al.*, 2002)



Les séquences *cre*

Historiquement, l'étude des déterminants de la RC chez les firmicutes a été initiée par l'étude transcriptionnelle du gène *amyE* chez *B. subtilis* (Weickert and Chambliss, 1990). Ce gène code une α -amylase dégradant l'amidon en glucose. Ces études permirent d'isoler deux mutants dans lesquels l'expression d'*amyE* n'était plus soumise à la RC (Weickert & Chambliss, 1990). Les mutations sont identiques et situées en amont du promoteur dans un palindrome imparfait, appelé *amyR*. L'étude de différentes mutations de la région *amyR*, ainsi que la comparaison des zones promotrices de gènes soumis à la RC ont permis de définir une séquence consensus (Weickert & Chambliss, 1990).

L'intégrité de cette séquence ADN, située juste après le promoteur du gène *amyE* et chevauchant le site de début de transcription, est indispensable au phénomène de RC (Hueck *et al.*, 1994 ; Nicholson & Chambliss, 1985; Nicholson & Chambliss, 1986; Nicholson *et al.*, 1987; Weickert & Chambliss, 1990). Cette séquence, baptisée *cre* constitue l'opérateur du régulateur transcriptionnel pléiotropique CcpA, aussi requis pour la RC (Henkin *et al.*, 1991). Les séquences *cre* se trouvent souvent au niveau de promoteurs d'opérons renfermant deux à trois gènes. L'ensemble des études par mutagenèse établissant la séquence *cre* dans la région régulatrice des opérons *amyE* (α -amylase), *acsA* (acétyl-CoenzymeA synthétase), *hut* (métabolisme des β -xylosides) et *lev* (métabolisme du fructose et de ses polymères) de *B. subtilis* a permis de définir le consensus suivant : TGWAARC | GYTWNCW (le symbole | représentant l'axe de symétrie du palindrome ; W correspond à A ou T, R à A ou G et Y à C ou T) (Stülke & Hillen, 2000). Ce consensus est un peu plus précis que celui défini par Weickert et Chambliss (1990), TGWNANC | GNTNWCA, qui considéraient alors les résultats de mutagenèse du site *cre* devant le gène *amyE* et les alignements de séquence chez plusieurs Bacillacées. Après eux, d'autres auteurs ont montré de façon expérimentale le rôle de la séquence *cre* dans la régulation de certains gènes soumis à la RC chez *B. subtilis*, ce qui a permis de confirmer la séquence consensus (Tableau 7) (Hueck & Hillen, 1995; Miwa *et al.*, 2000). A partir de ce motif légèrement dégénéré, une recherche systématique d'une boîte *cre* dans le génome de *B. subtilis* a permis de dénombrer 126 séquences *cre*, (187 (Deutscher, *et al.*, 2002)) dont certaines sont expérimentalement démontrées et les autres putatives (Miwa *et al.*, 2000). Dans cette dernière étude, l'équipe de Yasutaro Fujita rend flagrante la corrélation entre la présence du motif *cre* pour la fixation de CcpA et l'existence d'une répression/activation catabolique (Tableau 7). Par ailleurs, des recherches similaires, qui sont basées sur un consensus *cre* un peu différent, ont permis d'identifier d'autres motifs *cre* potentiels dans la région régulatrice de certains opérons connus pour être soumis à la RC en présence de glucose (Miwa *et al.*, 2000; Miwa & Fujita, 2001). La comparaison globale de l'expression des gènes dans un mutant *ccpA* et une souche sauvage (souche ST100), cultivés en présence ou en absence de glucose (mais dans un milieu riche LB) a permis de compléter les données précédentes (Moreno *et al.*, 2001) (Tableau 7). En effet, les données obtenues confirment le rôle des séquences *cre* déjà étudiées et suggèrent celui de certains autres motifs *cre* jusqu'alors putatifs. Elles ont aussi montré que CcpA médiait la répression ou l'activation de certains

gènes indépendamment de la présence du glucose (bien que celui-ci peut jouer un rôle mineur sur le niveau de régulation de ces gènes) ou du site *cre*. Cependant, ce type de régulation n'intervient pas dans le contrôle du métabolisme du carbone.

La position du site *cre* est déterminante de la RC ou l'AC (Tableaux 7, 8). Si le site *cre* se trouve au niveau du promoteur, l'interaction avec CcpA va inhiber l'initiation de la transcription (Krüger and Hecker, 1995 ; Nicholson *et al.*, 1987). S'il est situé en aval du promoteur, voire dans le début de la phase codante du gène, le complexe P-Ser-HPr/CcpA bloquera l'élongation (*gnt*, *acsA*, *hutP*) (Fujita *et al.*, 1995 ; Wray *et al.*, 1994; Zalieckas *et al.*, 1998a). S'agissant de la répression de l'expression des opérons *hut* et *gnt*, Zalieckas et ses collègues ont montré que le facteur Mfd est nécessaire à la RC (Zalieckas *et al.*, 1998b). Cette observation est en accord avec un mécanisme de blocage de la transcription ou « road-block ». En effet, le facteur Mfd aide au détachement de l'ARN polymérase lors de la réparation de l'ADN. Par contre, le facteur Mfd n'est apparemment pas impliqué dans la RC lorsque le site *cre* se trouve au niveau du promoteur, comme c'est le cas pour les gènes *amyE* et *bglPH* (Zalieckas *et al.*, 1998b). Par ailleurs, la répression de l'expression de l'opéron *lev* illustre un cas particulier (Martin-Verstraete *et al.*, 1995). CcpA va se fixer sur l'opérateur *cre* situé entre le site de fixation de l'activateur transcriptionnel LevR et la région promotrice de l'opéron, et prévient ainsi l'interaction entre LevR et l'ARN polymérase. Au passage, on peut aussi remarquer que du fait de multiples mécanismes de régulation, l'effet de la mutation du gène *ccpA* ou du site *cre* actif n'entraîne pas toujours un effet de « dérégulation catabolique » très prononcé, voire aucun effet. Par exemple, dans le contrôle du régulon *glp* (métabolisme du glycérol), l'effet de la mutation Δ *ccpA* (ou *ptsHS46A* appelée *ptsHI*) est masquée par les systèmes spécifiques d'exclusion d'inducteur et de contrôle par antitermination (Darbon *et al.*, 2002 ; Deutscher *et al.*, 1994). Par contre, si le site *cre* est placé en amont de la région promotrice (et ne gêne pas l'activation par un autre régulateur), la fixation de CcpA provoque une activation de la transcription.

En présence d'un excès de glucose ou d'un autre sucre rapidement métabolisable, la glycolyse produit un excès de pyruvate par rapport aux besoins anaboliques. Dans ces conditions, une partie du pyruvate peut être transformée en acétate et en acétoïne. L'expression des gènes qui codent ces réactions, dites « d'overflow », est alors activée, phénomène appelé AC. Il s'agit des gènes *ackA* (acétate kinase) (Turinsky *et al.*, 1998), *pta* (phosphotransacétylase) (Presecan-Siedel *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999) et *alsD*

(acétolactate synthase) (Renna *et al.*, 1993). Les deux produits secondaires sont alors exportés dans le milieu extérieur. Ceci se traduit par une acidification du milieu. Lorsque, par la suite, la source de carbone préférentielle est épuisée, l'acétate et l'acétoïne peuvent être réimportés et utilisés. Mais tant que du glucose se trouve dans le milieu de croissance et est utilisé, l'expression des gènes du catabolisme de l'acétate et de l'acétoïne, *acsA* (acétyl-CoA synthétase), *acuA* (acétoïne déshydrogénase) et *acoA* (sous-unité acétoïne déshydrogénase), est réprimée par CcpA.

Gène ^a	Fonction	Position du site <i>cre</i> ^b	RC/AC ^c	Références
<i>ackA</i>	Acétate kinase	-155 -142	+	Tobisch <i>et al.</i> , 1999 ; Turinsky <i>et al.</i> , 1998
<i>acoA</i>	métabolisme de l'acétoïne	+434 +447	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>acsA</i>	Acétyl-CoA synthétase	+7 +20	-	Grundy <i>et al.</i> , 1994 ; Zalieckas <i>et al.</i> , 1998
<i>acuA</i>	Métabolisme de l'acétoïne	-74 -61	-	Grundy <i>et al.</i> , 1994
<i>alsS</i>	Synthèse de l'acétoïne	-127 -114	+	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Miwa <i>et al.</i> , 1994 ; Zahler <i>et al.</i> , 1976
<i>amyE</i>	α -amylase	-124 -111	-	Henkin <i>et al.</i> , 1991 ; Nicholson <i>et al.</i> , 1986
<i>araA</i>	Métabolisme de l'arabinose	+679 +692 -50 -37	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>araBDLN</i>				
<i>bglA</i>	6-P- β -Glucosidase	-83 -70	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>bglP</i>	Métabolisme des β -glucosides	-252 -239 +1517 +1530	-	Kröger <i>et al.</i> , 1995 Deutscher <i>et al.</i> , non publié
<i>blt</i>	efflux de drogues multiples	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>bsaA</i>	Glutathione peroxydase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>cccA</i>	Cytochrome c-550	-187 -174	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Monedero <i>et al.</i> , 2001 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>ykuL-ccpC</i>	Régulation du cycle de Krebs	-108 -92	-	Kim <i>et al.</i> , 2002
<i>citB</i>	Aconitase	-181 -168	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>citG</i>	Fumarase	non identifié	-	Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>citM</i>	transporteur citrate	-31 -18	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Warner <i>et al.</i> , 2000
<i>citST</i>	Régulation TCS	+1299 +1312	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>citZCH</i>	Cycle de Krebs	-113 -100	-	Kim <i>et al.</i> , communication personnelle ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>comEC</i>	Transport de l'ADN ?	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>cstA</i>		+2 +15	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>ctaC</i>	Cytochrome c oxydase II	-206 -193	-	Liu <i>et al.</i> , 1998
<i>ctaD</i>	Cytochrome c oxydase I	+5 +18	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>ctaE</i>	Cytochrome c oxydase III			
<i>cydA</i>	Cytochrome bd ubiquinol oxydase	non identifié	+	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>cysK</i>	Cystéine synthétase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>dhaS</i>	Aldéhyde déshydrogénase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>dhbB</i>	Isochorismatase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>etfA</i>	Transfert d'électron	+363 376	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>exu</i>	Métabolisme des hexuronates	non identifié	-	Mekjian <i>et al.</i> , 1999
<i>gabP</i>	perméase à l' γ -aminobutyrate	-141 -128	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>galT</i>	Métabolisme du galactose-1-P	+214 +227	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>gapA</i>	GAPDH (glycolyse)	pas de site <i>cre</i> fonctionnel	+	Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>gapB</i>	GAPDH (néoglucogenèse)	+375 +388	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>glpF</i>	Facilitateur d'entrée du glycérol	-181 -168	-	Darbon <i>et al.</i> , 2001 ; Miwa <i>et al.</i> , 2000 Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>glpQT</i>	Perméase au glycérol 3-P	-158 -145	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>glvA</i>	6-P- α -glucosidase	-25 -12	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>glvC</i>	EII _{IBC} ^{Mal}	+275 +262	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>gntK</i>	Gluconate kinase	+434	-	
<i>gntR</i>	Métabolisme du gluconate	+107 +120	-	Deutscher <i>et al.</i> , 1994 ; Fujita <i>et al.</i> , 1995
<i>gutB</i>	Métabolisme du sorbitol	-44 -31	-	Deutscher <i>et al.</i> , 1994 ; Ye <i>et al.</i> , 1994b
<i>hutP</i>	Métabolisme de l'histidine	+170 +183	-	Wray <i>et al.</i> , 1994
<i>ivlB</i>	Acétolactate synthase	non identifié	+	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>iolA</i>	Métabolisme de l'inositol	-105 -92	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>iolB</i>	Métabolisme de l'inositol	+668 +681	-	Deutscher <i>et al.</i> , 1994 ; Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>iolC</i>	Métabolisme de l'inositol			
<i>kdgA</i>	Métabolisme des hexuronates	+355 +368	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Pujic <i>et al.</i> , 1998
<i>lefA</i>	Acyl-CoA synthétase	+412 +425	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>lctE</i>	Lactate déshydrogénase	-137 -124	+	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>levD</i>	Métabolisme	-79 -65	-	Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1999 ; Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1995
<i>licA</i>				
<i>licB</i>		-76 -63	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999a
<i>licC</i>				
<i>licH</i>				

<i>mmgA</i>		-36 -23	-	Bryan <i>et al.</i> , 1996
<i>msmRE</i>	Métabolisme du mélibiose	-85 -72	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>msmX</i>	ABC transporteur de sucre	-34 -21	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>mtlA</i>	Métabolisme du mannitol	-94 -81	-	Deutscher <i>et al.</i> , 1994
<i>narH</i>	Nitrate réductase	+1156 +1169	-	
<i>ndk</i>	Nucléoside diphosphate kinase	non identifié	+	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>nupCpdp</i>	Métabolisme de la pyrimidine	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>odhAB</i>	2-oxoglutarate déshydrogénase	-32 -29	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>pag</i>	Antigène de protection	-99 -86	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>pbp</i>		non identifié	-	Baillie <i>et al.</i> , 1998
<i>pgk</i>	seconde partie de la glycolyse	-218 -213	+	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>phrC</i>	Régulateur de RapC	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>phrK</i>	Régulateur de RapK	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>ppsB</i>	Peptide synthétase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>pta</i>	Métabolisme de l'acétate	-99 -86	+	Presecan-Siedel <i>et al.</i> , 1999 ; Shin <i>et al.</i> , 1999 ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyl-transférase	non identifié	+	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>qcrA</i>	Ménaquinol :cytochrome c oxidoréductase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>rbsR</i>	Métabolisme du ribose	-33 -20	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>rbsK</i>	Métabolisme du ribose	+251 +264	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>rbsA</i>	Métabolisme du ribose	+347 +360	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>rocG</i>	Glutamate déshydrogénase	non identifié	-	Belitsky <i>et al.</i> , communication personnelle
<i>sacP</i>	Métabolisme du sucrose	-150 -137	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>sdhC</i>	Succinate déshydrogénase	-138 -125	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié
<i>spoVFB</i>	Dipicolinate synthase	+300 +313	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>spoVG</i>	Sporulation	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>spoVS</i>	Sporulation	+50 +63	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>sucCD</i>	Succinyl CoA synthétase	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>sunT</i>	Lantibiotic transporter	-50 -37	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Tobisch <i>et al.</i> , 1999b
<i>tdh/kbl</i>	Catabolisme de la thréonine	+1839 +1852	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>treP</i>	Métabolisme du tréhalose	+1464 +1477	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
		+319 +332	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
		-122 -109	-	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; 96
<i>uxaC/exu</i>	Métabolisme de l'hexuronate	-44 -31	-	Rivolta <i>et al.</i> , 1998
		-38 +51	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
		+1177 +1190	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>xyn</i>	Catabolisme des xylosides	-98 -85	-	Galinier <i>et al.</i> , 1999
<i>xylA</i>	Métabolisme du xylose	+35 +48	-	Jacob <i>et al.</i> , 1991 ; Kraus <i>et al.</i> , 1994 ; Kunst <i>et al.</i> , 1997
<i>ydbH</i>	Transport des acides dicarboxyliques	-63 -50	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000 ; Blencke <i>et al.</i> , 2003
<i>yebD</i>	inconnue	-172 -159	+	Deutscher <i>et al.</i> , non publié ; Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>yfmQ</i>	inconnue	non identifié	+	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>yhbI</i>	inconnue	non identifié	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>yobO</i>	Protéine de phage	+1178 +1191	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000
<i>yoxA</i>	inconnue	+500 +513	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>yyjL/lacA</i>	Métabolisme du lactose	+1380 +1393	-	Moreno <i>et al.</i> , 2001
<i>yxjC</i>	Métabolisme du β -hydroxybutyrate	-40 -27	-	Miwa <i>et al.</i> , 2000

Tableau 7 : Liste de gènes possédant un site cre et dont l'expression est sensible à une mutation Δ ccpA ou ptsH1 chez *B. subtilis* (Deutscher *et al.*, 2002)

Dans certains cas, il peut y avoir plusieurs sites *cre* adjacents au niveau de la région régulatrice d'un opéron. C'est le cas des opérons *gnt* et *xyl* (Gosseringer *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1997) (Tableau 7). Dans le cas de l'opéron *xyl*, les auteurs ont montré que CcpA pouvait interagir avec trois sites *cre* : le site *creI* situé dans le premier gène de l'opéron *xyl* et impliqué dans la répression catabolique par CcpA, et deux autres sites *cre*, l'un chevauchant la séquence -35 et l'autre situé en aval du premier *cre* cité. Les séquences de ces trois *cre* diffèrent légèrement, celui décrit par Hueck et ses collaborateurs étant le plus ressemblant à la séquence consensus chez *B. subtilis* (Hueck *et al.*, 1994). Cela explique l'affinité différentielle de CcpA pour ses séquences. Une mutation dans *creI* entraîne la perte de la régulation par CcpA *in vivo* et la perte de l'interaction avec les trois sites *cre in vitro*, suggérant une dépendance physique entre ces séquences.

L'implication des séquences *cre* dans la RC chez d'autres firmicutes a été mise en évidence. Chez *L. casei*, la délétion dans le promoteur de l'opéron *lacTEGF* d'une séquence *cre* potentielle abolit la RC de cet opéron (Monedero *et al.*, 1997).

CcpA et P-Ser-HPr

L'étude de la RC du gène *amyE* a aussi permis d'identifier CcpA, le régulateur transcriptionnel qui reconnaît la séquence *cre*. En effet, l'interruption du gène *ccpA* rend l'expression du gène *amyE* insensible au glucose (Henkin *et al.*, 1991). Henkin et Grundy en 1991 ont construit (par transposition) des mutants de *B. subtilis*. Ils ont criblé ceux exprimant le gène *amyE* même en présence d'une source de carbone facilement métabolisable. De cette manière, un répresseur du gène *amyE* a été identifié et nommé CcpA. CcpA a fait l'objet de nombreuses études qui ont confirmé son rôle dans la RC, (*acsA* et *acuABC*) (Grundy *et al.*, 1994), (*gnt*, et *mtl*) (Deutscher *et al.*, 1994 ; Fujita & Miwa, 1994). CcpA a été identifiée chez de nombreux firmicutes (Kuster *et al.*, 1996), notamment *Bacillus megaterium* (Hueck *et al.*, 1994; Hueck *et al.*, 1995), *L. casei* (Monedero *et al.*, 1997), *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1998) et *E. faecalis* (Leboeuf *et al.*, 2000a; Leboeuf *et al.*, 2000b). La levée de la RC dans les souches mutées pour ces gènes suggère une conservation du mécanisme de RC chez les firmicutes (Stülke & Hillen, 1999). Cependant, chez *Streptococcus mutans*, la protéine RegM, homologue de CcpA, ne semble pas fonctionner comme ce dernier régulateur. En effet, une délétion du gène *regM* ne conduit pas à la levée de la RC (Simpson & Russell, 1998). Par ailleurs, chez *Streptococcus*

pneumoniae, outre son implication dans la répression de l'expression de l' α -glucosidase et de la β -galactosidase, RegM semble être impliquée dans la régulation de la biosynthèse des polysaccharides capsulaires, ce qui suggère un lien entre cette protéine et la virulence de cette bactérie (Giammarinaro & Paton, 2002).

Chez *B. subtilis*, CcpA est une protéine de 38 kDa (Kim *et al.*, 1995; Miwa *et al.*, 1994 ; Weickert & Adhya, 1992), appartenant à la famille des répresseurs/activateurs, LacI/GalR. La partie N-terminale de CcpA renferme un motif hélice-tour-hélice spécifique des protéines se liant à l'ADN (Henkin *et al.*, 1991), tandis que la partie C-terminale renferme le domaine de fixation du co-effecteur P-Ser-HPr (Jones *et al.*, 1997; Kraus *et al.*, 1998). Des expériences de retard de migration sur gel électrophorétique ont démontré que CcpA interagit avec les séquences *cre* sous forme dimérique (Miwa *et al.*, 1994).

Par ailleurs, les études concernant l'expression génique indiquent que CcpA de *B. subtilis* est synthétisée de façon constitutive, en présence ou en absence de glucose. Ainsi, il semble que ce soit l'activité (et non la synthèse) de CcpA qui est modulée, permettant ou pas l'interaction avec son opérateur *cre* (Hueck & Hillen, 1995 ; Miwa *et al.*, 1994). Cependant, il existe chez *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1999) et *Lactococcus pentosus* (Mahr *et al.*, 2000) un site *cre* dans la région régulatrice de l'expression de *ccpA* qui pourrait permettre son autorégulation. L'expression constitutive de CcpA chez *B. subtilis* a amené certains auteurs à suggérer la présence d'un co-répresseur de CcpA régulant l'interaction de CcpA avec les séquences *cre* (Miwa, *et al.*, 1994). Deutscher et ses collaborateurs ont suivi l'activité d'un certain nombre d'enzymes (gluconate kinase, glucitol déshydrogénase, mannitol-1-P déshydrogénase et mannitol PTS perméase, inositol déshydrogénase) et ont pu observer qu'un mutant *ptsHI* avait un phénotype similaire à un mutant Δ *ccpA* (levée de la RC exercée par le glucose) (Tableau 7)

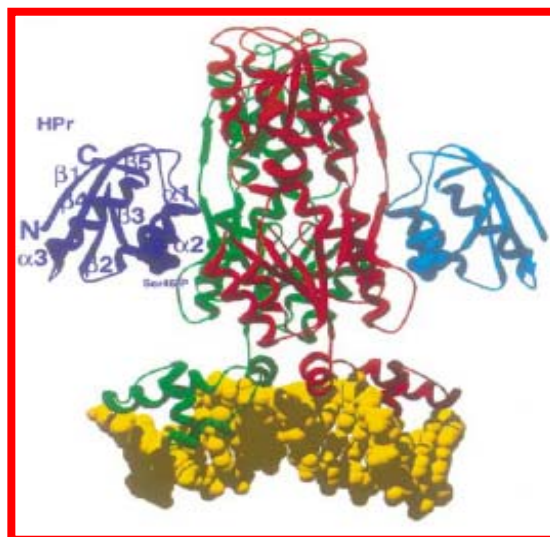
Ils ont suggéré que la P-Ser-HPr serait l'effecteur qui module l'activité de fixation à l'ADN de CcpA (Deutscher *et al.*, 1994). Plus tard, des expériences de retard d'élution des différentes formes de HPr par CcpA fixée sur une colonne Ni-NTA ont montré que CcpA interagit de manière spécifique avec la P-Ser-HPr (Deutscher *et al.*, 1995). De plus, ces expériences ont également montré que cette interaction est renforcée par la présence de FBP. De nombreux travaux de retard sur gel et d'empreinte à la DNase ont mis en évidence que CcpA, pour se fixer sur les séquences *cre*, a besoin de se complexer avec la P-Ser-HPr (Fujita *et al.*, 1995). Une étude par RMN a permis de confirmer l'interaction spécifique de

CcpA avec P-Ser-HPr, l'affinité de la P-Ser-HPr pour CcpA étant mille fois plus importante que celle de HPr. Cette étude a également permis de déterminer les acides aminés importants pour cette interaction, qui sont l'histidine 15, la région des acides aminés 21 à 27 et les acides aminés qui entourent la sérine 46 (Jones, *et al.*, 1997). La présence de l'histidine 15 dans le domaine d'interaction de HPr avec CcpA explique pourquoi la phosphorylation sur cette histidine empêche la formation du complexe CcpA avec la forme doublement phosphorylée (Deutscher, *et al.*, 1995) et montre l'importance du rapport relatif des différentes formes de HPr pour la RC.

Des études de RMN avec les complexes HPr/EIIA^{Glc} et HPr/domaine N-terminal de EI ont montré que les acides aminés des régions impliquées dans l'interaction avec CcpA forment une région d'hydrophobicité à la surface de HPr. Cette région est importante pour les interactions de HPr avec ses partenaires protéiques. La phosphorylation de HPr sur sa sérine 46 n'entraîne pas de modification conformationnelle importante mais apporte une charge négative qui entraîne des répulsions électrostatiques avec EI (Audette *et al.*, 2000). Ainsi, la phosphorylation par l'EI de la P-Ser-HPr sur l'histidine en position 15 est 500 fois plus lente par rapport à la phosphorylation de HPr non phosphorylée (Deutscher and Engelmann, 1984). Dans certaines conditions, la phosphorylation sur la sérine module le transport des sucres-PTS. En présence d'un sucre-PTS l'activité glycolytique de la cellule est plus importante, augmentant la concentration des intermédiaires de la glycolyse tels que le FBP. Cela se traduit par une induction de l'activité kinase de HprK/P et donc par une quantité plus importante de HPr phosphorylée sur la sérine 46 et en même temps la proportion de HPr disponible pour le transport des sucres PTS diminue.

La structure tridimensionnelle du complexe CcpA/P-Ser-HPr/*cre* a été résolue par l'équipe de Brennan (Fig. 36) (Schumacher *et al.*, 2004). Leur structure montre que la P-Ser-HPr induit une rotation d'une partie de CcpA qui modifie la localisation du résidu Thr61, favorisant la juxtaposition des motifs HTH pour former une charnière en présence des sites *cre* (Schumacher *et al.*, 2004).

Fig. 36 : Structure tridimensionnelle du complexe CcpA/P-Ser-HPr/cre ((Schumacher et al., 2004)



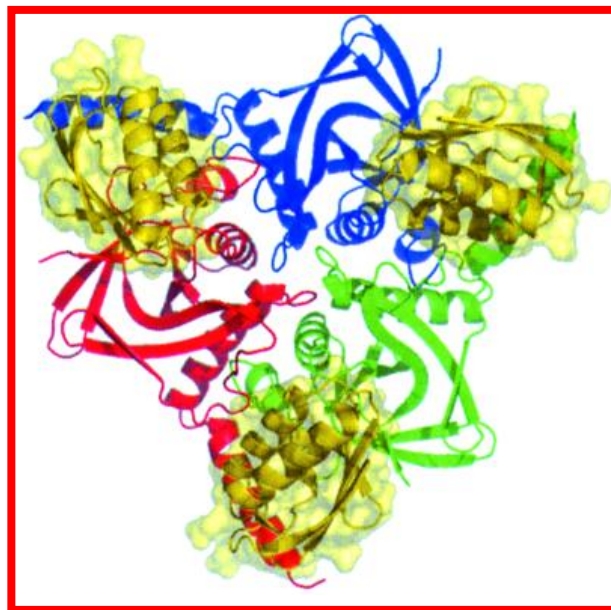
HprK/P

L'HprK/P joue un rôle central dans la RC des bactéries à Gram-postif. Il s'agit d'une enzyme bifonctionnelle HPr kinase/phosphorylase qui module le rapport HPr/P-Ser-HPr. La phosphorylation ATP dépendante de HPr a d'abord été mise en évidence chez *Staphylococcus pyogenes* en 1983 (Deutscher and Saier Jr, 1983). La première purification de l'enzyme responsable de cette phosphorylation date de 1984 chez *E. faecalis* (Deutscher and Engelmann, 1984). HprK/P a depuis été décrite et purifiée dans d'autres firmicutes, comme *L. casei*, *L. lactis*, *B. subtilis* (Boël et al., 2003). L'identification des gènes codant une HprK/P a été réalisée presque en même temps dans trois espèces différentes, *E. faecalis*, *B. subtilis* et *S. salivarius*. Ces gènes codent des protéines cytoplasmiques de 310 à 330 acides aminés (Brochu and Vadeboncoeur, 1999; Galinier et al., 1998; Kravanja et al., 1999). Pendant longtemps, on pensait que HprK/P était spécifique des firmicutes, mais l'obtention d'un nombre croissant de génomes complets a permis de mettre en évidence sa présence chez des protéobactéries non entériques. Son rôle dans ces bactéries reste encore inconnu à ce jour, mais différents éléments suggèrent qu'elle interviendrait dans la régulation de gènes dépendant du facteur sigma 54 (Boël, et al., 2003).

Depuis les premières études biochimiques des HprK/P, il est reconnu que ces protéines sont oligomériques en solution. Les structures d'HprK/P de *Staphylococcus xylosum*, *Mycoplasma pneumoniae* et *L. casei* (forme tronquée) ont été résolues. Ces structures

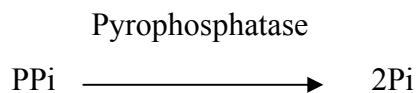
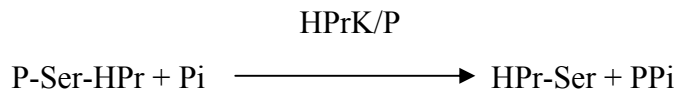
montrent que HprK/P forme un hexamère formé de deux couches de trimères (Allen *et al.*, 2003) (Fieulaine *et al.*, 2001; Marquez *et al.*, 2002). Le site actif de l'HprK/P se trouve dans la partie C-terminale qui est orientée vers le centre de l'hexamère fonctionnel. Quant à la partie N-terminale, elle est orientée vers l'extérieur de l'hexamère et sa présence n'est pas requise pour l'activité catalytique (Fieulaine *et al.*, 2001). Le site Walker A (GXXXXGK(T/S)), site de fixation de l'ATP, participe à la catalyse de la réaction kinase ATP-dépendante, stimulée par la présence de FBP.

Fig. 37 : Le complexe HPr-HprK/P de *L. casei*. Les trois sous-unités de l'hexamère de HprK/P de *L. casei* colorées en rouge, vert et bleu, fixent trois molécules de HPr de *B. subtilis* HPr, dorées



L'étude de la phosphorylation de HPr par HprK/P a permis de montrer que les intermédiaires de la glycolyse (FBP) stimulent l'activité kinase alors que l'EDTA et le phosphate l'inhibent. La réaction inverse, liée à l'activité phosphorylase, dépend aussi du Walker motif A. La capacité de l'HprK/P à déphosphoryler la P-Ser-HPr, a été mise en évidence après son activité kinase (Kravanja, *et al.*, 1999). Cette activité nécessite la présence d'ions bivalents. Elle est stimulée par la présence de phosphate inorganique (Pi) mais est inhibée par l'ATP. L'effet du Pi sur la déphosphorylation est surprenant car le Pi est supposé être un des produits de la réaction. Cette particularité a été résolue par les travaux de Mijakovic et ses collaborateurs qui ont montré que le produit de la réaction de déphosphorylation de la P-Ser-HPr n'est pas le Pi mais le pyrophosphate (PPi) (Mijakovic, *et al.*, 2002). HprK/P n'est donc pas une phosphatase mais une phosphorylase. Les auteurs

ont alors renommé l'HPr kinase/P-Ser-HPr phosphatase, HPr kinase/P-Ser-HPr phosphorylase. La dernière réaction est réversible, le PPi peut servir de substrat pour phosphoryler HPr sur sa sérine en position 46 (Mijakovic *et al.*, 2002).

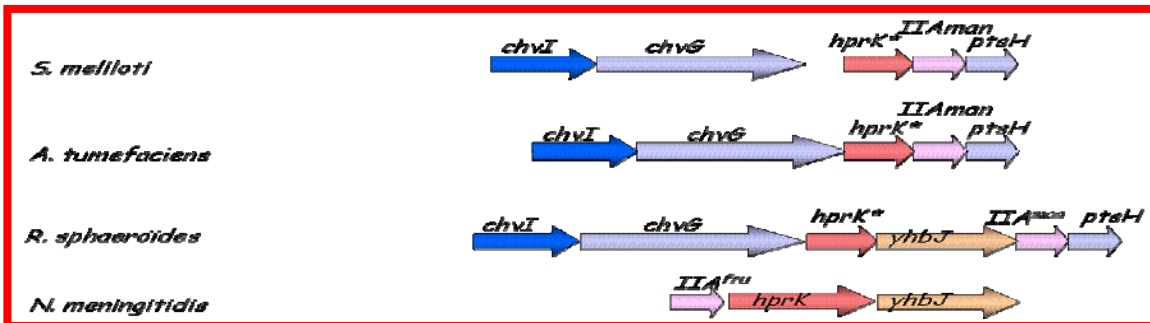


Chez les entérobactéries comme *E. coli*, la RC n'implique pas l'HPrK/P ; en effet chez ces bactéries, cette enzyme est absente. Cependant, plusieurs bactéries de toutes les subdivisions des protéobactéries (α , β , γ , et δ) possèdent le gène *hprK* qui, chez les α -protéobactéries, code pour une version tronquée de l'HprK/P, dont la partie N-terminale est absente. Ces protéines possèdent également un motif Walker A et un site actif, et sont probablement capables de phosphoryler HPr, présente aussi chez ces bactéries.

Le rôle de l'HprK/P chez les protéobactéries n'est pas de contrôler la RC. Ces bactéries possèdent l'EI, HPr et l'EIIA, protéines probablement fonctionnelles. Les gènes codant ces protéines du PTS sont souvent en structure opéronique avec *hprK*. Les protéobactéries possèdent tous les composants requis pour phosphoryler HPr sur l'histidine 15 soit sur la sérine 46. Cependant la plupart de ces organismes sont dépourvus de protéines homologues à CcpA et ne contiennent ni EIIB ni EIIC du PTS, ce qui rend ce système non fonctionnel en tant que système de transport. Chez ces protéobactéries, l'HprK/P ainsi que les acteurs de la cascade de phosphorylation du PTS devraient avoir des fonctions différentes de celles des firmicutes. L'organisation génique (Fig. 38) ainsi que certaines expériences préliminaires ont permis de suggérer que l'HprK/P serait impliquée dans le contrôle de certains régulateurs transcriptionnels impliqués dans l'adhésion cellulaire et la virulence. Chez les α -protéobactéries, l'*hprK* est localisé en aval de gènes codant pour un système à deux composants appartenant à la famille EnvZ/OmpR. Chez d'autres protéobactéries *hprK* est organisé en opéron avec les gènes de la région *rpoN* d'*E. coli* (*rpoN* code pour σ_{54}). Il a été

proposé que l'HPrK/P pourrait contrôler l'état de phosphorylation de HPr et EIIA qui à leur tour contrôlent des régulateurs transcriptionnels (Boël *et al.*, 2003).

Fig. 38 : Organisation génétique de la région entourant *hprK* chez des bactéries à Gram-



Autres régulateurs impliqués dans la RC : CcpB et CcpC

A côté de ces acteurs principaux, deux autres régulateurs en *trans* ont été décrits qui sont impliqués dans la RC. Le premier est codé par le gène *ccpB* (catabolite control protein B). Le rôle partiel de CcpB a été observé dans la régulation des opérons *gnt* et *xyl* de *B. subtilis* lors de la croissance en milieu solide en présence de glucose, de mannitol et de sucrose (Chauvaux *et al.*, 1998). En phase liquide, la levée de la RC par une interruption de *ccpB* n'est perceptible que dans des conditions particulières de faible agitation conduisant à une faible aération du milieu. CcpB est une protéine synthétisée de façon constitutive, qui possède 30 % d'identité avec CcpA. Mais les séquences CcpA-spécifiques ne sont pas conservées ce qui suggère que CcpB n'interagit pas avec HPr ou Crh. L'ensemble de ces éléments suggère que CcpB répond plutôt à un signal de type physico-chimique (oxygénation du milieu, densité cellulaire...). Le deuxième acteur en *trans* est codé par le gène *ccpC* (catabolite control protein C). Il a été identifié lors de l'étude de la régulation des gènes codant les enzymes du cycle de Krebs (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002b; Kim *et al.*, 2002a). CcpC appartient à la famille de régulateur transcriptionnel LysR-like. Il a été montré que CcpC réprimait la transcription des gènes *citZ* (citrate synthase) et *citB* (aconitase) en réponse à la faible disponibilité en citrate du milieu de culture (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000).

II.6.B. Répression catabolique chez *L. monocytogenes*

Très peu de données traitent la RC proprement dite chez *L. monocytogenes*. Les études des effets des sucres sur l'expression des gènes de virulence de *L. monocytogenes*, ont suscité l'intérêt des auteurs qui ont commencé à chercher le lien entre le métabolisme des sources

de carbone et la virulence chez cette bactérie. Les premières études effectuées à ce sujet, ont été réalisées par Milenbachs et ses collaborateurs, en 1997. Bien que *L. monocytogenes* est capable de se multiplier dans les cellules mammaires, ce pathogène facultatif peut mener une existence saprophytique durant laquelle les végétaux en décomposition constituent sa principale source de nutriments (Ryser and Marth, 1991). C'est pourquoi il paraît intéressant de considérer comment *L. monocytogenes* ressent les signaux environnementaux afin de s'adapter au milieu où elle se trouve et assurer l'expression de ses facteurs de virulence dans certaines conditions bien appropriées (Milenbachs *et al.*, 1997). Une réponse partielle à cette question a été donnée par Park et Kroll (Park and Kroll, 1993). Ces derniers ont démontré que l'expression de deux gènes PrfA-dépendants, *hly* et *plcA*, est fortement réprimée durant la croissance de *L. monocytogenes* en milieu TSB (Tryptic Soy Broth). Le fractionnement des composants du TSB a permis de constater que le disaccharide cellobiose dérivé des plantes, était responsable de cette répression (Park and Kroll, 1993). Par ailleurs, dans cette étude, le cellobiose a été considéré comme l'unique molécule responsable de cet effet. C'est pourquoi, il a été conclu que le cellobiose constitue une molécule-signal qui indique à *L. monocytogenes* qu'elle se trouve dans un environnement riche.

Klarsfeld et ses collaborateurs ont ensuite étudié l'effet du cellobiose sur l'expression de *plcA* et *hly*, en effectuant des expériences de Northern-blot, sur des ARN totaux extraits à partir de bactéries cultivées en présence ou absence de ce disaccharide (Klarsfeld *et al.*, 1994). Dans cette étude, l'interprétation était compliquée car la souche utilisée pour l'extraction de l'ARN, portait un transposon dans le gène *plcA*, ce qui pourrait modifier le taux de PrfA sachant que le transcit *plcA/prfA* est impliqué dans la régulation de la synthèse de PrfA (Freitag *et al.*, 1993).

Plus tard Milenbachs et ses collaborateurs ont démontré que le cellobiose agit au niveau transcriptionnel, au niveau de l'accumulation de transcrits, résultat en accord avec les deux études précédentes. Ils ont observé que non seulement le cellobiose mais également d'autres sucres, comme le glucose, le fructose, le maltose, et le tréhalose exercent un effet répresseur similaire à celui du cellobiose. Milenbachs et ses collaborateurs ont établi une corrélation entre les sucres répresseurs et les sucres rapidement utilisés par *L. monocytogenes* (Premaratne *et al.*, 1991). Ils ont interprété l'effet du cellobiose non pas comme une transduction de signal médiée par ce disaccharide, mais plutôt comme étant un exemple de RC. Cependant ces auteurs ont établi une hiérarchie des sucres en fonction de leur pouvoir

répresseur et ont placé le cellobiose à la tête de cette hiérarchie. Ils ont suggéré l'existence d'au moins deux mécanismes de RC, l'un étant spécifique du cellobiose, tandis que l'autre est général à tous les autres sucres (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004). De plus, ils ont pu démontrer que le mécanisme de RC exercé par le cellobiose, n'implique pas une réduction de la synthèse de PrfA (Milenbachs *et al.*, 1997). Bohne et ses collaborateurs ont étudié l'effet des modifications de l'expression de *prfA* sur celle des gènes PrfA-dépendants. Ils ont déduit que des modifications dans le taux d'expression de *prfA* n'entraîne pas des modifications dans l'expression de gènes appartenant au régulon *prfA* (Bohne *et al.*, 1996). PrfA subit donc une modification post-transcriptionnelle, la rendant active. Quelle serait la nature de cette modification et quel serait le mécanisme d'activation ? Milenbachs et ses collaborateurs n'ont pas réussi à identifier une modification de PrfA affectant sa taille, sa charge et sa forme, cependant ils n'ont pas exclu le fait que PrfA soit la cible d'une modification chimique labile plus subtile. Une réponse possible à cette question est proposée par Sheehan et ses collaborateurs en 1996, qui ont pu donner une signification fonctionnelle à la similarité entre PrfA et Crp. Par analogie à la protéine Crp qui utilise l'AMPC comme coactivateur, il a été suggéré que l'activité de PrfA pourrait être contrôlée par son association à un cofacteur non identifié (Dickneite *et al.*, 1998 ; Sheehan *et al.*, 1996). La synthèse ou la déplétion de ce cofacteur hypothétique, est régulée en réponse à la présence de sucres rapidement métabolisés. Une interprétation de ce genre existe chez *P. aeruginosa*, où un homologue à Crp est partiellement responsable de la régulation des gènes de virulence (West *et al.*, 1994).

Certaines études montrent que PrfA, pour être fonctionnelle *in vivo*, requiert un facteur supplémentaire appelé Paf (PrfA associated factor) (Dickneite *et al.*, 1998 ; Ripio *et al.*, 1997). L'activité de Paf est présente non seulement chez *L. monocytogenes* mais également chez d'autres bactéries du sol, non pathogéniques comme *B. subtilis* (Bockmann *et al.*, 1996). Ripio et ses collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel des signaux environnementaux réguleraient l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants en altérant le taux ou l'activité de Paf (Ripio *et al.*, 1997). La présence de l'activité Paf chez *Bacillus* et *Listeria* suggère que Paf pourrait réguler non seulement l'expression de gènes de virulence mais également celle de gènes non impliqués dans la virulence, en réponse aux signaux environnementaux (Behari and Youngman, 1998).

En plus de son rôle important dans la régulation de l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants chez *L. monocytogenes*, la RC régule l'expression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des sucres comme l' α -glucosidase. Cependant la répression des gènes de virulence suit un mécanisme différent du mécanisme général de RC P-Ser-HPr/CcpA - dépendant décrit chez les firmicutes (Behari and Youngman, 1998). *L. monocytogenes* possède les gènes codant les protéines CcpA (Duché *et al.*, 2002), HprK/P et HPr (Christensen *et al.*, 1999). Plusieurs auteurs suggèrent que ces composants impliqués dans la RC interfèrent avec PrfA modulant ainsi son activité (Gilbreth *et al.*, 2004 ; Milenbachs *et al.*, 1997 ; Park and Kroll, 1993 ; Renzoni *et al.*, 1997). L'hypothèse d'une influence directe de CcpA sur PrfA a été écartée (Behari and Youngman, 1998). En effet, quand *ccpA* est interrompu, la répression de l'expression du gène codant l' α -glucosidase est levée, alors que celle des gènes de virulence PrfA-dépendants persiste (Behari and Youngman, 1998). De ce fait, nous avons voulu tester si l'expression des gènes de virulence de *L. monocytogenes* serait contrôlée par un mécanisme de RC P-Ser-HPr-dépendant CcpA-indépendant, ou aussi par un nouveau mécanisme non élucidé jusqu'à présent. Nous avons donc cherché à étudier l'implication potentielle du PTS dans la régulation de PrfA. Nous savons que le PTS permet le transport de nombreux sucres répresseurs de l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants, comme le glucose, fructose, cellobiose, et β -glucosides. D'un autre côté *L. monocytogenes* possède un nombre élevé de PTS, dont certains sont absents chez *L. innocua* la souche non pathogène (Glaser *et al.*, 2001), d'autant plus qu'une corrélation a été établie entre le nombre de PTS et la virulence (Kok *et al.*, 2003). D'où le lien entre PTS, RC et virulence chez *L. monocytogenes*.

III. Matériels et Méthodes

III.1. Souches utilisées

La souche de *L. monocytogenes* qui a fait l'objet de notre étude est la souche AML73 qui nous a été fournie par Dr Nancy Freitag. Elle comporte intégrée à son génome, la fusion *Phly-gus*, en substitution au gène *hly*, et une résistance à la néomycine qui a permis de sélectionner cette souche. Le gène *prfA* de l'AML73 est sous contrôle de son propre promoteur. Les tentatives de produire des mutants $\Delta ptsI$ ou *hprKV267F* ont été réalisées sur l'AML73. Toutefois, les constructions plasmidiques nécessaires pour l'obtention de ces deux mutants, ont été réalisées en amplifiant des régions homologues sur l'ADN chromosomique de la souche EGDe, qui nous a été fournie par Pr Pascale Cossart.

La souche de *B. subtilis* qui a constitué le modèle d'étude et l'outil génétique, est la souche BUG1199 (Sheehan *et al.*, 1995). Cette souche renferme intégrés à son génome, le gène *prfA* sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (isopropyl-43-D-thiogalactoside), et la fusion *Phly-lacZ*. Il a été montré que l'expression du promoteur *hly* (*Phly*) dans *B. subtilis* est également PrfA-dépendante. Cette souche porte des résistances à la kanamycine, au chloramphénicol et à la phléomycine. A partir de cette souche, des mutants des différents composants du PTS ont été réalisés et testés pour leur activité de PrfA, *via* un suivi de l'activité β -galactosidase.

Les souches d'*E.coli* utilisées pour les clonages, transformations, expressions des gènes et productions de protéines sont la souche NM522, DH5 α (TOP 10), BL21 (DE3), et une souche GM2545 (méthylase négative)

Les différentes souches de *B. subtilis* ainsi que leurs mutants dérivés sont représentés dans le tableau 8.

Souches de <i>B. subtilis</i>	Génotype	Référence
BUG1195	<i>trpC2 sacP::cat amyE::(Phly-lacZ aphA3)</i>	Sheehan <i>et al.</i> , 1995
BUG1199	<i>trpC2 sacP:: [cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3)</i>	Sheehan <i>et al.</i> , 1995(Fig. 49)
CR1	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3)</i> <i>hprK::(LchprKV267F-erm)^a crh::spc</i>	Ce travail
DM1	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3)</i> <i>hprK::(LchprKV267F-erm) ccpA::spc</i>	Ce travail
GM273	<i>trpC2 sacB'-lacZ Δ(ptsGHI)::erm</i>	Deutscher <i>et al.</i> , 1994
GM1090	<i>trpC2 pheA1 ccpA::spc</i>	Monedero <i>et al.</i> , 2001
GM1225	<i>trpC2 pheA1 Δ(bgaX) amyE::(gntRK'-lacZ) ccpA::Tn917 Δ(lacZ-erm)</i>	Deutscher <i>et al.</i> , 1994
GP111	<i>trpC2 ptsGΔEIIB amyE ::(Δ ptsG'-²lacZ aphA3)</i>	Bachem and Stülke, 1998

GP113	<i>trpC2 ptsGΔEIIIBA amyE ::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Bachem and Stülke, 1998
GP121	<i>trpC2 ptsGC461A amyE ::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Bachem and Stülke, 1998
GP122	<i>trpC2 ptsGH620A amyE ::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Bachem and Stülke, 1998
GM1475	BGC51 [<i>ΔbgaX ΔsacXY ΔsacT ΔsacB ΔLicT::erm amyE::(bglP-lacZ) cat</i>] pIC518 [<i>licTH207D/H269D</i>]	Lecoq résultat non publié
GR26	<i>trpC2 sacXY Δ3 sacB Δ23 sacT Δ4 bglP Δ3 amyE ::(bglP'-lacZ ble) ptsHADH cat ΔptsI:: spc</i>	Darbon <i>et al.</i> , 2001
GR40	<i>TrpC2 ptsHADH ykwC::cat</i>	Darbon and Deutscher, résultat non publié
GR64	<i>trpC2 amyE::phoP'-lacZ ptsHS46A ykwC::cat</i>	Darbon and Deutscher, résultat non publié
MD1	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) hprK::(LchprKV267F-erm) ptsHI ykwC :: spc</i>	Ce travail
MDM	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ptsHS46A ykwC::spc ccpA::Tn917 Δ(lacZ-erm)</i>	Ce travail
MS3	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ptsHS46A ykwC::spc</i>	Ce travail
MS9	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ptsH⁺ ykwC :: spc</i>	Ce travail
QB7101 ^b	<i>trpC2 ptsHS46A crh:: spc</i>	Presecan-Siedel <i>et al.</i> , 1999
QB5367	<i>trpC2 ptsHH15A ykwC ::cat levR8 amyE::(levD'-lacZ aphA3)</i>	Stülke <i>et al.</i> , 1995
RHGH1199	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) Δ(ptsGHI): erm</i>	Ce travail
RHBUGP122	<i>trpC2 (ptsGH620A)::spc amyE::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Ce travail
RHGR40	<i>trpC2 ptsHADH ykwC::spc</i>	Ce travail
RHGR64	<i>trpC2 amyE::phoP'-lacZ ptsHS46A ykwC::spc</i>	Ce travail
RHTG101	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) hprK::(LchprKV267F-erm)</i>	Ce travail
RHH1199	<i>trpC2 sacP::[cat (Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ptsHADH ykwC::spc</i>	Ce travail
RHH15A	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ptsHH15A ykwC::spc</i>	Ce travail
RHHGM1475	BGC51 [<i>ΔbgaX ΔsacXY ΔsacT ΔsacB ΔLicT::ery amyE::(bglP-lacZ) cat</i>] pIC518 [<i>licTH207D/H269D</i>] <i>ptsH::spc</i>	Ce travail
RHI1199	<i>trpC2 sacP::[cat::(Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ptsI::spc</i>	Ce travail
RHIGM1475	BGC51 [<i>ΔbgaX ΔsacXY ΔsacT ΔsacB ΔLicT::ery amyE::(bglP-lacZ) , cat</i>] pIC518 [<i>licTH207D/H269D</i>] <i>ptsI:: spc</i>	Ce travail
RHGP111	<i>trpC2 ptsGΔEIIB::spc amyE::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Ce travail
RHGP113	<i>trpC2 (ptsGΔEIIBA)::spc amyE::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Ce travail
RHGP121	<i>trpC2 (ptsGC461A)::spc amyE::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Ce travail
RHGP122	<i>trpC2 (ptsGH620A)::spc amyE::(ΔptsG⁻-lacZ aphA3)</i>	Ce travail
RHQB5367	<i>trpC2(ptsHH15A) ykwC:: spc levR8 amyE::(levD'-lacZ aphA3)</i>	Ce travail
SM1	<i>trpC2 sacP::[cat (Pspac-prfA ble)] amyE::(Phly-lacZ aphA3) ccpA::spc</i>	Ce travail
TG101	<i>trpC2 amyE::(xynP-lacZ cat) hprK::(LchprKV267F-erm)</i>	Monedero <i>et al.</i> , 2001

Tableau 8 : Liste des souches de *B. subtilis* utilisées dans cette étude

Les différents gènes codant les antibiotiques utilisés dans ce tableau sont les suivantes : *aphA3* : kanamycine, *ble* : phléomycine, *cat* : chloramphénicol, *erm* : erythromycine, *spc* : spectinomycine,

^a : Lc représente *Lactobacillus casei*

^b : QB7101 est identique à la souche QB7102, sauf que *crh* est interrompu par une cassette spectinomycine au lieu d'une cassette néomycine.

Les principaux gènes et leurs protéines correspondantes utilisés dans cette étude, sont listés dans le tableau 9.

Gène	Protéine codée
<i>ptsH</i>	HPr
<i>ptsI</i>	EI
<i>ptsG</i>	EIIA
<i>hprK</i>	HprK/P
<i>prfA</i>	PrfA
<i>ccpA</i>	CcpA

Tableau 9 : Liste des gènes et des protéines codées correspondantes utilisés dans cette étude

III.2. Méthodes concernant l'ADN

III.2.A. Extraction de l'ADN chromosomique de *B. subtilis*

4 ml de culture en phase exponentielle ou stationnaire sont centrifugés pendant 5 min à 14000 rpm. Le culot est ensuite dissout dans 180 µl de Tris/HCl 10 mM pH7.4. 60 µl de lysozyme 20 mg/ml et 10 µl de RNase 1 mg/ml sont rajoutés au mélange réactionnel, qui est incubé 10 à 20 min à 37°C. 60 µl de SDS 10% est rajouté puis la suspension cellulaire est inversée 5 à 6 fois. 60 µl de perchlorate de sodium 5M est ensuite rajouté et le mélange réactionnel est bien agité. On ajoute ensuite 120 µl de phénol saturé à l'eau, on inverse plusieurs fois puis on centrifuge 5 min à 14000 rpm. Après avoir récupéré la phase supérieure, on rajoute 200 µl de chloroforme isoamylique, puis on agite rigoureusement et on centrifuge 5 min à 14000 rpm. On récupère la phase supérieure, on lui rajoute 600 µl d'éthanol absolu glacial, on inverse 20 à 30 fois, l'ADN va apparaître sous forme d'une pelote. Cette dernière est alors repêchée et lavée avec 200 µl d'éthanol 70%. On aspire le maximum d'éthanol et on laisse sécher la pelote d'ADN au speed vacuum, puis on reprend l'ADN dans de l'eau stérile, on agite aux doigts et on incube 5 min à 65°C afin de dissoudre l'ADN et de tuer les nucléases restantes.

III.2.B. Extraction d'ADN chromosomique de *L. monocytogenes*

80 ml de BHI sontensemencés avec 1 ml d'une préculture de nuit de *L. monocytogenes*. Incuber à 37°C sous agitation. Suivre la DO₆₀₀. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 0.8, la suspension bactérienne est transvasée dans deux tubes et centrifugée 10 min à 5000 rpm. Le culot est suspendu dans 4 ml de TEN (0.1 M Tris/HCl pH8 ; 0.1 M EDTA ; 0.15 M NaCl) auquel on rajoute 2 mg/ml de lysozyme dissout dans du TEN et on incube 30 min à 37°C. Les protéines sont précipitées en incubant 30 min à 65°C puis 200 µg/ml de RNase (DNase free) est rajouté. Le mélange est incubé 15 min à 50°C. 500 µl de SDS 10% (1% final) ainsi que 3.35 mg/ml de protéinase K dissoute dans du TEN sont rajoutés à la suspension bactérienne qui est incubée pendant une heure à 60°C. On rajoute par la suite 0.5 volume de phénol, on mélange et on attend quelques minutes avant de centrifuger 30 min à 7000 rpm. Après avoir récupéré la phase aqueuse, précipiter l'ADN à l'éthanol absolu (2.5 vol), puis pêcher la pelotte à l'aide d'une pipette Pasteur. Laisser sécher quelques minutes avant de resuspendre l'ADN dans 600 µl de TE 10 mM, et l'incuber 30 min à 65°C.

III.2.C. « Miniprep » de plasmide à partir d'*E. coli* : protocole Qiaprep-spin Plasmid kit (Qiagen)

Ce protocole permet de purifier jusqu'à 20 µg de plasmides à partir de 1,5 ml de culture d'*E. coli* en milieu liquide. Il est réalisé en suivant les recommandations du fournisseur.

III.2.D. PCR sur ADN génomique ou plasmidique

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sur ADN chromosomique ont été réalisées à l'aide des thermocycleurs (DNA Perkin Elmer 9600, MJ Research Minicycler et Mastercycler Personal Eppendorf) et d'une des trois ADN polymérases suivantes, l'Ex-taq et la Pyrobest (Takara), ou la *Taq* (Amersham). Ces enzymes ont été utilisées selon les instructions du fournisseur, en présence de 100 ng de matrice d'ADN génomique ou de 10 ng de plasmide. L'Ex taq et la *Taq* sont utilisées pour les PCR contrôles alors que la Pyrobest qui présente une plus grande fidélité est utilisée pour amplifier les fragments d'ADN qui sont utilisés pour les clonages.

<i>oligo</i>	<i>Séquence</i>	<i>Enzyme de restriction</i>	<i>Plasmide</i>
<i>YvLDF</i>	<i>GTTGGATCCTAGGCGTAATAATTAAC</i>	<i>BamHI</i>	<i>pMAD</i>
<i>YvLDR</i>	<i>ATGAAGCTTCCTCCAAATGAATTATAAAA</i>	<i>HindIII</i>	<i>pMAD</i>
<i>HprKLCR</i>	<i>GGTAAGCTTCATGGCAGACAGCGTGAC</i>	<i>HindIII</i>	<i>pMAD</i>
<i>HprKLCF</i>	<i>ATCGAATTCAGTGCTAATAACAAGTTATT</i>	<i>EcoRI</i>	<i>pMAD</i>
<i>CamF</i>	<i>TGAGAATTCCCGCAGGGCAATAGTTAC</i>	<i>EcoRI</i>	<i>pMAD</i>
<i>CamR</i>	<i>AAAAAGCTTAGTCGGCATTATCTCATA</i>	<i>HindIII</i>	<i>pMAD</i>
<i>LgtF</i>	<i>AGTAAGCTTTTTGAAAGTAGGGGAATTA</i>	<i>HindIII</i>	<i>pMAD</i>
<i>LgtR</i>	<i>AACAGATCTAAGTACATTCCACAAACTC</i>	<i>BglII</i>	<i>pMAD</i>
<i>RH1</i>	<i>AATGGATCCATTCACGCACGCCCGCAACTCTATTGGTG</i>	<i>BamHI</i>	<i>pMAD</i>
<i>RH2</i>	<i>CTTTCTCACGAATTCGTGAGAAAGAACACGTTTACGCAC</i>	<i>EcoRI</i>	<i>pMAD</i>
<i>RH3</i>	<i>TTTAAGCTTACAAAACGTTACCATACCTAGAACTTCCTG</i>	<i>HindIII</i>	<i>pMAD</i>
<i>RH4</i>	<i>GGAAGCCATGGTTATTCTGCAGTATATTTTTCAAC</i>	<i>NcoI</i>	<i>pMAD</i>
<i>ICAMF</i>	<i>CGGTAAAGCGAATTCGTGAGAAAGAACAC</i>	<i>EcoRI</i>	<i>pMAD</i>
<i>ICAMR</i>	<i>GAGATAATGAAGCTTAAAAACGTTACCATACCTAG</i>	<i>HindIII</i>	<i>pMAD</i>
<i>Primer A</i>	<i>GGTCTAGACGATTGGGGGATGAGAC</i>	<i>XbaI</i>	<i>pAG58-ble-1</i>
<i>Primer B</i>	<i>GGGTCGACCAGCTCTTCTTGGTGAAG</i>	<i>SalI</i>	<i>pAG58-ble-1</i>

Tableau 10 : Liste des oligonucléotides utilisés pour construire les plasmides pI2, pIWT7, pRHptsI, et pAG58PrfA*

<i>oligo</i>	<i>Séquence</i>
<i>YVLDf2</i>	<i>ATAGCTGCTATCATTATTCCG</i>
<i>LGTR2</i>	<i>AAATAACTCCCCACGGCGAAT</i>
<i>ED1</i>	<i>GAAGATCTAATGGCACAAAAACATTTAAAGTAACTGCAGATTCTGGAAT</i> <i>CCAAGCTCGTCCTGCG</i>
<i>ED2</i>	<i>AAAACCTGCAGGCACCAATCCCTTTTAATTCTTGC</i>
<i>ED4</i>	<i>GGGGAGATCTTATGGTTCAACAGAAAGTGGAAAGTTCGATTAAAGA</i>
<i>ED17</i>	<i>AACTTCTTCTTGAACGTAAGCAGCCAGC</i>

Tableau 11 : Liste des oligonucléotides utilisés pour vérifier des mutants de *B. subtilis* et *L. monocytogenes*

<i>oligo</i>	<i>Séquence</i>	<i>Enzyme de restriction</i>	<i>Plasmide</i>
<i>PrfA1</i>	<i>ACATGCATGCACATGAACGCTCAAGCAG</i>	<i>SphI</i>	<i>pQE30</i>
<i>PrfA2</i>	<i>ACGCGTCTGACTTAATTTAATTTTCCCC</i>	<i>SalI</i>	<i>pQE30</i>
<i>PrfA3</i>	<i>CATGCCATGGACATGAACGCTCAAGCAG</i>	<i>NcoI</i>	<i>pQE60</i>
<i>PrfA4</i>	<i>GGAAGATCTTTAATTTAATTTTCCCC</i>	<i>BglII</i>	<i>pQE60</i>
<i>PrfA5</i>	<i>GGAAGATCTATGAACGCTCAAGCAGAAG</i>	<i>BglII</i>	<i>pQE70</i>
<i>PrfABsF</i>	<i>CTAGTCTAGAAAAAGGAGAATGATAAAAATGAGACATCACCATCACC</i> <i>ATCACATGAACGCTCAAGCAGAAGAATTCAAAA</i>	<i>XbaI</i>	<i>pHT315</i>
<i>PrfABsR</i>	<i>AACGAGCTCTTAATTTAATTTTCCCCAAGTAGCAGGACA</i>	<i>SalI</i>	<i>pHT315</i>
<i>PromPrfAF</i>	<i>GGAAGATCTTTCCGAAGTTTATTCTTGAC</i>	<i>BglII</i>	<i>pDG268neo</i>
<i>PromPrfAR</i>	<i>CGCGGATCCGTGATGGTGATGGTGATGTCTCATCTGTTTGCACCTC</i> <i>CTTTTGGACTAAGC</i>	<i>BamHI</i>	<i>pDG268neo</i>
<i>PrfApromo268</i>	<i>GACATCACCATCACCATCACGGATCCATGAACGCTCAAGCAGAAGA</i>	<i>BamHI</i>	<i>pDG268neo</i>
<i>PrfA268F</i>	<i>GGAAGATCTATGAACGCTCAAGCAGAAGA</i>	<i>BglII</i>	<i>pDG268neo</i>
<i>PrfA268R</i>	<i>GGGATCGATTTAATTTAATTTTCCCCAAG</i>	<i>ClaI</i>	<i>pDG268neo</i>
<i>HPrK/PLMOF</i>	<i>GAAGATCTTCATTTGGAGTACTTGCATGACAAAAT</i>	<i>BglII</i>	<i>pQE30</i>
<i>HPrK/PLMOR</i>	<i>CGCGGAGAAGCTTTCACTATTTATTTAATC</i>	<i>HindIII</i>	<i>pQE30</i>
<i>LIMOHPrF</i>	<i>GCGGGATCCATGGAACAAGCAAGTTTGTGA</i>	<i>BamHI</i>	<i>pQE30</i>
<i>LIMOHPrR</i>	<i>CGGGGTACCTTATTACGCCAATCCTCTTT</i>	<i>KpnI</i>	<i>pQE30</i>

Tableau 12 : Liste des oligonucléotides utilisés pour cloner différents gènes comme *prfA*, *hprK* et *ptsH* dans les vecteurs d'expression correspondants

Différentes types d'amorces ont été utilisées. Certaines, homologues à 100% avec la séquence, sont utilisées lors des expériences de PCR contrôles et pour synthétiser les sondes. La température d'hybridation (T_m) de ces amorces est calculée selon la formule théorique de Wallace $T_m=2(A+T)+4(G+C)$ (Wallace *et al.*, 1979). D'autres amorces ont été conçues de manière à ajouter au niveau des extrémités des amplimères des sites de restriction, ceci afin de faciliter leur insertion dans les plasmides. La liste des oligonucléotides est présentée dans les tableaux 10, 11, et 12.

III.2.E. Electrophorèse de l'ADN

L'ADN plasmidique, chromosomique ou les produits PCR sont analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Ces gels sont préparés à partir de tampon TAE (Tris/acétate 40 mM; EDTA 1 mM) où la concentration en agarose varie de 0,6% à 1,5%, suivant la taille des fragments d'ADN considérés. Ces gels contiennent du bromure d'éthidium (BET) (20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) pour permettre la visualisation de l'ADN sous UV. Les

paramètres de migration (voltage, ampérage) sont adaptés en fonction de la taille du gel et de la résolution désirée.

III.2.F. Purification des produits de PCR : kit Qiaquick

Le matériel utilisé est le kit Qiaquick PCR Purification Kit de Qiagen, et le protocole suit les recommandations du fournisseur.

III.2.G. Purification d'une bande d'ADN sur un gel : QIAquick Gel Extraction Kit

L'ADN à purifier ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire, sont migrés sur un gel d'agarose « low melting ». Le fragment d'ADN correspondant à la taille attendue, est découpée sous lumière UV de faible énergie puis coupé en petits morceaux qui sont déposés dans un tube Eppendorf après l'avoir pesé à vide. Le volume d'agarose estimé en pesant le tube Eppendorf, puis 3 volumes de NaI sont rajoutés et le mélange est incubé 20 min à 55°C jusqu'à la dissolution complète de l'agarose. Laisser revenir à TA en mettant le tube 5 min à la paillasse. 10 µl de billes sont ensuite rajoutés, puis le mélange est homogénéisé par retournement, laissé 10 min à TA puis centrifugé 1 min à 14000 rpm ; le surnageant est éliminé, alors que le culot est lavé avec 500 µl de New-Wash (tampon dont la formule n'est pas livrée par le fabricant), puis centrifugé 1 min à 14000 rpm. Répéter cette étape deux fois. Le fragment d'ADN adsorbé sur les billes est élué en reprenant le culot dans 2 volumes d'eau distillée stérile, qu'on centrifuge. Le surnageant contenant l'ADN est alors récupéré.

III.2.H. Digestions et ligatures

Les endonucléases de restriction proviennent de chez New England Biolabs, Gibco-BRL/Invitrogen et Promega. Elles ont été utilisées dans les conditions (sels et température d'incubation) préconisées par les fournisseurs. Lorsque cela a été nécessaire, l'enzyme de restriction a été inactivée par la chaleur ou éliminée par une purification de l'ADN sur une colonne QIAquick (Qiagen) qui permet d'éliminer les enzymes, les sels et les oligonucléotides libérés lors de la coupure.

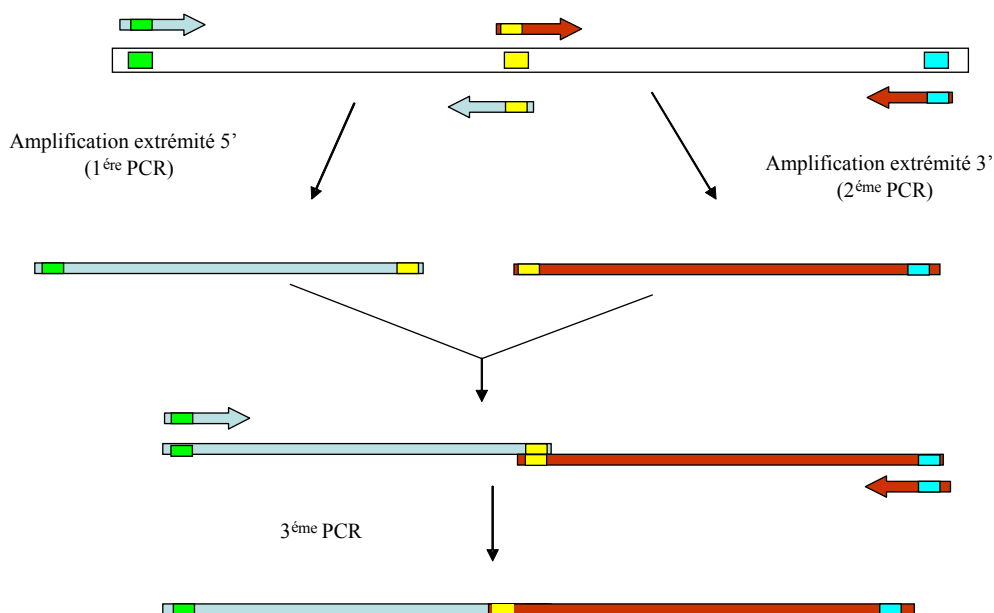
La T4 DNA ligase, utilisée pour les ligatures, provient de chez Gibco-BRL/Invitrogen et a été utilisée suivant les recommandations du fournisseur.

Nombre de cycle(s)	Température (°C)	Durée (min)
1	90	1
	80	0,1
	50	2
	72	10
	90	1
	50	2
30	72	3
	90	0,5
	53	0,5
1	72	2
	72	5

Tableau 13 : Programme PCR type utilisé pour effectuer une ligation par PCR

III.2.I. Ligation par PCR

Fig. 39 : Ligation par PCR



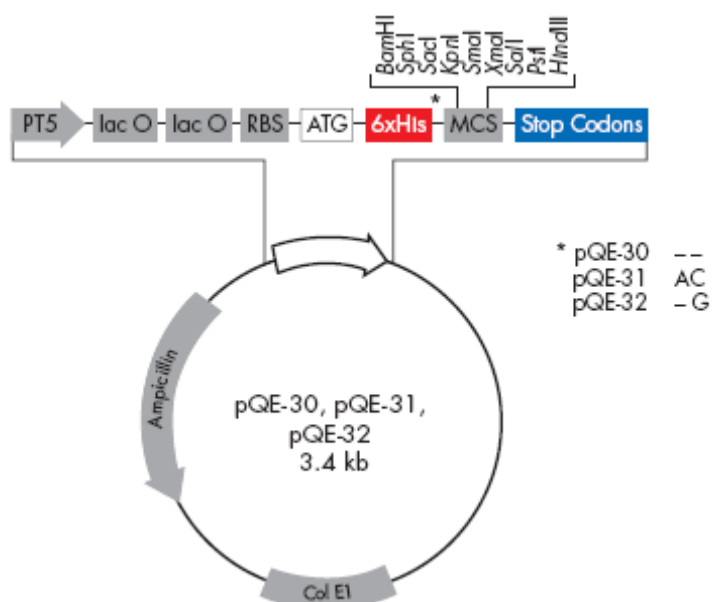
Dans un premier temps une PCR est réalisée avec deux oligonucléotides qui permettent d'amplifier un premier amplimère, un des deux oligonucléotides permet d'insérer un site de restriction à l'extrémité 5', l'autre portant une région de chevauchement au niveau du second amplimère. Dans un second temps une autre PCR est réalisée permettant d'amplifier un second amplimère, en utilisant un oligonucléotide portant un site de restriction à l'extrémité 5' et un autre qui comporte région de chevauchement avec le premier amplimère. Enfin une troisième PCR est effectuée en utilisant comme matrice les deux

produits PCR précédents et le couple d'oligonucléotides s'hybridant l'un à l'extrémité 5' du premier produit PCR et l'autre à l'extrémité 3' du second. Le programme utilisé pour l'amplification de ce dernier produit PCR nécessite une étape d'hybridation. Un programme type est présenté dans le tableau 13, il renferme une étape permettant l'hybridation entre les deux produits PCR (Tableau 13).

III.3. Plasmides

Les vecteurs permettant la surexpression des différents gènes codant HPr, HprK/P, PrfA, et EIIA ont été construits à partir du plasmide pQE30 (Qiagen).

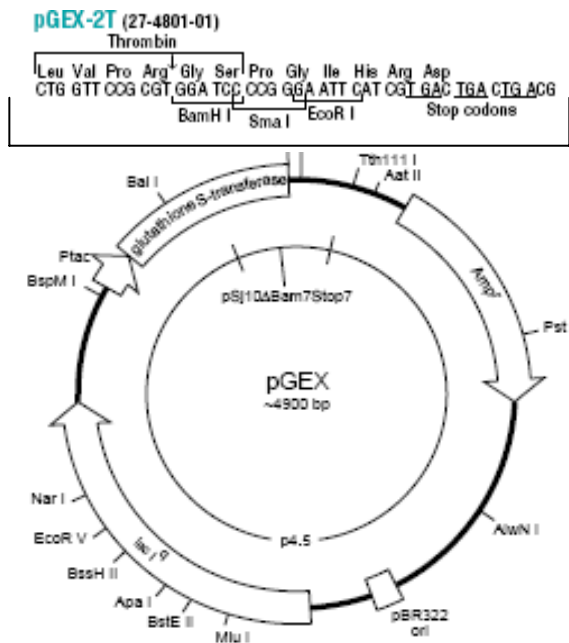
Fig. 40 : Représentation schématique du plasmide pQE30



pQE30 est un vecteur de surexpression possédant une origine de réplication de type ColE1 et le gène *bla* conférant la résistance à l'ampicilline. La transcription de l'ORF insérée dans le site multiple de clonage est placée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur fort T5 et d'un double opérateur *lacO*. En absence d'inducteur (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)), des tétramères du répresseur LacI se fixent sur les régions opératrices *lacO* et répriment l'expression du gène à surexprimer. Grâce à une induction par l'IPTG, ce plasmide permet la surproduction de protéines recombinantes portant une étiquette poly-histidines fusionnée à leur extrémité N-terminale. Les deux plasmides pQE60 et pQE70 sont similaires à pQE30 sauf que la queue poly-histidines permettent d'effectuer une queue à leur extrémité C-terminale.

Toutefois nous avons été amené à cloner certains gènes comme le gène *ptsH* dans le vecteur pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech). Ce plasmide possède le gène *bla* conférant une résistance à l'ampicilline et le gène *gst* codant la glutathione transférase, exprimé sous contrôle du promoteur « *tac* », ainsi qu'un site de clivage à la thrombine. La transcription du gène inséré dans le site multiple de clonage est placée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur *tac* et d'un opérateur *lacO*. Après une induction par l'IPTG, ce plasmide permet la surproduction de protéines recombinantes portant une étiquette GST (26kDa) fusionnée à leur extrémité C-terminale.

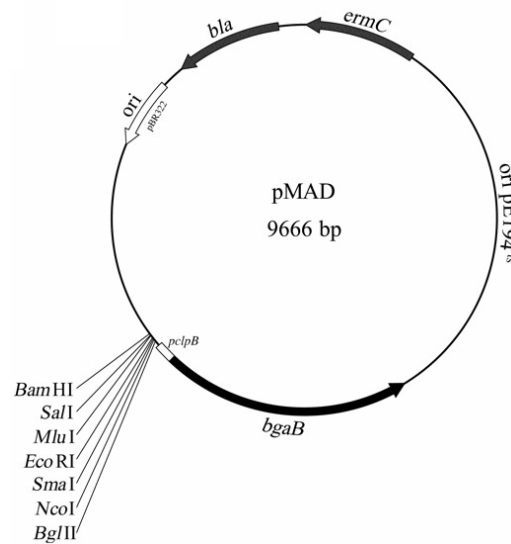
Fig. 41 : Représentation schématique du plasmide pGEX-2T



Le plasmide avec lequel nous avons tenté de produire PrfA-(His)₆ à partir de *B. subtilis*, est le pHT315 (Arantès and Lereclus, 1991). Ce plasmide est un plasmide répliatif chez *E. coli* et *B. subtilis* et possède un promoteur *lac* faible. Il est à 15 nombres de copie, et ne permet pas une production normale de protéines chez *B. subtilis*.

Le plasmide qui a été utilisé pour réaliser les constructions génétiques nécessaires pour l'obtention des mutants $\Delta ptsI$ et *hprKV267F* de *L. monocytogenes* est le pMAD (Arnaud *et al.*, 2004). Ce plasmide intégratif thermosensible, permet sur boîtes contenant du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), un criblage bleu/blanc (rapide) des bactéries qui ont perdu le plasmide facilitant ainsi la sélection des clones durant la construction des mutants potentiels (Fig. 42, 43).

Fig. 42 : Représentation schématique du pMAD



Construction des plasmides

A. pI2 et pIWT7

Le plasmide pI2 permet de substituer *hprK* de *L. monocytogenes* par *hprKV267F* de *L. casei*, en insérant également une cassette de résistance au chloramphénicol en aval de *hprK*. Ainsi deux régions homologues d'une taille approximative de 450 pb ont été amplifiées à partir de l'ADN chromosomique de la souche EGDe de *L. monocytogenes*. Il s'agit de séquences partielles ou complètes des gènes *ylD* et *lgt* de *L. monocytogenes*. Le gène *hprKV267F* a été amplifié à partir de l'ADN chromosomique de la souche TG101, alors que la cassette de résistance au chloramphénicol a été obtenue à partir du plasmide pTS223 (Gonzy-Tréboul and Steinmetz, 1987).

Les enzymes de restriction utilisées pour digérer le plasmide et/ou les amplicons sont : *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI et *Bgl*II. Deux à deux, les amplicons sont ensuite ligués par PCR (cf. ligation par PCR). Ensuite une ligation à trois fragments est réalisée en utilisant la T4 DNA ligase, permettant ainsi d'obtenir le plasmide pI2.

Ce dernier est un dérivé du pI2 à la différence que le gène *hprKV267F* de *L. casei* a été remplacé par le gène *hprK* sauvage de cette bactérie.

B. pRHptsI

Ce plasmide a été construit dans le but d'inactiver le gène *ptsI* de *L. monocytogenes* par insertion d'une cassette chloramphénicol qui a été amplifiée à partir du plasmide pTS223 et

digérée par *EcoRI* et *HindIII*. Ainsi deux régions homologues amont et aval de *ptsI* d'environ 700 pb ont été amplifiées à partir de l'ADN chromosomique de l'EGDe de *L. monocytogenes*, et ont été digérées respectivement par les enzymes *BamHI-EcoRI*, et *HindIII-NcoI*. Une ligation à quatre voies a été réalisée dont les acteurs étaient les deux régions homologues de *ptsI*, la cassette chloramphénicol et le plasmide pMAD digéré à son tour par le couple d'enzymes, *BamHI-NcoI*. Ainsi a été construit le plasmide pRHptsI.

C. pAG58prfA*

Ce plasmide a été construit dans le but d'introduire la mutation *prfAG145S* (*prfA**) dans le génome de *B. subtilis* BUG1195 (Sheehan *et al.*, 1995). Le gène *prfA** a été amplifié à partir de l'ADN chromosomique de la souche PAM 50 (Ripio *et al.*, 1997), fournie par Dr Carmen Buchrieser, et cela en utilisant deux amorces Primer A et Primer B permettant d'obtenir une copie de *prfA** dépourvue de son propre promoteur. Primer A est complémentaire de la région située à -18 nucléotides du codon d'initiation, et crée un site *XbaI* à l'extrémité 5' de *prfA** et le Primer B créant un site *SalI* à l'extrémité 3' de *prfA**, est complémentaire de la séquence située 114 nucléotides en aval du TAA, codon stop. Le produit de PCR a été digéré par les deux enzymes de restriction *XbaI* et *SalI*, puis cloné dans le plasmide pAG58-*ble-1* (Youngman, 1987) fourni par Dr Nancy Freitag. Ainsi nous avons obtenu le plasmide pAG58*prfA** qui permet d'introduire le gène *prfA** sous le contrôle du promoteur *Pspac* inductible à l'IPTG dans le génome de *B. subtilis* BUG1195.

III.4. Milieux de culture et croissance

Les milieux utilisés pour la croissance, la préparation des extraits totaux et les tests phénotypiques sont des milieux liquidesensemencés à 2% (volume/volume) à partir d'une culture de nuit dans différents milieux. Ces milieux sont le LB, le BHI, et les milieux minimums MM et HTM.

LB (Miller, 1972) (Difco)

-tryptone.....10g/l
-extrait de levure.....5g/l
-NaCl.....5g/l
-pH 7.5

MM : Milieu Minimum pour *B. subtilis*

Pour 150 ml de MM :

- 30 ml de solution C5X (KH₂PO₄ 20 g/l, K₂HPO₄ .3H₂O 80 g/l, (NH₄)₂SO₄ 16.5 g/l)
- 1.5 ml de solution III 100X (MgSO₄ 12.32 g/l, MnSO₄ 0.169 g/l)
- 0.75 ml de CAF 200X (citrate ammonium ferrique 4.4 g/l)
- Auxotrophe (Tryptophane) 0.5 %
- 3 ml de sucre 50%
- qsp 150 ml ou agar 2%

BHI (Difco, Difco laboratories, USA)

- cervelles de veau, infusion.....200 g/l
- infusion cœur de bœuf.....250 g/l
- peptone de protéase.....10 g/l
- dextrose.....2 g/l
- chlorure de sodium.....5 g/l
- phosphate disodique.....2 g/l

HTM : Milieu Minimal pour *L. monocytogenes*

- | | |
|---|--|
| -MOPS pH 7,4 100 mM | -Biotine 2,05 µM |
| -KH ₂ PO ₄ 4,8 mM | -Acide Lipoic 24 pM |
| -NA ₂ HPO ₄ 11,5 mM | -Cystéine 0,1 mg/ml |
| -MgSO ₄ 1,7 mM | -Méthionine 0,1 mg/ml |
| -Thiamine 2,96 mM | -(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,6 mg/ml |
| -Riboflavine 1,33 mM | -Sucre (glucose ou fructose) 55 mM |

Les milieux gélosés, pour les cultures en milieu solide, sont obtenus par ajout de 1,5% d'agar au milieu liquide BHI, LB, MM ou HTM.

Les cultures de *L. monocytogenes* sont réalisées en milieu Luria Bertani (LB) (Miller, 1972) (Difco) ou Brain Heart Infusion (BHI), contenant si nécessaire 25 mM de sucre (cellobiose ou glucose), 5 µg/ml de néomycine et/ou de chloramphénicol, et du charcoai 0.2%, sous agitation (170 rpm) à 37°C. Les cultures sont inoculées en raison de 2% à partir d'une préculture de nuit.

Les cultures en milieu liquide de *B. subtilis* sont réalisées à 37°C, sous agitation (170 rpm), en milieu LB, contenant si nécessaire du chloramphénicol 5 µg/ml, de la kanamycine 5 µg/ml, de l'érythromycine 5 µg/ml, de la phléomycine 5 µg/ml, et/ou de la spectinomycine 100 µg/ml, en fonction des marqueurs de résistance présents dans la souche. La concentration d'IPTG était de 0.05 mM. 1% de sucres répresseurs (glucose, fructose, cellobiose ou salicine) ont été rajoutés en cas de besoin afin de tester leurs effets respectifs sur l'activité de PrfA. Les cultures ont étéensemencées en raison de 2% à partir de préculture de nuit. Les premières densités optiques de croissance ont été prises après 3h de croissance bactérienne, et des extraits cellulaires ont été collectionnés toutes les 30 ou 60 min.

Les cultures en milieu liquide d'*E. coli* sont réalisées en milieu Luria Bertani (LB) (Miller, 1972) (Difco) sous agitation à 37°C. Les cultures sont inoculées à 2% à partir d'une préculture de nuit. Pour les souches d'*E. coli* contenant des plasmides, les cultures sont réalisées en présence de 50 ou 100 µg/ml d'ampicilline (ou 25 µg/ml de kanamycine pour le pET28a). De l'IPTG 1mM est généralement rajouté au milieu de culture d'*E. coli*, pour induire l'expression des gènes codant les protéines de fusion à partir des vecteurs d'expression.

La croissance des différentes souches utilisées est suivie en mesurant l'absorbance de la culture à une longueur d'onde de 600 nm

III.5. Conservation des souches

Les souches d'*E. coli*, et de *L. monocytogenes* sont conservées par congélation à -80°C, à partir de cultures en phase stationnaire de croissance obtenues en LB et/ou BHI additionnées de glycérol (15% final {m/v}), avec l'antibiotique adéquat.

D'autre part, les souches de *B. subtilis*, sont stockées sous forme de spores et conservées à 4°C.

III.6. Méthodes concernant les cellules

III.6.A. Préparation des extraits totaux de cellules (*B. subtilis* et *L. monocytogenes*)

Les cultures de *B. subtilis* ou de *L. monocytogenes* sont arrêtées la DO_{600} voulue, et centrifugées à 4°C à 5000 rpm pour les échantillons de 40 ou 50 ml. Les culots sont lavés avec le tampon Tris/HCl pH 7.4 50 mM s'ils servent à des expériences de Western blot ou à des tests de l'activité 6-phospho- β -glucosidase, soit avec du tampon Z (cf test de l'activité β -galactosidase), soit avec du tampon Gus (cf test de l'activité β -glucuronidase). La lyse des culots bactériens de *B. subtilis* se fait avec du LD (Lysosyme 1mg/ml + DNase 5 μ g/ml, dissouts dans l'eau stérile et distillée). Les culots sont par la suite soniqués (6x30 pulses espacés de 30 sec), et centrifugés à 4°C, 10 min à 14000 rpm. Après sonication les cellules sont centrifugés 10 min à 14000 rpm et à 4°C. Pour le test 6-phospho- β -glucosidase, les culots bactériens de *B. subtilis* et de *L. monocytogenes* ne sont pas lysés par sonication mais traités au toluène 0.1% puis centrifugés. Les surnageants contenant les extraits bactériens sont récupérés et stockés à -20°C pour les Westerns blots ou tout de suite utilisés pour les tests enzymatiques.

III.6.B. Préparation de cellules électrocompétentes d'*E. coli*

Inoculer un litre de LB avec 1% de volume d'une préculture de nuit et incuber avec forte agitation à 37°C jusqu'à $DO_{600} = 0.5$ à 1 (environ 3 h 30 min). Mettre sur la glace 15 à 30 min, centrifuger avec un rotor froid 15 min à 4000 g. Resuspendre le culot dans 1 litre d'eau froide stérile puis centrifuger 15 min à 4000 g. Reprendre le culot dans 0.5 litre d'eau froide, puis centrifuger 15 min à 4000 g. Resuspendre le culot dans environ 20 ml de glycérol 10% froid, puis centrifuger 15 min à 4000 g. Reprendre le culot dans un volume final de 2 à 3 ml de glycérol 10%, la concentration de cellules doit être environ de 3.10^{10} cellules/ml. Congeler en aliquotes de 100 μ l à -70°C.

III.6.C. Électroporation de cellules compétentes d'*E.coli*

Dans un tube Eppendorf stérile, 1 μ l d'ADN est mélangé à 50 μ l de cellules électrocompétentes. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation froide (distance des électrodes est de 0.2 cm) et puis déposé sur glace (1 min). Le choc électrique

est réalisé à l'aide du Gene Pulseur (Bio-Rad) sous les paramètres suivants : 2.5 KV, 25 μ F, 200 Ω . Immédiatement après le choc électrique, les cellules sont resuspendues dans 1 ml de milieu LB puis incubées à 37°C pendant 1 h 30 min. Etaler sur gélose LB contenant l'antibiotique approprié et éventuellement 0.002% de X-Gal et 0.1 mM d'IPTG.

III.6.D. Milieux Minimums pour préparer des cellules compétentes de *B. subtilis*

MM 1x: (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, citrate de sodium (trisodique) 1g/l, K₂HPO₄ 14g/l, KH₂PO₄ 6g/l, Mg SO₄ 7H₂O 0,2g/l, pH7

MG: 20ml MM 1x, 0,2 ml Glucose 50%, 32 μ l MgSO₄ 1M

MG1: 19 ml MG, 0,1 ml hydrolysats de caséines 5 %, 0,4 ml yeast extract 5%, 0,2 ml tryptophane 2.5 mg/ml, 0.2 ml auxotrophe 5 mg/ml

MG2 : 19 ml MG, 0,05 ml hydrolysats de caséine 5%, 0.1 ml yeast extract 5%, 0,05 ml MgSO₄ 1M, 0,05 ml Ca(NO₃)₂ ou 100 μ l CaCl₂ 0.5 M

MG3: 4 ml H₂O, 500 μ l MM 10x, 50 μ l EGTA 100 mM, 100 μ l MgCl₂ (rajouté extemporanément)

Tous les milieux sont préparés puis conservés à -20°C. Lors de la préparation des cellules compétentes, décongeler les milieux en les mettant à 4°C.

III.6.E. Préparation des cellules compétentes de *B. subtilis*

Ensemencer à partir d'une préculture de nuit de *B. subtilis*, 2ml de MG1 et faire pousser à 37°C avec agitation (170 rpm) pendant 4 h 30 min ou 5 h jusqu'à ce que la culture soit trouble. Diluer 10 fois dans du MG2 (mettre 200 μ l de la culture MG1 dans 2ml de MG2), et incubé pendant 1 h 30 min à 37°C avec agitation. Aliquoter la culture MG2 en raison de 200 μ l par tube Eppendorf et utiliser directement pour la transformation ou suivre le protocole pour congeler les cellules compétentes.

III.6.F. Transformation des cellules compétentes de *B. subtilis*

Aux 200 μ l de cellules compétentes, sont ajoutées différentes quantités d'ADN (1 ou 2 μ l d'ADN pur, 1 ou 2 μ l d'ADN dilué 10 fois, 1 ou 2 μ l d'ADN dilué 100 fois et dans un tube 1 ou 2 μ l d'eau en guise de témoin négatif). Mettre à agiter (170 rpm) pendant 30 min puis étaler les 200 μ l sur une gélose LB contenant l'antibiotique adéquat, et incubé à 37°C.

III.6.G Préparation des cellules compétentes de *L. monocytogenes*

100 ml de BHI sont ensemencés avec 1% de préculture de nuit de *L. monocytogenes*. Faire pousser à 37°C sous agitation (180 rpm) jusqu'à ce que la DO de croissance (DO₆₀₀) atteigne 0.2. Rajouter de la pénicilline G 0.10 µg/ml et laisser pousser encore 2h jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit de 0.8-0.9. Centrifuger les cellules à 4000 rpm pendant 20 min dans des tubes Falcon stériles puis laver le culot plusieurs fois (1xvolume égal, 2x2/3 volume, 1x1/3 volume) avec du tampon EPB (816 mM sucrose, 1 mM MgCl₂.6H₂O, pH 6.5-7) glaciale. Resuspendre les bactéries dans 1 ml d'EPB, la concentration finale des cellules est de l'ordre de 10¹¹/ml. Aliquoter en raison de 100 µl par tube Eppendorf.

III.6.H. Électroporation des cellules compétentes de *Listeria*

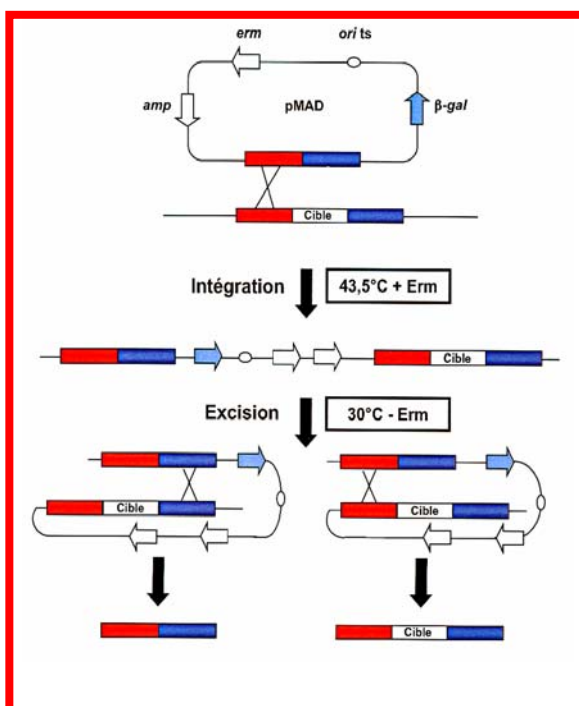
Aux 100 µl de cellules compétentes sont rajoutés 200 ng d'ADN et les bactéries sont électroporées à 2.4 KV, 200 ohms et 25 µF. Le mélange est transféré immédiatement dans un tube contenant 900 µl de BHI et incubé à 37°C (30°C dans le cas du pMAD) pendant 3h avant d'étaler sur des géloses contenant les antibiotiques nécessaires à la sélection.

Essais de construction de mutants de *L. monocytogenes* à l'aide du vecteur pMAD :

Les *Listeriae* électroporées sont étalées sur des géloses BHI contenant 5µg/ml d'érythromycine et 50 µg/ml d'X-Gal, puis incubées à 30°C (température permissive pour la répllication du pMAD) pendant 2 à 4 jours. Une colonie bleue est réisolée sur gélose BHI contenant 5µg/ml d'érythromycine et 50 µg/ml d'X-Gal, qu'on incube 1 à 2 jours à 30°C. Une colonie bleue est réisolée dans 100 µl de BHI, qui sert à inoculer 10 ml de BHI/ERY5 contenus dans un Erlenmeyer de 100 ml de capacité. La culture est incubée pendant 24 h à 43.5°C sans agitation (température restrictive permettant l'enrichissement de la culture en bactéries ayant intégré une copie du plasmide dans leur chromosome), puis 100µl de différentes dilutions de la culture précédente sont étalés sur gélose BHI/ERY5 et incubés à 43.5°C. Ces clones doivent posséder une copie du pMAD intégrée dans leur chromosome. Une colonie bleu pâle est isolée dans 100 µl de BHI et 1 µl de cette suspension sert à inoculer 10 ml de BHI (sans antibiotique) déposés dans un Erlenmeyer de 100 ml de capacité. La culture est incubée à 30°C pendant 24 h sans agitation. Cette étape permet l'excision du plasmide du chromosome, conduisant théoriquement à un échange allélique avec le gène inséré dans le plasmide dans 50% des cas. La culture est diluée au 1/10 et l'absorbance est mesurée à DO₆₀₀ nm. 1 µl de cette culture est utilisé pour inoculer 10 ml de

BHI comme précédemment. La culture est incubée à 43.5°C pendant 24 h. 10 séries de dilution (100 µl de culture + 900 µl de PBS (phosphate buffered saline)) sont préparées, et 50 µl des dilutions 10⁻⁴, 10⁻⁵ et 10⁻⁶ sont étalés sur gélose BHI/XGAL50 qu'on incube à 43.5°C pendant 24 ou 48 h. Une colonie blanche correspondant au mutant est sélectionnée. Une autre technique de sélection a été mise au point dans le laboratoire du Dr Axel Hartke. Il s'agit d'enrichir la culture en bactéries ayant intégré une copie du plasmide dans leur chromosome, et cela en faisant 2 cultures successives de nuit (50 µl dans 10 ml) en milieu liquide BHI/ERY5, et ensuite 5 ou 6 cycles de : culture liquide en milieu BHI (50 µl dans 10 ml) sans antibiotique incubée 4 h à 30°C et toute la nuit à 43.5°C. Au bout du 6^{ème} cycle, préparer des séries de dilution dans du PBS et suivre le protocole traditionnel. Il est préférable que les constructions réalisées dans le pMAD ne comportent pas une pression de sélection supplémentaire (antibiotique), ou alors il serait plus judicieux d'utiliser le marqueur de sélection pour vérifier les mutations et non pas les sélectionner. Le même protocole a été réalisé en milieu LB et il s'est avéré moins efficace vu que ce dernier est moins riche que le BHI. La quantité de XGal (50 µg/ml) a été occasionnellement augmentée (lors de la sélection des bactéries ayant intégrée une copie du pMAD dans leur chromosome) afin de mieux distinguer les clones bleus/blancs. Il est préférable de tester le phénotype bleu/blanc des constructions réalisées à l'aide du pMAD sur *E. coli* avant de passer à *Listeria*.

Fig. 43 : Protocole de mutagenèse avec le pMAD



III.7. Méthode de criblage des transformants, intégrants ou mutants

III.7.A. Résistance aux antibiotiques

Les mutations portant des gènes de résistance à proximité ont été sélectionnées en faisant pousser les bactéries sur LB ou BHI contenant l'antibiotique approprié.

III.7.B. PCR

Certaines interruptions de gènes ont été vérifiées par PCR sur l'ADN génomique, de même que les constructions plasmidiques ont été vérifiées par PCR sur plasmide en utilisant des amorces spécifiques des mutations ou aussi des amorces correspondant au début et fin du site multiple de clonage du plasmide (par exemple, FPQE et DPQE pour pQE30).

Les PCR sur colonies ont été réalisées pour identifier les clones positifs (correspondants au génotype attendu) aussi bien pour les mutants de *B. subtilis* que pour *L. monocytogenes*. Pour *L. monocytogenes*, 5 ml de culture en phase exponentielle sont centrifugées puis repris dans 500 µl de Tris/HCl pH7.4 50 mM. Environ 100 µl de billes (0.4 µm de diamètre) sont rajoutées et le mélange est vortéxé vigoureusement pendant 1 min. 1 ou 2 µl de ce mélange sont utilisés pour la PCR.

Une autre technique a été également utilisée pour tenter une PCR sur colonie de *L. monocytogenes*. Il s'agit de reprendre une colonie isolée dans 100 µl d'eau stérile et faire chauffer le mélange au microonde (750 Watt) pendant 1 min. 1 µl du mélange est utilisé pour la PCR.

Une troisième et dernière technique utilisée consiste à reprendre 1 colonie isolée dans 50 µl d'eau distillée stérile. Les 50 µl sont transférés sur des disques formés de papier Wattmann FTA et laissés sécher 2 h à 37°C ou 40 min à 45°C. Les disques sont ensuite lavés au TE20 (Tris/HCl pH 7.4 10 mM, EDTA 1 M, Triton 0.2 %) puis 3 fois à l'eau distillée stérile, pour être ensuite séchés. Chaque disque est découpé en plusieurs petites disquettes dont chacune sera utilisée (1 ou 2 fois maximum) comme matrice lors des réactions de PCR.

III.7.C. Séquençage

Les mutations ponctuelles sont vérifiées par séquençage réalisé chez la société Génome Express.

III.7.D. Croissance en milieu minimum

Les interruptions ou mutations ponctuelles des gènes du PTS ont été vérifiées en faisant croître les bactéries sur milieu MM+sucre. Par exemple les mutants *hprKV267F* cultivés sur MM + mannitol 0,2 %, forment des petites colonies en comparaison à la souche sauvage. Ainsi le phénotype de croissance diffère entre souche sauvage et mutant.

-Test bleu/blanc

Le criblage bleu/blanc est utilisé lorsque le plasmide réplcatif ou intégratif utilisé possède une β -galactosidase (par exemple le cas du pMAD) (ou β -glucuronidase), ou que la mutation rajoutée renferme une fusion génique avec le gène rapporteur *lacZ* ou *gus* (par exemple, *hly-lacZ* dans BUG1199, ou *hly-gus* dans AML73).

Le test bleu/blanc est réalisée sur gélose sélective contenant du X-Gal (50 μ g/ml pour *L. monocytogenes*, et 400 μ g/ml pour *B. subtilis*), (ou du X-GlcA, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronide).

III.7.E. Southern Blot

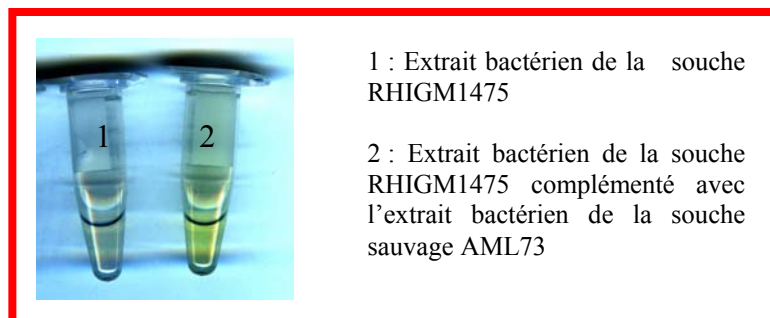
Ces tests sont utilisés pour vérifier si des clones de *L. monocytogenes* ont intégré la mutation *hprKV267F*. La sonde utilisée correspond à des fragments partiels ou complets du gène *cat* codant pour la résistance au chloramphénicol. L'ADN chromosomique de la souche de *L. monocytogenes* AML73 a été digéré avec différentes enzymes de restrictions, seules ou combinées (*HindIII*, *BamHI-BglII*, *EcoRV-BglII*, *EcoRI-SmaI*, *BamHI-SmaI*, *EcoRV-NcoI*, *NcoI-BglII*) et séparés sur gel d'agarose (0.8%) (Migration en tampon TBE 1x, toute la nuit à 50 V ou 5 h à 200 V) en présence d'un marqueur de poids moléculaire λ *EcoRI/HindIII* ou λ *BstEII* comme décrit par Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Les fragments d'ADN ont été transférés passivement sur une membrane de Nylon (Hybond N⁺, Amersham, USA) par capillarité en solution de SSCX20 (NaCl 3 M; tri-sodium citrate 0,3 M pH 7). Les sondes utilisées pour détecter le fragment d'intérêt sont des sondes oligonucléotidiques marquées par l'accrochage de molécules de α [³²P] dCTP. Cette réaction est réalisée grâce à l'ADN polymérase (Amersham), selon les recommandations du fournisseur, en utilisant 2 à 4 μ Ci de α [³²P] dCTP et 10 pM d'oligonucléotides. L'hybridation des fragments d'ADN avec la sonde est réalisée en préincubant pendant 1 h, à la température d'hybridation (60°C) dans une solution d'hybridation (Na₂HPO₄ 0,25 M; Na₂HPO₄ 0,25 M; SDS 5%), la membrane de Nylon portant les ADN transférés en présence

de sperme de poisson (100µg/ml) pour la saturer. La sonde marquée est alors ajoutée et l'incubation est poursuivie toute la nuit. La sonde en excès est ensuite éliminée par deux lavages successifs à la température d'hybridation. Le premier lavage est réalisé avec une solution de SSCX2/SDS 0,1%, et le second avec une solution de SSCX0,2/SDS 0,1%. La membrane, protégée par un film de Cellophane, est alors placée contre un écran « Storage Phosphore Screen » (Packard). Après un temps variable, l'écran est lu sur « Cyclone™ » (Packard).

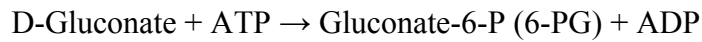
III.7.F. Test de complémentation fonctionnelle du PTS spécifique des β -glucosides

Ce test a permis de cribler des clones des différentes étapes de transformation de l'AML73 de *L. monocytogenes* avec le plasmide pRHptsI. La souche GM1475 dans laquelle l'expression de *bglP* est constitutive quand le PTS est fonctionnel, a été utilisée pour effectuer ce test. Ainsi des cultures des souches GM1475 (Témoin positif), RHIGM1475, et des différents clones de l'AML73, ont été arrêtées à $DO_{600} = 0.9-1$. Les cultures sont ensuite centrifugées puis traitées au toluène 0.1% et rigoureusement vortexées pendant 3 min. 25 µl de ces extraits sont utilisés pour réaliser le test 6-phospho- β -glucosidase. Aux 25 µl d'extrait bactérien de RHIGM1475, sont rajoutés soit 25 µl de surnageant des différents clones de l'AML73, soit 25 µl de surnageant de GM1475 (témoin positif), soit 25 µl de surnageant de RHIGM1475 (témoin négatif). 5 µl de PEP 100 mM, 10 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 10 µl de β -glucosides 40 mM, et 2 µl d'HPr de *B. subtilis* 1,8 mg/ml, sont rajoutés au mélange réactionnel, dont le volume final est ajusté à 100 µl avec du tampon Z. Ce mélange est ensuite incubé à 37°C jusqu'à apparition d'une coloration jaune (Fig. 44). La réaction est par la suite arrêtée avec 50 µl de Na_2CO_3 1 M. Nous avons également complémenté l'activité PTS spécifique des β -glucosides du surnageant RHIGM1475, avec de l'EI purifiée de *L. casei*, en guise de témoin positif.

Fig. 44 : Test de complémentation de l'activité PTS spécifique des β -glucosides



III.7.G. Test de l'activité gluconate kinase



- Ensemencer à partir d'une préculture de nuit, 50 ml de LB contenant l'antibiotique adéquat, 5 ml de Tris/HCl pH 7.4 1M, et 5 ml de gluconate 10%.
- Incuber à 37°C en agitant, jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0.7-1.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 10 min, dans un rotor SS34 réfrigéré.
- Laver le culot 2 fois avec 100 mM Tris/HCl pH 7.4
- Reprendre le culot dans 1,25 ml de Tris/HCl pH 7.4 100 mM, ajouter 20 µl de lysozyme à 10 mg/ml et incuber à 37°C jusqu'à clarification de la suspension cellulaire.
- Soniquer (6x30 pulses espacés de 30 sec).
- Centrifuger pendant 10 min à 10000 rpm dans un rotor SS34 réfrigéré.
- Récupérer le surnageant pour le test de l'activité gluconate kinase.
- Préparer le mélange réactionnel suivant : 66 µl MgCl₂ 0.1 M, 66 µl ATP 50 mM, 40 µl NADP 40 mM, 500 µl Tris/HCl 100 mM pH 8, et 200 µl de surnageant.
- Incuber pour quelques minutes jusqu'à ce que l'absorbance à 340 nm se stabilise, puis rajouter 50 µl de gluconate de sodium 20 mM. Mesurer la cinétique réactionnelle à DO₃₄₀.

III.7.H. Test de l'activité inositol déshydrogénase



- Le surnageant contenant l'activité inositol déshydrogénase est préparé de la même façon que celui contenant l'activité gluconate kinase, à la différence que la culture est réalisée en présence de 5 ml d'inositol 10% et non pas de gluconate. Le mélange réactionnel nécessaire au test est le suivant : 500 µl de Tris/HCl pH 7.4 200 mM, 50 µl NAD 40 mM, 100 µl de surnageant, et 250 µl d'eau stérile.
- Attendre jusqu'à ce que la DO₃₄₀ se stabilise. Rajouter 100 µl de myo-inositol 100 mM et suivre la cinétique de la réaction à 340 nm.

III.7.I. Test de transfert de groupement phosphate

Certains mutants comme le mutant *ptsHI* ont été testés par transfert de phosphate radioactif vers les protéines mutées. Dans le mutant *ptsHI* (*ptsHS46A*), la sérine en position 46 de

HPr est remplacée par une alanine non phosphorylable. Ainsi en effectuant un test de phosphorylation de HPr par l'HPrK/P (de *L. casei*) ATP-dépendant (cf. test de phosphorylation), nous avons pu confirmer les mutants *ptsHI*.

III.8. Analyse phénotypique des mutants

III.8.A. Test de l'activité β -galactosidase

Faire pousser la souche BUG1199 de *B. subtilis* ainsi que ses mutants dérivés en LB avec 0.05 mM d'IPTG, et en présence de l'antibiotique adéquat (et du sucre approprié en cas de besoin). A partir de 3h de croissance, prélever des échantillons de 2ml toutes les 30 ou 60 min. Centrifuger les échantillons à 14000 rpm à 4°C pendant 5 min. Laver le culot avec du tampon Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 M ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04 M ; KCl 0.01 M ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 M ; β -mercaptoéthanol 0,05 M, pH final = 7). Procéder par série de tubes représentant la cinétique d'un même clone. Resuspendre les culots bactériens dans 0.5 ml de tampon Z. Ajouter 3 μl d'une solution contenant du lysozyme (10 mg/ml) et de la DNase (1 mg/ml). Inuber 15 min à 37°C. Vérifier que les préparations se sont bien éclaircies (lyse des bactéries). Si ce n'est pas le cas, poursuivre l'incubation quelques minutes. Centrifuger 3 min à 14000 rpm à 4°C pour sédimenter les débris cellulaires. Récupérer les surnageants correspondants aux extraits bruts bactériens puis les conserver à 4°C dans la glace. La réaction avec l'ONPG (orthonitrophényl- β -D-galactoside) se fait comme suit. Préparer la série de tubes suivante :

Tube témoin : 0.8 ml de tampon Z

Tube de dosage : (0.8-x) ml de tampon Z (x = volume de surnageant)

Utiliser 20 μl de surnageant pour une première série de dosage. Dans le cas où l'activité du surnageant serait trop forte pour la lecture de la DO_{420} , diluer 10 fois une aliquote et doser 20 μl de cette dilution. Dans le cas où l'activité serait trop faible, refaire un dosage avec 200 μl d'extrait bactérien. Mettre les tubes à 28°C pendant 5 min pour équilibrer la température. La réaction est déclenchée par addition de 0.2 ml d'une solution d'ONPG (4 mg/ml) maintenue à 28°C. Mélanger et noter le temps t_0 . Quand une coloration jaune suffisamment intense apparaît, arrêter la réaction en rajoutant 0.5 ml de Na_2CO_3 (1 M). Noter le temps de réaction. Régler le zéro de DO_{420} en utilisant le tube témoin ne contenant pas d'extrait bactérien. Lire la DO_{420} pour chaque tube de dosage.

Activité β -galactosidase = $(1,5 \times 1000 \times DO_{420}) / (t \times v \times C)$

DO_{420} est l'absorption de l'orthonitrophénol

t est le temps de la réaction en min

v est le volume en ml de l'extrait brut utilisé pour le dosage

C est la concentration des protéines en mg/ml obtenue en effectuant un test de Bradford sur 10 μ l de surnageant et d'une gamme étalon renfermant différentes concentrations connues de BSA (Bovine Sérum Albumine).

III.8.B. Test de l'activité β -glucuronidase

Faire pousser la souche AML73 de *L. monocytogenes*, dans 50 ml de BHI tamponné au MOPS pH 7.4 100 mM, en présence de néomycine 5 mg/ml, du sucre approprié (glucose ou cellobiose) en cas de besoin, et avec ou sans charcoale actif (0,2% masse/volume). Un échantillon de 40 ml est prélevé à $DO_{600} = 0,9-1$, puis centrifugés à 4°C pendant 10 min à 5000 rpm. Le culot bactérien est lavé avec du tampon Gus (Na_2HPO_4 0,06 M ; NaH_2PO_4 0,04 M ; KCl 0,01 M ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 M), puis soniqué 6x30 pulses espacés de 30 sec, puis centrifugé pendant 10 min à 14000 rpm et à 4°C. Pour le test de l'activité β -glucuronidase, nous procédons de la même façon que pour le test β -galactosidase, toutefois le tampon Z est remplacé par le tampon Gus dans les tubes de dosage et le tube témoin, et l'ONPG est remplacé par le *p*-nitrophenylglucoside. La lecture de la DO se fait à 405 nm.

III.9. Méthodes concernant les protéines

III.9.A. Purification de protéines par chromatographie d'affinité

Deux types de chromatographie d'affinité ont été utilisés en fonction du tag fusionné aux protéines d'intérêt. La purification des protéines portant une étiquette poly-histidine est réalisée par chromatographie sur une résine Ni-NTA agarose de Qiagen. Les protéines fusionnées à la GST sont purifiées par chromatographie sur une résine GST (Biolabs). Les tampons utilisés pour ces deux purifications sont indiqués dans le tableau 14.

Solution	Composition
Tampon A	Tris/HCL 50 mM pH 7,4; Na ₂ SO ₄ 50 mM; Glycérol 15%
Tampon B (Imidazol 30 mM)	90% Tampon A + 10% Tampon C
Tampon C (Imidazol 300 mM)	Tampon A + Imidazol 300 mM
Tampon G1	Tris/HCL pH 7,4 50 mM, 300 mM NaCl, glycérol 10%
Tampon G2	Tampon G1+Glutathione 50 mM

Tableau 14 : Solutions utilisées pour la purification des protéines portant une queue poly-histidines ou une queue GST

III.9.B. Purifications de protéines portant une queue poly-histidine

Les extraits cytoplasmiques sont préparés à partir des cellules d'une culture de 1 litre. Après lavage au Tris/HCl 50 mM pH 7,4, ce culot est repris dans 10 ml de tampon A complété en lysozyme (Sigma) 1 mg/ml et laissé 30 min à 37°C. Les cellules sont cassées par sonication (sur glace + eau) par 5 à 10 pulses de 30 sec espacés de 30 sec. De la DNase I (Roche) 5 µg/ml et de la RNase (Roche) 10 µg/ml sont ajoutées à l'échantillon qui est ensuite incubé 30 min à 37°C. Puis l'échantillon est centrifugé à 10 000 g pendant 25 min et le surnageant est déposé sur une colonne de 2 ml de Ni-NTA équilibrée au préalable par 10 volumes de colonne de tampon A. Après élution du surnageant, un premier lavage est effectué par 10 volumes de colonne de tampon A, suivi d'un deuxième lavage par 10 volumes de colonne de tampon B. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par fractions de 0,5 à 1 ml en tampon C. La présence de protéines dans ces fractions est détectée par le réactif de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS. Les fractions d'intérêt sont rassemblées puis dessalées par chromatographie d'exclusion sur une colonne PD-10 (Amersham Biosciences) (ou par dialyse contre l'ammonium bicarbonate 20 mM) et reprises dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4. Les protéines ainsi purifiées sont conservées à -80°C.

III.9.C. Purifications de protéines portant une queue GST

Les cellules sont cultivées dans un litre de LB en présence d'ampicilline, jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0.4-0.6. A ce stade, de l'IPTG 1mM est rajouté, pour permettre la transcription du gène codant la protéine fusionnée et la synthèse protéique est induite pendant 3h à 37°C. Après trois heures d'incubation, les cellules sont centrifugées, puis le culot est repris dans 50 ml de tampon G1, et les cellules sont alors congelées. Le lendemain, la solution est complétée en lysozyme (Sigma) 1 mg/ml et laissée 30 min à 37°C. Les cellules sont cassées par sonication (sur glace + eau) par 5 à 10 pulses de 30 sec espacés de

30 sec. De la DNase I (Roche) 5 µg/ml et de la RNase (Roche) 10 µg/ml sont ajoutées à l'échantillon et incubées 30 min à 37°C. Puis l'échantillon est centrifugé à 10.000 g pendant 30 min. Le surnageant est déposé sur une colonne d'une résine GST prééquilibrée avec 20 ml de G1. Le surnageant est passé 3 fois pour favoriser la fixation maximale de protéines fusionnées à la GST, à la colonne. Après élution du surnageant, la colonne est lavée avec 20 ml de G1. Pour récupérer les protéines fixées sur la colonne, éluer la avec le tampon G2. Les éluats récupérés à cette étape sont ensuite traités de la même façon que ceux obtenus précédemment avec le tampon C.

III.9.D. Méthodes d'électrophorèse

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Les protéines en fonction de leur masse sont séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide de 8 à 15% en conditions dénaturantes (SDS 0,1%), selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). La migration est effectuée jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol. Le tampon de charge pour gel SDS (tampon Laemmli) est une solution composée de glycérol 20%; SDS 5%; β-mercaptoéthanol 5% (v/v) dans du tampon Tris/HCl 0,1 M pH 6,8, à laquelle est ajoutée une pointe de spatule de bleu de bromophénol.

Electrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide

Afin de séparer les formes phosphorylées de la forme non phosphorylée de HPr, les protéines ont été séparées par électrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide à 12,5%. En effet les gels non-dénaturants permettent de séparer les protéines en fonction de leur repliement et de leur charge nette. C'est pourquoi la forme phosphorylée d'une petite protéine telle que HPr migre différemment que la forme non phosphorylée. L'électrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide correspond à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS en absence totale de ce détergent.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide urée

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide urée, ont été effectuées dans un tampon Tris/Glycine (Tris 25 mM, glycine 192 mM). Les migrations ont été réalisées à 30 mA. Les gels de séparation et de concentration en contiennent chacun 8 M d'urée. Le tampon de

charge est un tampon Tris/HCL pH 6,8 0.1 M, urée 12 M, DTT 100 mM. 40 µl de ce tampon est ajouté à 20 µl d'échantillon avant le dépôt sur gel.

III.9.E. Coloration des gels au bleu de Coomassie

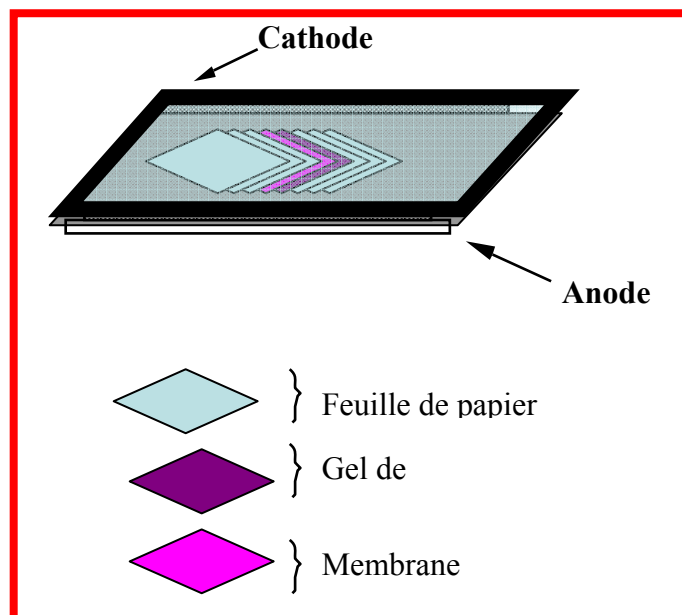
Les gels d'électrophorèse sont plongés au minimum pendant 1 h dans un bain colorant à 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie (Brilliant blue R, Sigma) préparé dans 30% (v/v) d'éthanol et 7% (v/v) d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré dans une solution renfermant 30% (v/v) d'éthanol et 10% (v/v) d'acide acétique.

III.9.F. Transfert électrophorétique des protéines sur membrane et Western

Blot

Après séparation de l'extrait protéique par électrophorèse, le transfert des protéines se fait du gel d'acrylamide vers une membrane de polyvinylidifluoride (Immobilon-PVDF) (Protran). Ce transfert électrophorétique "semi-sec" est réalisé sur un electroblotter "semi-sec" (Millipore) selon les recommandations du fournisseur. La solution tamponnée utilisée lors du transfert est TGE : Tris/base 25 mM; Ethanol 20%; Glycine 40 mM. L'éthanol (peut être remplacé par le méthanol) augmente la capacité de la membrane de PVDF à fixer les protéines et empêche le gel d'acrylamide de gonfler. Un schéma du montage réalisé pour le transfert est indiqué sur la figure 46 (Fig. 45).

Fig. 45 : Schéma du montage d'un transfert protéique



Les membranes de PVDF sont activées au préalable par traitement au tampon TGE pendant 5 min. Le gel et les papiers Wattmans sont aussi imbibés de TGE avant d'être utilisés. Après transfert, les membranes sont colorées au rouge Ponceau, coloration réversible permettant d'évaluer l'efficacité du transfert. Le gel d'acrylamide ayant servi au transfert est coloré au bleu de Coomassie pour évaluer approximativement la quantité de protéines transférées. Le Western-Blot est réalisé selon le protocole Biorad (Opti-4CN™ Substrate and Detection Kit). Après transfert, la membrane est lavée au PBST (PBS+ 1 % Tween 20), puis bloquée pendant une heure avec 3 % de caséines de lait diluées dans du PBST. La membrane est par la suite lavée au PBST deux fois, pendant 3 à 5 min. Elle est ensuite incubée en présence du premier anticorps pendant une heure. Un deuxième lavage au PBST précède l'incubation avec le second anticorps Gax-HRP, qui dure une heure. Finalement un dernier lavage au PBST est effectué, avant de passer à l'étape de révélation. Cette dernière a lieu en mélangeant 0.2 ml de substrat Opti-4CN + 1ml de diluant + 9 ml d'eau. La membrane est incubée en présence de ce mélange sous faible agitation pour une période n'excédant pas 30 min. Après révélation, la membrane est lavée à l'eau pendant 15 min.

III.9.G. Phosphorylation de HPr par HprK/P

La phosphorylation de HPr par HprK/P est réalisée en présence de 4 µg de HPr et de 50 ng de HprK/P dans une solution de Tris/HCl pH 7.4 50 mM renfermant 20 mM de FBP, 1 mM d'ATP et 5 mM de MgCl₂ dans un volume final de 40 µl. Les réactions sont arrêtées par chauffage à 75°C pendant 5 min. L'efficacité de la phosphorylation est visualisée en séparant les formes phosphorylées de HPr sur gel d'électrophorèse polyacrylamide non-dénaturante (12,5%) puis en les colorant au bleu de coomassie.

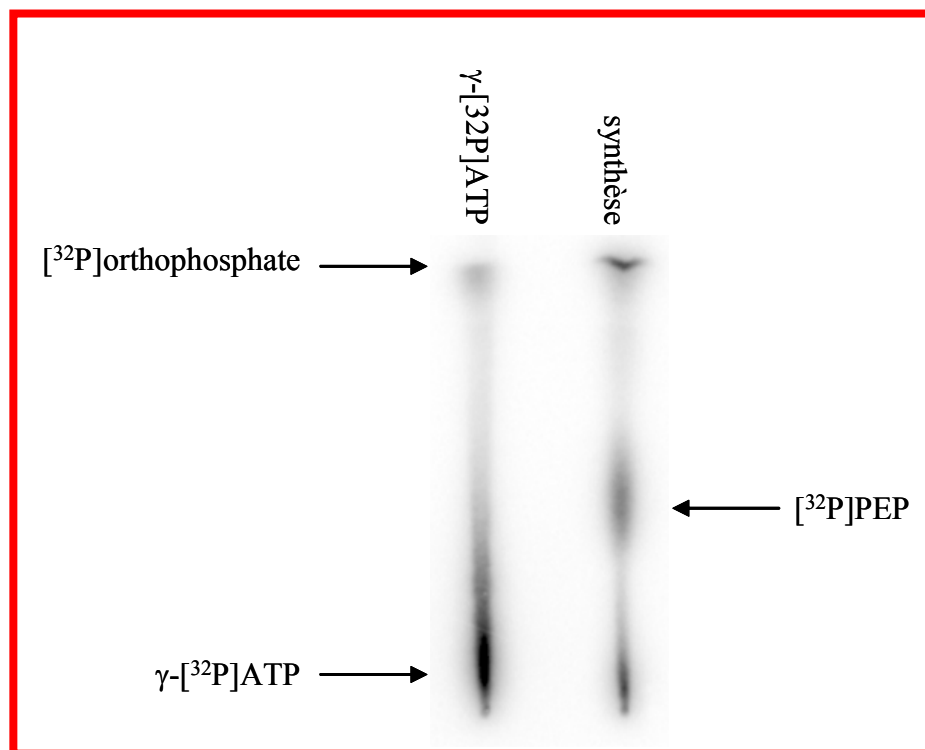
III.9.H. Synthèse de [³²P] PEP

La réaction de synthèse du [³²P] PEP est réalisée en présence de 40 U/ml de pyruvate kinase (Roche); PEP 165 µM; pyruvate 1 mM; ATP 10 µM et de γ-[³²P] ATP (ICN) 1 µCi/µl dans un tampon: triéthylamine HCl 87,5 mM pH 7,6 ; KCl 150 mM; MgCl₂ 3 mM (Roossien *et al.*, 1983). Le volume total de la réaction est de 50 µl ou 100 µl selon la quantité de [³²P] PEP désirée. Le milieu réactionnel est incubé 90 minutes à 30°C. 0,5 µl du produit de la synthèse est analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) de Polygram (Polygram CEL 300 PEI/UV 254, Macherey-Nagel). Le solvant est une solution aqueuse de KH₂PO₄ à

0,3 M. La chromatographie dure 30 min. Le chromatogramme est révélé par autoradiographie.

Les autoradiographies, des chromatogrammes et des gels réalisés au cours des tests de phosphorylation, sont réalisées par exposition du support analytique (gel, couche mince) sur un écran de phosphorImager. L'écran est ensuite numérisé par un scanneur de type STORM (Molecular dynamic/AmershamBioscience).

Fig. 46 : Synthèse du γ - $[^{32}\text{P}]$ PEP



La figure présente l'autoradiographie de la chromatographie qui a permis de vérifier la synthèse de $[^{32}\text{P}]$ PEP en séparant le γ - $[^{32}\text{P}]$ ATP, le $[^{32}\text{P}]$ PEP et le $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate. Le γ - $[^{32}\text{P}]$ ATP qui a servi à la synthèse du $[^{32}\text{P}]$ PEP a été déposé comme standard.

III.9.I. Phosphorylation de HPr par EI

La phosphorylation de HPr par EI a été réalisée dans un volume total de 30 μl renfermant 1 μg de EI de *B. subtilis* ou *L. casei*, 1 μg de HPr de *B. subtilis*, en présence de 2 μl de la préparation de $[^{32}\text{P}]$ PEP dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4; l'ensemble est incubé à 37°C. Les réactions de phosphorylation $[^{32}\text{P}]$ PEP dépendante sont arrêtées par ajout de tampon Laemmli. Les protéines contenues dans ces différentes fractions sont séparées par

électrophorèse en polyacrylamide-SDS (15%). Puis les protéines phosphorylées sont révélées par autoradiographie.

Le test de phosphorylation PEP-dépendant de PrfA par la P~His-HPr ou la P~EI, est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment en rajoutant 1 µg de PrfA-(His)₆ (PrfA est clonée dans le vecteur pET28a, elle est tronquée de 19 acides aminés dans son extrémité N-terminale, et porte une double étiquette 6-His en N et C-terminal).

III.9.J. Déphosphorylation de la P-Ser-HPr

Le test de déphosphorylation est réalisé dans un volume total de 50 µl contenant 2 µg de P-Ser-HPr de *B. subtilis*, 50 ng de HPrK/P de *L. monocytogenes* dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.4 renfermant 5 µl de [Na₂HPO₄, KH₂PO₄ pH 7.4 20 mM], et 5 µl de MgCl₂ 100 mM. Les réactions sont arrêtées par chauffage à 75°C pendant 5 min. L'efficacité de la déphosphorylation est visualisée en séparant les formes phosphorylées de HPr par électrophorèse non-dénaturante sur gel de polyacrylamide (12,5%) puis en les colorant au bleu de Coomassie.

III.10. Méthodes Bio-informatiques

Les différentes bases de données disponibles sur le World Wide Web utilisées dans ce travail sont décrites dans le tableau 15.

<i>Nom de la base</i>	<i>Thème</i>	<i>Institut gestionnaire</i>	<i>Adresse Internet</i>
<i>Swiss-prot / TrEMBL</i>	<i>Base de données de protéines</i>	<i>Swiss Institute of Bioinformatics / European Bioinformatics Institute</i>	<i>http://us.expasy.org/sprot/</i>
<i>Prosite</i>	<i>Base de données des familles de protéine et domaines</i>	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>	<i>http://us.expasy.org/prosite/</i>
<i>NCBI Structure</i>	<i>Base de données de structure de protéines</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<i>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/</i>
<i>PubMed</i>	<i>Base de données bibliographique</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<i>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</i>
<i>Clusters of Orthologous groups of proteins</i>	<i>Serveur de comparaison d'organisation des groupes de gènes chez différentes bactéries</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<i>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/</i>
<i>Entrez genome</i>	<i>Base de données de génomes bactériens</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<i>http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/PMGifs/Genomes/micr.html</i>
<i>TIGR Comprehensive Microbial Resource</i>	<i>Base de données de génomes bactériens</i>	<i>The Institute for Genomic Reseach</i>	<i>http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/CMRHomePage.spl</i>
<i>JGI Joint Genome Institute</i>	<i>Base de données de génomes bactériens</i>	<i>Departement of Energy Joint Genome Institute</i>	<i>http://www.jgi.doe.gov/</i>

Tableau 15 : Bases de données disponibles sur le World Wide Web utilisées dans cette étude

IV. Résultats et Discussion

IV.1. Objectifs

L'activité de PrfA, régulateur transcriptionnel de l'expression des gènes de virulence de *L. monocytogenes*, dont *hly*, est inhibée en présence de glucose, fructose, cellobiose et d'autres sucres rapidement métabolisés (Milenbachs *et al.*, 1997). *L. monocytogenes* possède tous les composants impliqués dans la RC chez les firmicutes, un PTS fonctionnel et une HprK/P capable de phosphoryler HPr sur sa sérine 46 (Christensen *et al.*, 1999). Elle possède une protéine homologue à CcpA (Duché *et al.*, 2002), et un phénomène de RC CcpA-dépendant a été décrit chez *L. monocytogenes*, notamment pour ses gènes possédant un site *cre*, comme l' α -glucosidase (Behari and Youngman, 1998). Néanmoins, l'interruption de *ccpA* ne levant pas la répression des gènes de virulence par ces sucres, nous pouvons en conclure que l'inhibition de PrfA n'est donc pas CcpA-dépendante et ne suit pas le mécanisme général de RC connue chez les firmicutes (Behari and Youngman, 1998). La question qui se pose, est si l'un des mécanismes de RC P-Ser-HPr-dépendant CcpA-indépendant, induit par l'utilisation d'un sucre rapidement métabolisable, serait impliqué dans la régulation de PrfA.

Or trois signaux principaux sont caractéristiques de la RC chez les firmicutes :

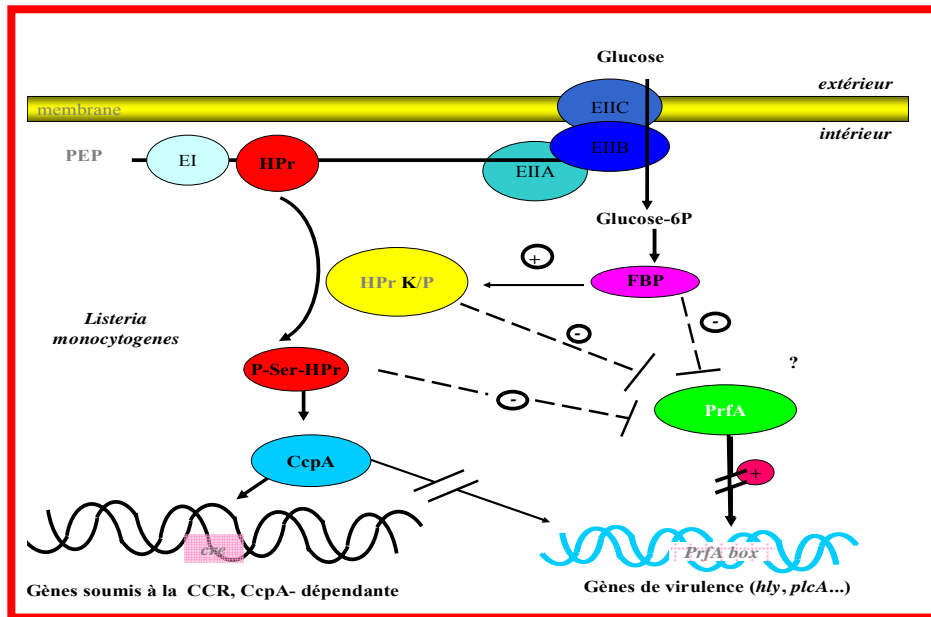
- l'augmentation de la concentration des intermédiaires glycolytiques et notamment le FBP.
- la stimulation de la fonction kinase de l'HprK/P et la diminution de son activité phosphorylase.
- l'augmentation de la concentration en P-Ser-HPr et la diminution de P~His-HPr.

L'objectif de ce travail est de tester si de l'un de ces trois signaux serait impliqué dans la régulation de l'activité de PrfA, empêchant ainsi l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants de *L. monocytogenes*.

Ce travail s'inscrit dans le cadre des études des interactions hôte-pathogène, pathogène-habitat, visant le contrôle de l'activité des protéines, nécessaire à la modulation de la virulence des bactéries vis-à-vis de leur microenvironnement.

Pour réguler l'activité d'une protéine, deux cas de figures se présentent : soit via une modification de la protéine (phosphorylation, clivage ou autre...), soit via une interaction avec un effecteur. Dans le cas de PrfA, le cofacteur (activateur ou répresseur), nécessaire à la régulation de l'activité de cette protéine, peut soit modifier PrfA sans interagir avec elle, soit interagir avec elle directement.

Fig. 47 : Hypothèse de travail



IV.2. Intercation avec un cofacteur : activateur ou répresseur ?

Des interactions spécifiques entre les composants cellulaires assurent la survie de la cellule en formant un vaste réseau de voies de signalisation. Ces interactions assurent une concertation des composants cellulaires dans différentes fonctions telles que la division dans des conditions favorables, ou la lutte contre des conditions défavorables qui peut s'opérer de diverses façons, via l'expression de gènes de virulence, la formation de biofilm, l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux stress, l'expression de toxines etc...

Pour assurer toutes ces fonctions, les bactéries ont recours aux protéines (rôle de structure, rôle dans le mouvement, le transport de substances à travers la membrane des cellules, rôle d'enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire,...), mais également aux protéines régulatrices. L'activité des protéines est modulée soit par des effecteurs soit par des modifications post-traductionnelles soit par des interactions protéine-protéine, permettant ainsi à la bactérie de consommer moins d'énergie et de persister dans des conditions défavorables de croissance.

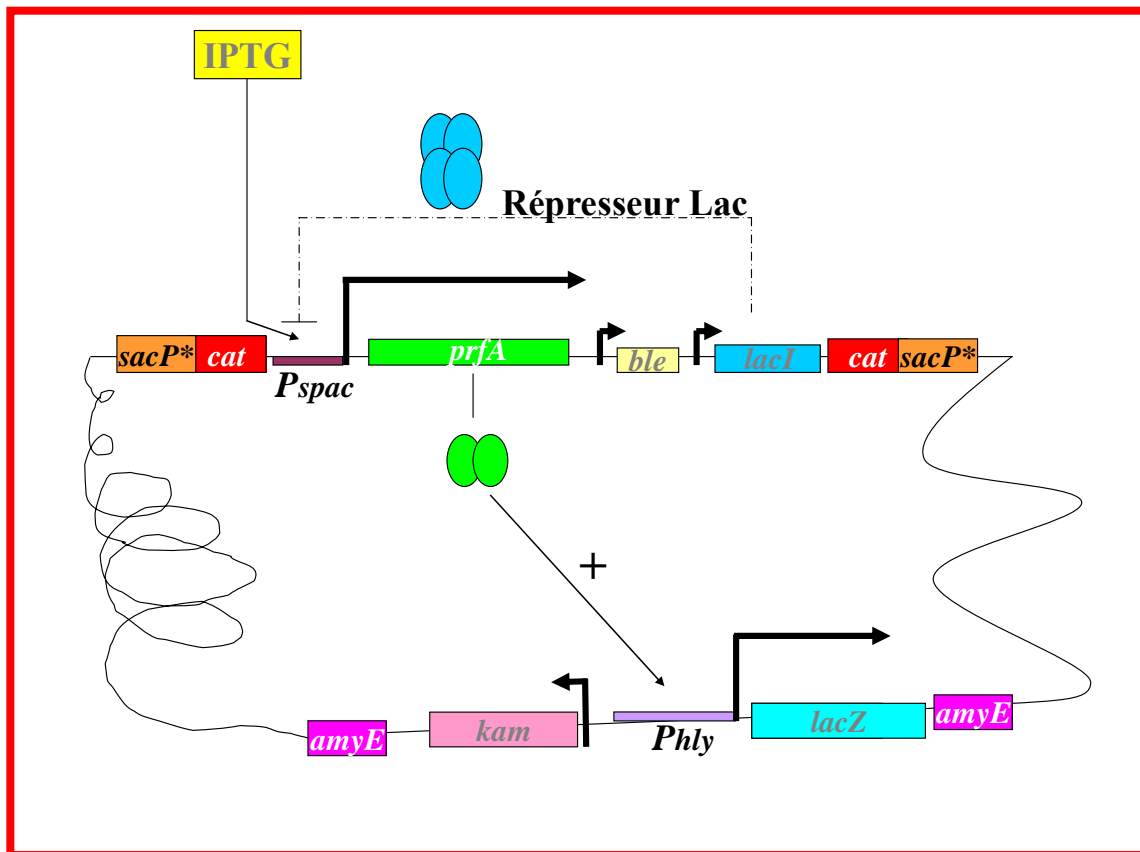
Dans le cas de PrfA, nous pouvons imaginer deux scénarios : soit PrfA est active et aurait besoin d'un coeffecteur pour inhiber son activité, soit PrfA est inactive et aurait besoin d'un coactivateur qui l'active.

Quelle sera la nature de cet effecteur?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un système hétérologue, la souche BUG1199 de *B. subtilis* (Sheehan *et al.*, 1995).

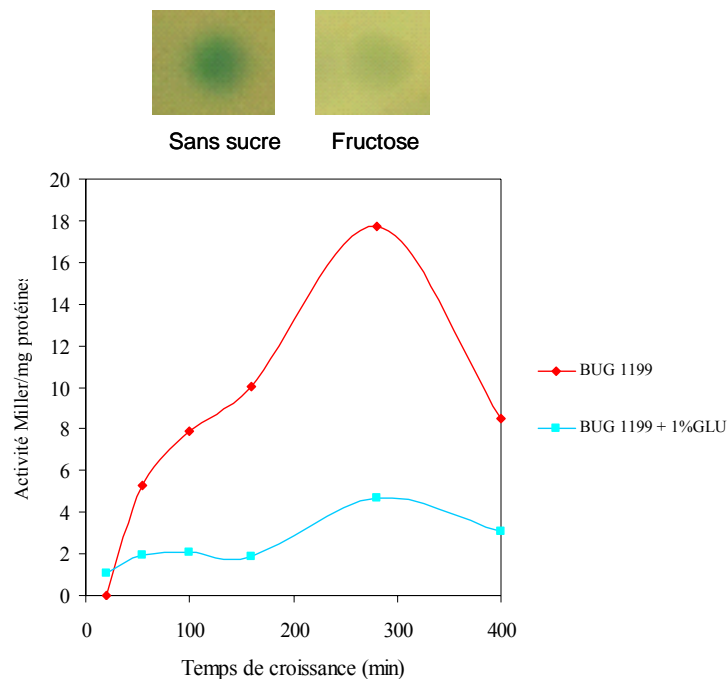
Dans cette souche le gène *prfA* est sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG et le gène rapporteur *lacZ* est fusionné au promoteur *hly*, gène sous contrôle de PrfA. Nous avons au préalable vérifié que PrfA est indispensable à l'expression du promoteur *hly* dans BUG1199. En effet la souche BUG1195 dépourvue de *prfA*, n'exprime pas la fusion *hly-lacZ*.

Fig. 48 : Représentation schématique de la souche BUG1199 de *Bacillus subtilis* (Sheehan *et al.*, 1995)



Nous avons commencé par démontrer que la RC des gènes de virulence de *L. monocytogenes*, exercée par le fructose et le glucose (Milenbachs *et al.*, 1997) était aussi fonctionnelle dans la souche BUG1199 de *B. subtilis* (Fig. 49); en effet, dans cette souche ces deux sucres répriment l'expression de la fusion *hly-lacZ*. L'effet répresseur de ces sucres est également visible sur une gélose LB contenant 400 µg/ml de X-Gal et 0.1 mM IPTG.

Fig. 49 : Effet du fructose et glucose sur l'expression de la fusion *hly-lacZ* de BUG1199
Test de l'activité β -galactosidase

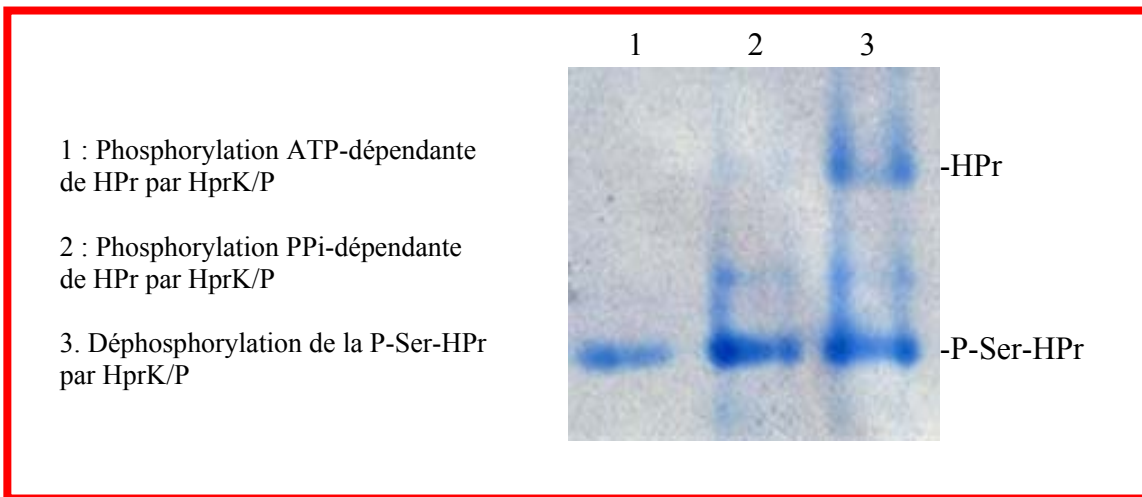


Or chez *B. subtilis*, en présence de sucre comme le glucose dans le milieu extracellulaire, il y a accumulation de P-Ser-HPr. L'une des possibilités était que la P-Ser-HPr soit un répresseur de PrfA. Pour tester le rôle potentiel de cette protéine dans la régulation de l'activité de PrfA, nous avons introduit la mutation *hprKV267F* dans notre souche BUG1199. L'allèle *hprKV267F* code pour une HprK/P dont la fonction kinase est normale et dont la fonction phosphorylase est quasi inexistante (Monedero *et al.*, 2001) ; les souches qui portent cet allèle accumulent de la P-Ser-HPr même en absence de glucose, donc en absence d'intermédiaires de la glycolyse.

Dans ce mutant, l'activation de la transcription du gène contrôlé par PrfA (*hly*) est inhibée même en absence de sucres répresseurs. Cette répression ne fait pas donc intervenir des intermédiaires de la glycolyse comme le FBP.

Notons qu'il a déjà été publié que l'HPrK/P de *L. monocytogenes* était incapable de déphosphoryler la P-Ser-HPr (Christensen *et al.*, 1999). Or nous avons pu démontrer qu'*in vitro*, HPrK/P de *L. monocytogenes* non seulement pouvait phosphoryler HPr de *B. subtilis* en présence d'ATP (ou PPi) et de FBP, mais qu'elle pouvait également déphosphoryler la P-Ser-HPr de *B. subtilis*, en présence de Pi (Fig. 50).

Fig. 50 : Activité de l'HPrK/P de *L. monocytogenes*



Lorsqu'on empêche la formation de P-Ser-HPr dans le mutant *hprKV267F*, en remplaçant dans HPr la sérine en position 46 par une alanine, on restaure l'activité de PrfA (Fig. 51). Nous pouvons en conclure que c'est l'accumulation de la P-Ser-HPr qui est responsable de l'inhibition de l'activité de PrfA, et non pas la phosphorylation de PrfA par HprK/P.

Par contre, l'inactivation de *crh* qui code pour un homologue de HPr, et qui comporte une sérine en position 46 également phosphorylable par l'HprK/P, ne lève pas la répression exercée par la mutation *hprKV267F*. Crh ne joue donc pas un rôle majeur dans la régulation de PrfA.

Dans le mutant *hprKV267F*, PrfA reste inactive même quand on interrompt le gène *ccpA* (Fig. 51). Par ailleurs, l'interruption du gène *ccpA* dans la souche sauvage BUG1199, provoque aussi une inhibition significative de l'activité de PrfA (Fig. 51). L'effet inhibiteur exercé par l'inactivation de *ccpA* disparaît lorsqu'on remplace la sérine en position 46 de HPr par une alanine (Fig. 51). Ces résultats concordent avec le fait que des mutants Δ *ccpA* de *B. subtilis* (Ludwig *et al.*, 2002) et *E. faecalis* (Leboeuf *et al.*, 2000) accumulent, pour des raisons inconnues, de la P-Ser-HPr.

Fig. 51 : Effet des mutations *hprKV267F*, Δ *ccpA* (en présence ou absence de glucose 1%) et *ptsHI* sur l'expression de la fusion *hly-lacZ* de BUG1199

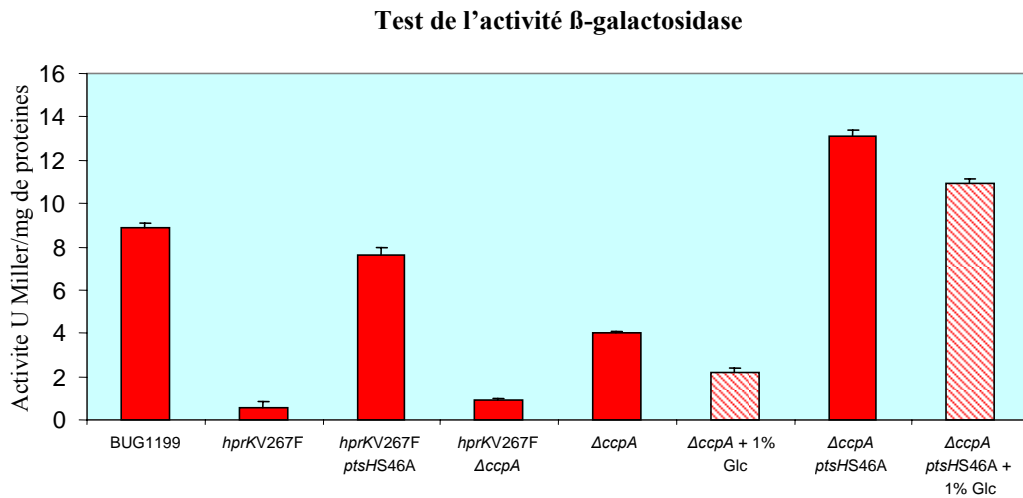
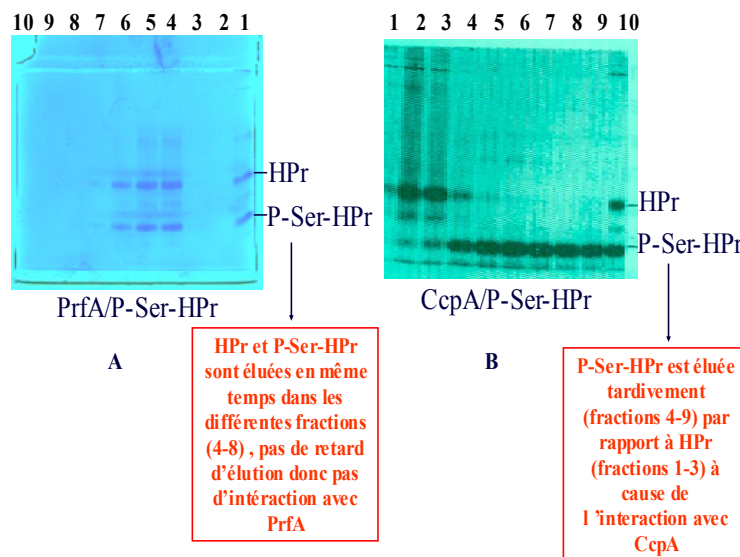


Fig. 52 : Expérience de retard d'éluion de HPr et P-Ser-HPr sur une colonne *PrfA*



A : PrfA est fixée sur une colonne Ni-NTA. Un mélange de HPr/P-Ser-HPr (50%-50%) est rajouté, et les fractions éluées sont représentées dans l'ordre allant de la piste 2 vers la piste 10. Dans la piste 1, un mélange de HPr/P-Ser-HPr sert de témoin.

B : CcpA est fixée sur une colonne Ni-NTA. Un mélange de HPr/P-Ser-HPr (50%-50%) est rajouté, et les fractions éluées sont représentées dans l'ordre allant de la piste 1 vers la piste 9. Dans la piste 10, un mélange de HPr/P-Ser-HPr sert de témoin.

Nos résultats suggèrent que l'accumulation de la P-Ser-HPr, due soit à la présence de sucres rapidement métabolisables dans le milieu de culture (glucose, fructose, *etc.*), soit à des mutations spécifiques (*hprKV267F*, *ΔccpA*) inhibe directement (*via* une interaction protéine/protéine), ou indirectement l'activité de PrfA.

Afin de tester l'existence d'une interaction protéine/protéine entre la P-Ser-HPr et PrfA, des expériences de retard d'élution ont été réalisées. Ces mêmes expériences ont servi pour démontrer l'interaction entre la P-Ser-HPr et CcpA (Deutscher *et al.*, 1995).

Ainsi après avoir fixé PrfA sur une colonne d'affinité, nous faisons passer sur la colonne un mélange d'HPr et de P-Ser-HPr. S'il y a une interaction directe entre PrfA et P-Ser-HPr, un retard d'élution de la P-Ser-HPr par rapport à HPr est observé.

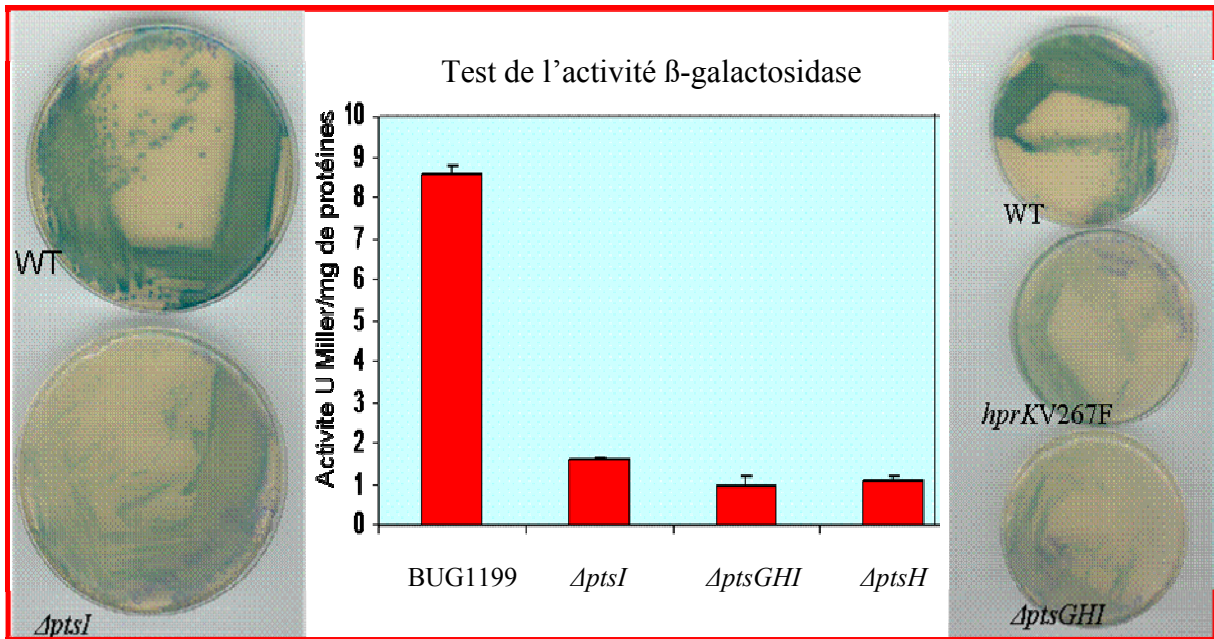
Nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction directe entre la P-Ser-HPr et PrfA en utilisant cette technique (Fig 52). En conclusion, il semble qu'il n'existe pas d'interaction directe entre la P-Ser-HPr et PrfA. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'interaction entre la P-Ser-HPr et PrfA soit plus faible que celle observée entre la P-Ser-HPr et CcpA et ne peut être mise en évidence par cette technique. Par ailleurs Hillen et ses collaborateurs n'ont pas pu mettre en évidence une interaction entre la P-Ser-HPr et PrfA, par le système BIACORE (communication personnelle).

Ces résultats suggèrent que la P-Ser-HPr pourrait exercer un effet indirect sur l'activité de PrfA. La formation de P-Ser-HPr, en réponse au métabolisme rapide d'une source de carbone, exerce divers effets physiologiques aussi bien sur le métabolisme de carbone que de l'azote. Il a été reporté notamment que le transfert du groupement phosphate *via* la cascade de phosphorylation du PTS est ralenti, ce qui provoque une diminution de la phosphorylation de l'histidine en position 15 de HPr ainsi que des enzymes IIA et IIB du PTS (Reizer *et al.*, 1992). La P~His-HPr ou la P~EIIA ou la P~EIIB serait-elle un activateur de PrfA ? Si l'une de ces protéines sous leur forme phosphorylée active PrfA, leur présence sous forme non phosphorylée empêche l'activation de PrfA, ce qui se traduit par une répression de l'expression de *hly-lacZ*, dans BUG1199.

Or la cascade de phosphorylation du PTS requiert la présence de l'enzyme I. Afin de tester son effet sur l'activité de PrfA, le gène *ptsI* codant pour EI a été inactivé. Nous avons démontré que l'inactivation de *ptsI* inhibe l'activité de PrfA (Fig. 53). Cette inhibition a été également observée lorsqu'on interrompt *ptsH* ou *ptsGHI* (Fig. 53), suggérant ainsi que la P~His-HPr, la P~EIIA ou P~EIIB pourrait stimuler l'activité de PrfA. La P-Ser-HPr étant

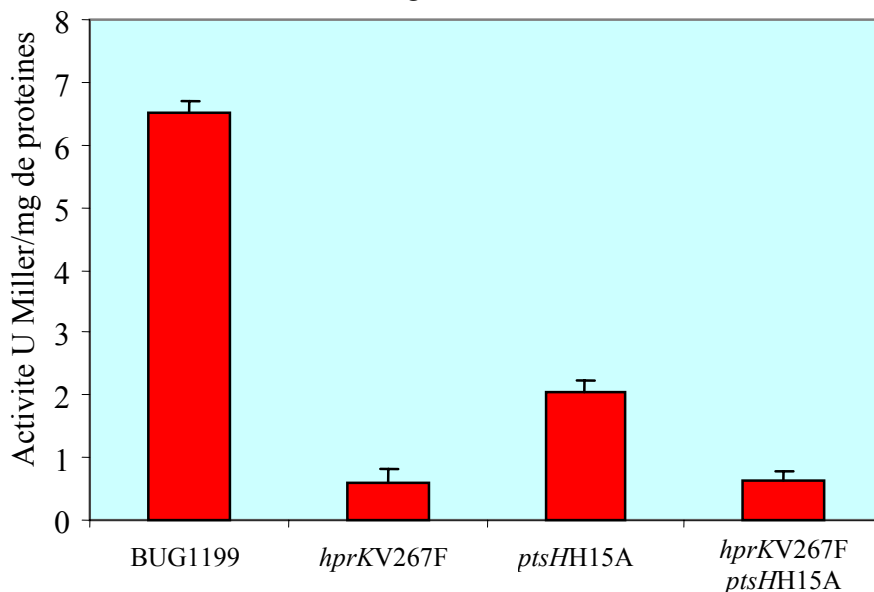
un mauvais substrat pour l'enzyme I, sa présence provoque la diminution de la phosphorylation de HPr sur son histidine 15, et par conséquent des EII, ce qui empêcherait l'activation de PrfA.

Fig. 53 : Effet des mutations $\Delta ptsI$, $\Delta ptsGHI$, et $\Delta ptsH$ sur l'expression de la fusion *hly-lacZ* de BUG1199 cultivée dans du LB sans glucose additionnel



Nous avons également suivi l'expression de la fusion *hly-lacZ* dans un mutant *ptsHH15A* afin de tester l'implication de la P~His-HPr dans la régulation de l'activité de PrfA. Nous avons observé que la mutation *ptsHH15A* exerce un effet répresseur sur PrfA, qui augmente lorsqu'on rajoute la mutation *hprKV267F* à cette souche (Fig. 54). Ceci confirme l'hypothèse de l'implication de la P~His-HPr, d'une P~EIIA ou d'une P~EIIB dans la régulation de l'activité de PrfA.

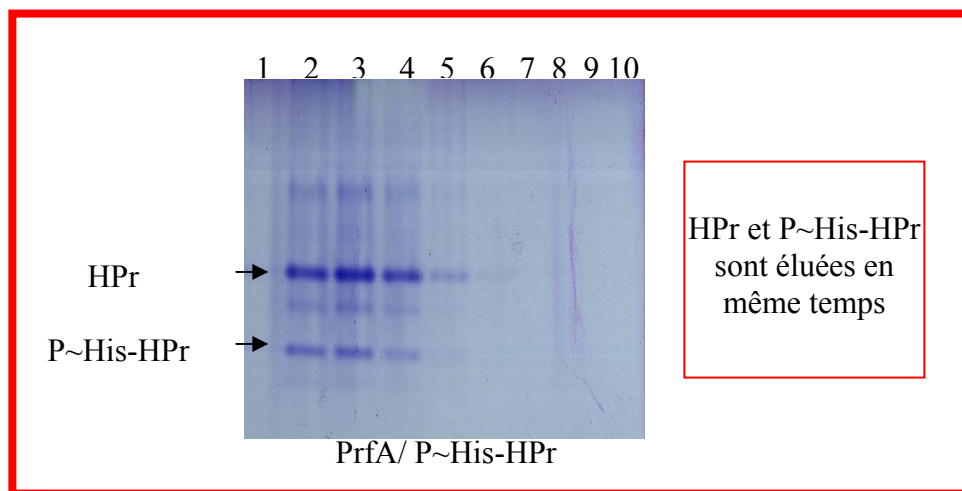
Fig. 54 : Effet de la mutation *ptsHH15A* sur l'expression de la fusion *hly-lacZ* de BUG1199 cultivée dans du LB sans glucose additionnel



Chez *L. monocytogenes*, il est intéressant de noter que pour être fonctionnelle, PrfA requiert une étape d'activation. Ainsi dans un mutant *prfAG145S*, PrfA est activée de façon constitutive. La structure de cette protéine a été récemment déterminée (Eiting *et al.*, 2005). La mutation *prfAG145S* stabilise le motif hélice-tour-hélice de fixation à l'ADN ce qui augmente l'affinité de PrfA pour l'ADN (Eiting *et al.*, 2005). Nous pouvons imaginer que l'interaction de PrfA avec l'une des formes non phosphorylées des enzymes IIA et IIB, empêche la formation d'une forme constitutivement active de PrfA. Alternativement l'interaction avec ou la phosphorylation par, la P~His-HPr ou l'une des phospho-protéines du PTS pourrait causer les changements structuraux nécessaires à l'activation de PrfA.

Une première tentative pour tester une interaction potentielle entre la P~His-HPr et PrfA par retard d'élution n'a pas pu mettre en évidence une interaction entre ces deux protéines (Fig. 55). La protéine PrfA avec laquelle le test a été réalisé, est tronquée de 19 acides aminés au niveau de sa partie N-terminale, ce qui pourrait expliquer l'échec de l'expérience. Des tentatives d'expression et de purification de PrfA entière fusionnée en N ou C-terminal avec une queue polyhistidine, à partir des plasmides pQE30, 60 et 70 ont échoué. Le clonage de *prfA* dans le vecteur pGP172 (J. Stülke, communication personnelle) est en cours. Il permet la production de PrfA portant une étiquette streptavidine. De futures expériences de retard d'élution pourraient être réalisées entre PrfA-Strep et HPr-(His)₆ permettant de démontrer une éventuelle interaction entre ces protéines.

Fig. 55 : Expérience de retard d'élution de HPr et P~His-HPr sur une colonne PrfA



PrfA est fixée sur une colonne Ni-NTA. Un mélange de HPr/P-His-HPr est rajouté et les fractions éluées sont représentées dans l'ordre allant de la piste 2 vers la piste 10.

Dans tous les cas, la formation de P-Ser-HPr et la diminution concomitante de la phosphorylation des protéines du PTS, favoriseraient la forme inactive de PrfA.

Nous ne pouvons donc pas exclure l'existence d'intermédiaires protéiques entre HPr et PrfA. Parmi ces protéines candidates, la possibilité que l'une des enzymes II, sous sa forme phosphorylée puisse activer PrfA, n'est pas écartée. Chez *L. monocytogenes*, parmi les nombreux EIIA candidats, nous pouvons citer une EIIA, de la classe glucose, qui est homologue à *ypqE* de *B. subtilis*. Chez *L. monocytogenes*, cette EIIA est codée par un gène monocistronique qui n'est pas suivi de gènes codants pour les enzymes IIB et IIC, donc elle n'est probablement pas impliquée dans le mécanisme de transport des sucres du PTS. Nous pouvons imaginer que P~EIIA^{Glc} active PrfA. Dans un mutant $\Delta ptsI$ ou $\Delta ptsGHI$ ou $\Delta ptsH$, on pourrait avoir très peu de P~EIIA^{Glu}, ce qui se traduirait par une répression de l'activité de PrfA.

Par ailleurs chez *L. monocytogenes* l'inactivation de deux régulateurs transcriptionnels, l'antiterminateur BvrA (LicT-like) et l'activateur transcriptionnel CsrA (LevR-like) conduit également à une perte de la répression des gènes de virulence (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004). Ces deux régulateurs, qui contrôlent l'expression de gènes codant pour des EII spécifiques des β -glucosides, portent des « PTS-Regulation Domain » (PRD), qui sont des cibles pour la phosphorylation par P~His-HPr. La forte diminution de la phosphorylation de ces régulateurs par P~His-HPr dans le mutant surproduisant la P-Ser-HPr (qui est un mauvais substrat pour la phosphorylation par EI sur His-15), pourrait être responsable de la faible activité de PrfA. L'absence de phosphorylation des régulateurs BvrA et CsrA par P~His-HPr inhiberait leur activité et par conséquent la synthèse des EIIA et EIIB. On peut envisager qu'une EIIA ou EIIB puisse interagir avec PrfA, comme l'interaction observée entre EIIB^{Glc} et le régulateur transcriptionnel Mlc chez *E. coli*.

Il a été proposé qu'il existe deux mécanismes de RC semi-indépendant l'un dépendant des β -glucosides (comme le cellobiose), et l'autre du glucose, permettant de réguler l'expression des gènes de virulence de *L. monocytogenes* en réponse à la présence de ces sucres (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004). Ceci laisse suggérer que ce sont les enzymes spécifiques du PTS, EIIA ou EIIB qui seraient responsables de cet effet. Toutefois il a été également montré que la surproduction de PrfA inhibe le transport de glucose (Marr *et al.*,

2006) . Si par ailleurs, la surproduction de PrfA inhibe également le transport d'un autre sucre-PTS, à savoir le fructose par exemple, l'hypothèse de deux mécanismes de RC semi-indépendants est défavorisée. Dans ce cas, il serait plus probable qu'une protéine générale du PTS serait responsable de la RC de l'expression des gènes de virulence de *L. monocytogenes* PrfA-dépendants ; cette protéine n'est autre que la P~His-HPr. Après purification de PrfA entière, il serait judicieux d'avoir recours à des techniques plus performantes et plus sensibles pour démontrer une éventuelle interaction entre PrfA et la P~His-HPr, à savoir la coimmunoprécipitation, ou le système BIACORE.

IV.3. Modification de PrfA

Très souvent la modification que subit une protéine, se fait généralement de façon covalente (Han and Martinage 1993). La protéine peut s'automodifier elle-même ou aussi subir l'action d'une autre protéine modifiante très sélective (spécifique de la chaîne latérale modifiable, de la protéine modifiée).

La fonction et la stabilité des protéines peuvent être modulées de façon très fine par différents processus de modifications post-traductionnelles. Ainsi certains acides aminés spécifiques des protéines cibles sont modifiés par une grande variété de groupements : ubiquitines, lipidiques, méthyls, acétyls ou carbohydrates. L'une des modifications les plus étudiées est la phosphorylation. La phosphorylation des protéines représente un mécanisme de régulation qui contrôle pratiquement tous les aspects de la vie cellulaire. Cette réaction covalente, assurée par des protéines kinases, induit des changements conformationnels qui peuvent affecter la fonction d'une protéine de diverses manières : en stimulant ou en supprimant son activité, en contrôlant sa localisation intracellulaire ou sa dégradation, ou encore en lui permettant d'interagir avec d'autres protéines. Cette modification post-traductionnelle, qui est rapidement reversée par l'action des protéines phosphatases, est très fortement conservée au cours de l'évolution et participe à la régulation de grandes fonctions cellulaires. Dans de nombreux cas, la phosphorylation des protéines régule différentes étapes du mécanisme d'infection de la cellule hôte par les bactéries pathogènes (Cozzone, 2005), comme par exemple le rôle spécifique de la P-Tyrosine phosphatase YopH de *Yersinia pestis* dans l'inactivation des macrophages (Yuan *et al.*, 2005).

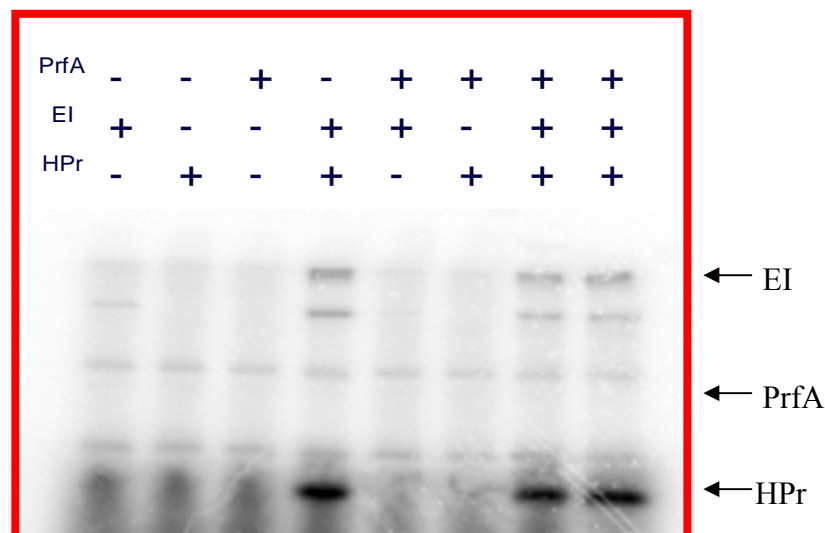
Milenbachs et ses collaborateurs n'ont pas pu mettre en évidence une modification de PrfA affectant sa taille, sa charge et sa forme, cependant ils n'ont pas exclu le fait que PrfA soit la cible d'une modification chimique labile plus subtile.

Quelle est la nature de la forme active de PrfA et quel serait le mécanisme d'activation ?

Pour répondre à cette question, nous avons testé la possibilité que PrfA soit modifiée par phosphorylation par l'une des enzymes générales du PTS, EI ou HPr. Nous savons que la P~His-HPr est impliquée dans la stimulation de l'activité de nombreux activateurs transcriptionnels et antiterminateurs par phosphorylation de l'histidine des domaines de régulation conservés (PRD). Ce type de régulation qui représente un mécanisme de RC CcpA-indépendant, a été surtout étudié dans le cas de LicT (Tortosa *et al.*, 2001) et LevR (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). Lorsque la bactérie accumule de la P-Ser-HPr, la phosphorylation sur l'histidine en position 15 de l'HPr diminue et LicT est inactivée (Lindner *et al.*, 2002).

Des expériences de transfert de phosphate radioactif PEP-dépendant entre EI, HPr et PrfA n'ont pas mis en évidence de transfert de groupement phosphate vers PrfA. Il ne semble donc pas que PrfA soit phosphorylée par la P~EI ni par la P~His-HPr (Fig. 56).

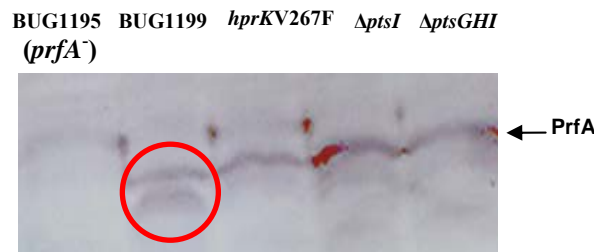
Fig. 56 : Test de phosphorylation de PrfA de *L. monocytogenes* par EI, et HPr de *B. subtilis* en présence de [³²P] PEP (Cf. M&M, paragraphe III.9.1)



Nous n'avons cependant pas exclu une modification (par phosphorylation ou autre) de PrfA. En effet afin de démontrer que les effets observés sur l'expression de la fusion *hly-lacZ* dans les différents mutants de *B. subtilis* n'étaient pas dus à une réduction de synthèse de PrfA dans ces mutants, nous avons effectué des Westerns blots sur les extraits protéiques des différentes souches construites en utilisant des anticorps dirigés contre PrfA. Les résultats montrent que tous les mutants produisent PrfA à un taux identique à celui de la

souche sauvage BUG1199. En outre, nous avons aussi mis en évidence, uniquement dans la souche sauvage, une seconde bande révélée par le sérum anti-PrfA, migrant un peu plus rapidement sur le gel (Fig. 57); cette forme pourrait correspondre à une forme active de PrfA, puisqu'elle est absente chez les mutants présentant un phénotype de répression. Il peut s'agir d'une forme phosphorylée ou dégradée partiellement par une protéase (comme Mpl par exemple). Nous avons donc cloné *prfA* portant une étiquette (His)₆ dans le vecteur répliatif pHT315, et nous avons transformé la souche BUG1195 de *B. subtilis*. La tentative de surproduction des deux formes de PrfA à partir de cette souche, a échoué. Il s'est avéré après analyse en spectroscopie de masse qu'il s'agit de protéines contaminantes de *B. subtilis*, dont l'expression est beaucoup plus importante que celle de notre protéine d'intérêt (on reste dans les limites de détection, plus concrètement dans les bruits de fond). Donc l'expression de PrfA à partir de ce vecteur étant insuffisante, la construction d'un vecteur répliatif à haut nombre de copies ou intégratif permettant la production de PrfA à partir de BUG1199 est nécessaire, nous pourrions ainsi purifier la forme modifiée de PrfA puis identifier par spectroscopie de masse, la modification qu'a subi cette protéine.

Fig. 57 : Western Blot anti-PrfA (cf. M&M paragraphe III.9.F)

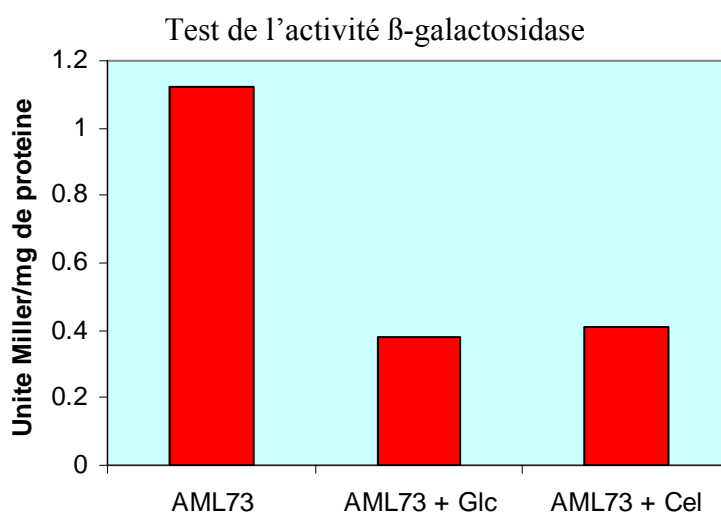


Par ailleurs, la substitution de la forme sauvage de PrfA par la forme PrfAG145S (Ripio *et al.*, 1997) dans BUG1199 et RHTG101 a été réalisée. Des suivis de l'expression de la fusion de *Phly-lacZ* sont en cours. Toutefois, il semble que la présence de cette forme mutée de PrfA dans la souche BUG1199 de *B. subtilis* soit toxique pour la bactérie. En effet les spores de ces mutants ne cultivent plus en LB.

Enfin, le plus important était d'introduire les mêmes mutations réalisées dans BUG1199, dans le génome de *L. monocytogenes*, afin de confirmer les résultats observés chez *B. subtilis*. Des plasmides intégratifs permettant l'obtention des mutants *hprKV267F* et $\Delta ptsI$ ont été construits et toutes les tentatives de muter *L. monocytogenes* ont été infructueuses. Des clones des différentes étapes (1.transformation, 2.première intégration du plasmide entier par recombinaison homologue, 3.deuxième recombinaison homologue et excision du

plasmide) ont été testés (PCR, Southern-Blots, complémentation fonctionnelle de l'activité PTS spécifique des β -glucosides dans la souche GM1475, test de transfert de groupement phosphate, croissance sur milieu minimum+ fructose), mais n'ont pas permis de mettre en évidence des mutants *hprKV267F* et Δ *ptsI* de *L. monocytogenes*. De nouvelles expériences sont en cours, sur l'EGDe mais également sur l'AML73. Cependant, nous avons réussi à confirmer la RC de l'expression la fusion *hly-gus*, exercée par le glucose et cellobiose, dans la souche AML73 (Fig. 58).

Fig. 58 : Effet des sucres sur l'expression de la fusion *hly-gus* de l'AML73



Par ailleurs, Mertins et ses collaborateurs viennent de construire des mutants (par simple recombinaison homologue) de *L. monocytogenes* dans lesquels les gènes *ccpA*, *hprK* et *ptsH* sont inactivés par simple crossing over. Cette étude très récente suggère l'implication des EII du PTS plutôt que HPr, dans la régulation de l'activité de PrfA (Mertins *et al.*, 2006). En effet un mutant *hprK* de *L. monocytogenes*, cultivé en milieu minimum contenant du glucose, montre une surexpression des gènes de virulence PrfA-dépendants, alors que l'expression de ces gènes est légèrement réprimée dans le mutant *ccpA*. Dans le mutant *ptsH*, les gènes de virulence PrfA-dépendants sont surexprimés en présence de glucose. Nous pouvons expliquer cette activation de PrfA par le fait que le glucose ne peut être transporté par le PTS dans un mutant *ptsH*. Comme prévu les mutant *hprK* et *ptsH* ne produisent pas de la P-Ser-HPr, tandis que le mutant *ccpA* produit de la P-Ser-HPr à un taux similaire à la souche sauvage. Il se peut que lors de la préparation des extraits, une déphosphorylation de la P-Ser-HPr a eu lieu, car le taux de P-Ser-HPr détecté dans la

souche sauvage cultivée en présence de glucose est très faible. Dans ce travail, aucune corrélation directe et claire n'a été établie entre la P-Ser-HPr ou la P-His-HPr et l'activité de PrfA, quand *L. monocytogenes* est cultivée en milieu minimum contenant différents sucres-PTS.

Cependant, nous pouvons remarquer que la synthèse de ce régulateur estimée avec un anticorps dirigé contre PrfA, est plus élevée dans les mutants *hprK* et *ptsH* que dans le mutant *ΔccpA* et la souche sauvage. Cette synthèse est beaucoup plus faible en présence de cellobiose qu'en présence de glucose, mannose, et glycérol. En se basant sur cette étude, nous serons tentés de suggérer que c'est la synthèse et non pas l'activité de PrfA qui est régulée par des mutations spécifiques (*hprK* et *ptsH*) ou par la présence de certains sucres. Ces résultats sont en contradiction avec les études antérieures entre autres celle de Milenbachs et ses collaborateurs (Milenbachs *et al.*, 1997).

La comparaison des profils transcriptomiques des mutants *hprK* et *ccpA* avec celui de la souche sauvage, indique que la surexpression des gènes de virulence PrfA-dépendants dans le mutant *hprK* est corrélée avec la répression de l'expression des gènes dépendants du transport de glucose par le PTS. Plus encore, la croissance en présence du glycérol, sucre non-PTS, active PrfA. Ces résultats suggèrent que l'un des composants du PTS non impliqué dans la RC CcpA-dépendante, serait impliqué dans la modulation de l'activité de PrfA (Mertins *et al.*, 2006), ce qui concorde avec notre hypothèse de travail.

Les mutants construits dans cette étude, portant des délétions de *hprK*, *ccpA* ou *ptsH*, posent deux problèmes : 1. un problème de stabilité, ainsi à 30°C nous observons plus de 95% de révertants et 2. un effet polaire, en fait la transcription des gènes en opéron avec ces derniers, est modifiée car les délétions ne sont pas en phase. Toutes les tentatives d'obtention de mutants de délétion en phase, et stables (par double recombinaison homologue) ont échoué (Mertins *et al.*, 2006), ce qui corrobore les problèmes auxquels nous avons fait face.

V. Conclusions et perspectives

Au terme de ce travail, nous avons pu démontrer que :

- La RC de *hly*, exercée par les sucres glucose et fructose, observée chez *L. monocytogenes* est aussi fonctionnelle chez BUG1199 de *B. subtilis*
- La surproduction de la P-Ser-HPr due à la présence de sucres répresseurs (glucose, fructose), ou à des mutations spécifiques (*hprKV267F* ou $\Delta ccpA$) inhibe l'activité de PrfA réprimant ainsi l'expression de la fusion *hly-lacZ* de *L. monocytogenes* dans la souche BUG 1199 de *B. subtilis* en présence d'IPTG.
- Pour être active, PrfA a besoin d'un PTS fonctionnel. La P-Ser-HPr en réduisant la vitesse de transfert du groupement phosphate dans le PTS, contrôle l'activité de PrfA; Il ne s'agit pas d'un effet direct telle une interaction protéine-protéine
- Cette répression est CcpA indépendante.
- Dans le mutant *hprKV267F*, cette répression est observée en absence de glucose et ne fait donc pas intervenir les intermédiaires de la glycolyse comme le FBP.
- Dans le double mutant *hprKV267F, ptsHS46A*, la répression est levée, ce qui implique que ce n'est pas HPrK/P qui régule l'activité de PrfA en la phosphorylant.
- EI ne phosphoryle pas PrfA, la P~His-HPr non plus.
- HPrK/P de *L. monocytogenes* est capable de déphosphoryler la P-Ser-HPr de *B. subtilis*.

Plusieurs perspectives à ce travail peuvent être envisagées à court et long terme. Nous proposons de les classer en trois catégories.

V.1. Approche génétique et moléculaire : Rôle du PTS dans la régulation de

PrfA et l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants :

Ainsi il serait judicieux d'introduire les mutations *hprKV267F*, $\Delta ptsH$ et $\Delta ptsI$ dans le génome de *L. monocytogenes* afin de reconfirmer le modèle *B. subtilis*.

Il est aussi important d'inactiver ou muter des gènes codant des EII ayant un rôle probable dans la régulation de PrfA. Ces derniers sont sélectionnés en fonction de leur spécificité vis-à-vis de certains sucres répresseurs, en fonction des données de la littérature et finalement en fonction de leur présence/absence dans certaines souches, sérovars, ou espèces. Parmi les EII potentielles, nous suggérons, l'homologue à *ypqE* de *B. subtilis*, EIIA^{cel} et EIIB^{cel} de

l'opéron *csr* ou aussi les 5 des 8 PTS de la classe des β -glucosides présents chez *L. monocytogenes* et absents chez *L. innocua*.

Il serait aussi important de muter le gène *yhbJ*, qui code pour une protéine de fonction inconnue, et qui serait impliquée dans la virulence des bactéries. Cette hypothèse est soutenue par la découverte qu'un mutant $\Delta yhbJ$ de *Neisseria gonorrhoea* aurait un phénotype similaire à un mutant $\Delta hprK$ en terme d'adhésion, de survie à l'intérieur de l'hôte, et de rétraction des pili (communication personnelle de M. Taha, S. Poncet et J. Deutscher).

Il serait également intéressant de suivre l'expression des gènes de virulence de *L. monocytogenes* dans des conditions répressives (présence de sucres répresseurs, mutations) soit par PCR en temps réel, soit en les fusionnant respectivement à un gène rapporteur comme le gène codant la GFP.

V.2. Approche biochimique : Caractérisation biochimique des interactions entre les protéines du PTS et PrfA :

Si la P~His-HPr interagit directement avec PrfA, il convient de mettre en évidence cette interaction potentielle par coimmunoprécipitation ou par le système Biacore. Par ailleurs, cette éventuelle interaction pourrait être mise en évidence par complémentation fonctionnelle de l'activité PTS spécifique des β -glucosides dans le mutant RHHGM1475. Ainsi des quantités limitantes de P~His-HPr seront rajoutées aux extraits bactériens de RHHGM1475 afin de compléter l'activité PTS spécifique des β -glucosides. Ensuite des quantités croissantes de PrfA seront rajoutées au mélange réactionnel, et l'activité de la 6-phospho- β -glucosidase sera suivie. Si la P~His-HPr interagit avec PrfA, la complémentation fonctionnelle ne fonctionne plus et aucune activité PTS spécifique des β -glucosides ne sera décelée.

Toutefois si l'hypothèse que la P~His-HPr interagisse avec PrfA pour l'activer soit écartée, il faut rechercher parmi les EII ou autres protéines, un possible interactant de PrfA, et cela par analyse protéomique, par Tap-Tag, en faisant des tests double et « pseudo » - triple hybride ou aussi en criblant une banque de mutants par transposition de *B. subtilis* BUG1199. Une fois les gènes cibles sont détectés, il faut les inactiver et déterminer la signification fonctionnelle de ces interruptions ainsi que leurs conséquences sur l'activité de

PrfA et donc sur la virulence de *L. monocytogenes*. Enfin il faudrait produire ces protéines à partir de vecteur d'expression et tenter de démontrer une possible interaction avec PrfA.

Il convient également de trouver d'autres interactants de PrfA, soit par coimmunoprécipitation, soit par retard sur gel, ou aussi en fusionnant *prfA* à un gène codant pour une protéine membranaire et en purifiant le contenu protéique de la membrane bactérienne. Cette dernière technique a été utilisée pour mettre en évidence l'interaction entre le régulateur transcriptionnel Mlc d'*E. coli* et l'EIICB^{Glc} (Seitz *et al.*, 2003).

Si une modification par phosphorylation est mise en évidence en comparant les deux formes de PrfA, active et inactive par spectroscopie de masse, il convient de déterminer le site de phosphorylation de PrfA, la nature de cette phosphorylation (thermolabile ou thermostable), puis essayer de déterminer une phosphatase permettant le retour vers un état non actif en déphosphorylant la P-PrfA, et d'essayer de l'inhiber.

Il convient également de vérifier si les interactions avec PrfA seraient aussi valides avec l'une des formes mutées (PrfA*), par exemple PrfAG145S.

V.3. Modèle animal in vivo : Rôle du PTS dans le processus infectieux de *L. monocytogenes*.

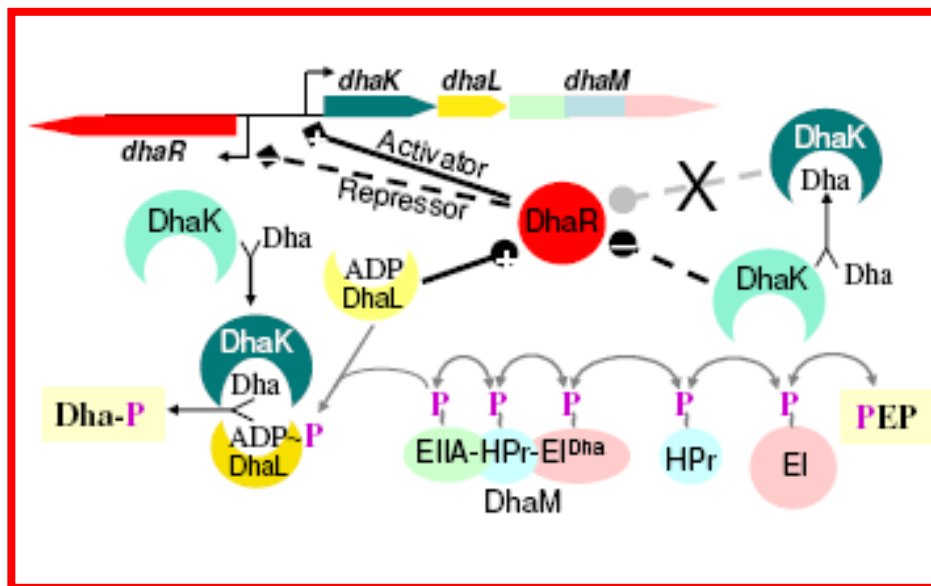
In fine, il serait intéressant d'étudier les mutants de *L. monocytogenes* (construits dans V.1) dans un modèle d'infection. Il faut donc analyser le comportement de ces mutants sur des cellules en culture (cellules hépatocytaires, épithéliales,...). Aussi il est important d'étudier leur survie et leur prolifération *in vivo*, dans un modèle animal (souris ou cobaye, inoculation par voie orale ou intraveineuse)

VI.1. Annexe 1

Initiation du sujet : Implication du système *dha* dans la résistance de *L. monocytogenes* et *L. innocua* à la pédiocine

Un autre aspect important de la virulence chez *L. monocytogenes* est sa résistance à la pédiocine qui fait intervenir PedB. Des études bio-informatiques indiquent que *L. monocytogenes* (et *L. innocua*) possède(nt) un système de transport de la dihydroxyacétone (*lmo0341-lmo0352*). Bien que les systèmes *dha* ne soient pas vraiment des PTS, chez beaucoup de bactéries, la dihydroxyacétone kinase (DhaK) reçoit un groupement phosphorylé de la P~EIIA^{Man} du PTS. D'une manière intéressante, le dernier gène (*lmo0341*) de l'opéron *dha*, serait *pedB* responsable de la résistance de *Listeria* à la pédiocine. Cette organisation opéronique est probablement significative. Afin de mettre en évidence un lien entre le PTS *dha*-like et la résistance de *Listeria* à la pédiocine, il est nécessaire de démontrer la structure opéronique du système *dha*, et de déterminer sa spécificité de substrat.

Fig. 59 : Cascade de phosphorylation du PTS transportant la dihydroxyacétone chez *E. coli* (Deutscher et al., 2006)



Chez *E. coli*, la cascade de phosphorylation du PTS transportant la dihydroxyacétone, à partir du PEP jusqu'à ce substrat est médiée par 5 protéines distinctes (EI, HPr, DhaM, DhaL, et DhaK). DhaM est composé de 3 domaines PTS : une EI tronquée, une HPr et une EIIA^{Man}. Le phosphate du domaine P~EIIA^{Man} de DhaM, est transféré à une molécule

d'ADP fixée à DhaL qui va ensuite phosphoryler une molécule de Dha fixée à DhaK. L'expression de l'opéron *dha* est régulée par un activateur transcriptionnel DeoR-like, nommé DhaR. L'expression de *dhaR* elle-même, est négativement contrôlée : lorsque Dha est présente dans la cellule, elle est rapidement phosphorylée par DhaL qui a fixé une molécule d'ADP. Le complexe DhaL/ADP, se fixe sur DhaR et stimule ses fonctions régulatrices. DhaK interagit tout seul avec DhaR et régule négativement son activité, alors que le complexe DhaK/Dha formé lorsque Dha est présente dans la cellule, n'interagit pas avec DhaR. Il est important de signaler que dans d'autres organismes, DhaM est formée uniquement d'un seul domaine PTS (non pas trois), le domaine EIIA. C'est le cas de *L. monocytogenes* dont DhaM (codée par *lmo0351*) est constituée uniquement du domaine EIIA^{Man}. Chez ces bactéries, HPr transfère probablement son groupement phosphate directement à EIIA. Nous avons cherché à démontrer cette hypothèse chez *L. monocytogenes* et à tester l'implication du PTS *dha*-like dans la résistance de *Listeria* à la pédiocine.

Dans cette perspective, trois gènes de l'opéron *dha*, *lmo0347*, *lmo0348* et *lmo0351* codant respectivement pour des homologues de DhaL, DhaK, et DhaM ont été clonés dans le vecteur d'expression pQE30, afin de produire et purifier ces protéines his-taguées.

Une expérience de transfert de groupement phosphate a permis de mettre en évidence que l'unique domaine EIIA^{Man} de DhaM de *L. monocytogenes* est phosphorylé par HPr de *B. subtilis* en présence de EI de *L. casei* et du PEP.

L'opéron *dha* de *L. monocytogenes* renferme également un régulateur DeoR-like, homologue à DhaR, codé par *lmo0352*. Nous avons donc proposé l'hypothèse suivante : DhaR de *L. monocytogenes*, régulerait la résistance de cette bactérie à la pédiocine et serait elle-même contrôlée par la disponibilité en Dha dans la cellule. Ainsi en absence de Dha, DhaK se fixe sur DhaR et inhibe son activité, ce qui empêche l'expression du gène *pedB* (*lmo0341*) DhaR-dépendant ; cela se traduit par une sensibilité de *L. monocytogenes* à la pédiocine. Toutefois en présence de Dha dans la cellule, une double régulation positive s'opère : d'un côté Dha se complexe avec DhaK, et le complexe Dha/DhaK empêche l'interaction de DhaK avec DhaR, cela se traduit par une levée de la répression de l'expression de *dhaR*, et donc une activation de l'expression de *pedB* ; phénotypiquement *L. monocytogenes* acquiert une résistance à la pédiocine. D'un autre côté, en présence de Dha, la cascade de phosphorylation du PTS *dha*-like se met en

œuvre (PEP→EI→HPr→EIIA^{Man}), permettant la phosphorylation du domaine EIIA^{Man} de DhaM à partir de HPr de *L. monocytogenes*. La P~EIIA^{Man} de DhaM transmet son groupement phosphate à l'ADP fixé à DhaL, et le complexe DhaL/ADP se fixe sur DhaR et stimule ses fonctions régulatrices ; cela se traduit par une activation de l'expression des gènes soumis à DhaR, dont probablement *pedB*, et donc une résistance de *Listeria* à la pédiocine.

Dans le but de déterminer si DhaR contrôle la résistance de *L. monocytogenes* (et *L. innocua*) à la pédiocine, au dépens de la présence ou pas de Dha, nous avons construit un plasmide permettant d'interrompre *dhaR* dans *L. innocua* BUG499 (fournie par Dr Pascale Cossart). Ainsi environ 500 pb (région 33→525) de DhaR ont été remplacés par une cassette chloramphénicole, avec en amont et en aval deux régions identiques à celles entourant *dhaR* dans *L. innocua* et amplifiées sur l'ADN génomique de cette dernière ; le tout est cloné dans le vecteur pHV1248ΔTn10, permettant une simple insertion du plasmide entier dans le gène *dhaR* et donc son inactivation. Une première tentative d'obtention d'un mutant Δ*deoR* de *L. innocua*, a réussi, toutefois l'analyse phénotypique de ce mutant, notamment pour sa résistance à la pédiocine est en cours. En effet la pédiocine est une protéine extracellulaire d'environ 4 kDa. Les essais de purification (précipitation à l'ammonium sulfate saturé à 80% et 100%) de cette protéine à partir de surnageant de culture de *Pediococcus acidilactici* ont échoué. Toutefois en étalant une culture de *L. monocytogenes* ou *L. innocua*, sur une gélose LB, puis en rajoutant des disques stériles sur lesquels nous appliquons quelques gouttes d'une culture de *P. acidilactici*, nous constatons la formation d'un halo clair autour des disques ; cela signifie que la pédiocine produite par *P. acidilactici* inhibe la croissance de *L. monocytogenes* et *L. innocua*. Il serait donc judicieux de refaire le test en rajoutant de la Dha au milieu de culture, mais également d'effectuer le test de survie à la pédiocine sur la protéine purifiée.

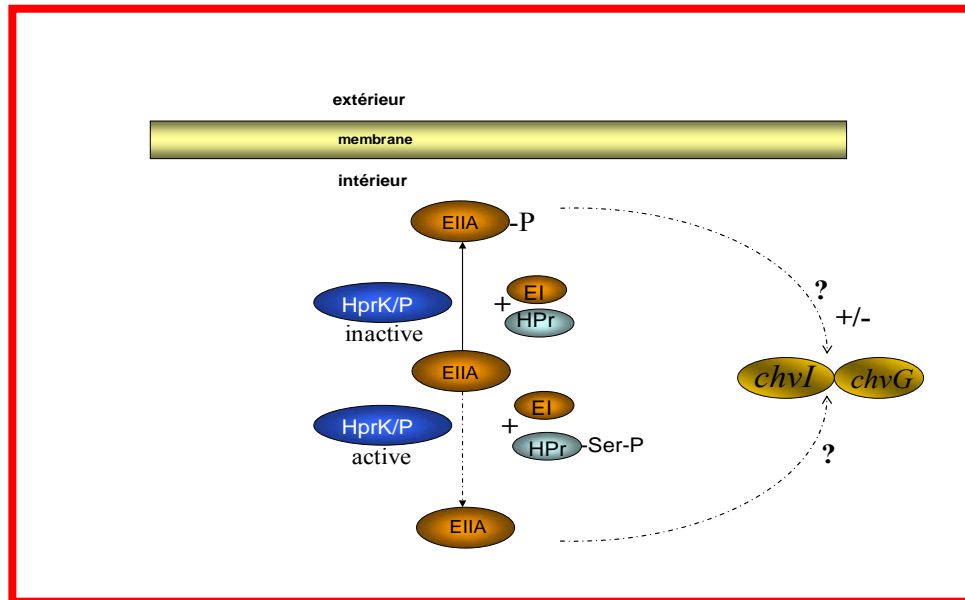
Ce travail a été entièrement initié au cours de ma thèse avec l'aide de Jamila Naït-Abdella, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Dans un premier, des Northern-blots peuvent être effectués pour déterminer si l'ensemble des gènes forme réellement un opéron. Une séquence *cre*, site de fixation du complexe P-Ser-HPr/CcpA, est retrouvée au niveau de la boîte -10 potentielle de cet opéron. L'expression de l'opéron sera suivie en présence de différents substrats carbonés pour déterminer lesquels modulent l'expression de cet opéron, et si cela aurait un effet sur la résistance à la pédiocine. Dans les différents mutants de *L.*

monocytogenes construits (mutants *hprKV267F*, Δ *ptsI*, et Δ *ptsH*), la résistance à la pédiocine sera analysée afin de confirmer ou d'infirmer l'implication du PTS dans cette résistance. L'interaction entre PedB et la pédiocine pourrait être testée par BIACORE ou gel shift. Toutefois un criblage de mutants aléatoires de PedB, devenus sensibles à cette bactériocine, permettra de déterminer les domaines de PedB nécessaires à la résistance à la pédiocine. Ces résultats permettront de mieux appréhender le mécanisme de résistance à la pédiocine chez *L. monocytogenes* et *L. innocua*.

VI.2. Annexe 2

Contribution au sujet : Implication du PTS et de l'HprK/P dans la régulation du système à deux composants (ChvI-ChvG) chez *Agrobacterium tumefaciens*.

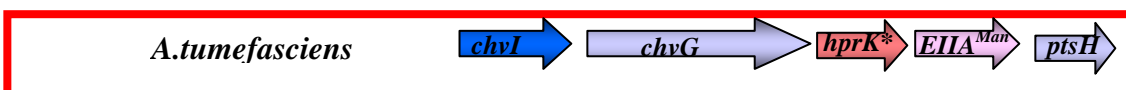
Fig. 60 : Hypothèse de travail



L'HprK/P est la protéine clé de la régulation du métabolisme de carbone chez *B. subtilis*. L'analyse des génomes a révélé, que HprK/P est absente chez les entérobactéries, en revanche elle est présente chez des protéobactéries pathogènes et symbiotiques.

Chez des α -protéobactéries comme *Agrobacterium tumefaciens*, on trouve en opéron avec *hprK* des gènes codant des protéines du PTS ainsi que deux gènes codant un système à deux composants ChvI-ChvG de la famille EnvZ-OmpR. Ce système contrôlerait l'expression des gènes impliqués dans la pathogénicité et l'adhésion cellulaire. L'organisation opérone ainsi que des expériences préliminaires suggèrent une implication de HprK/P et des composants du PTS dans la régulation du système à deux composants ChvI-ChvG et donc de l'adhésion d'*A. tumefaciens* avec ces cellules hôtes.

Fig. 61 : Environnement génique de *hprK* chez *A. tumefaciens*



Lors de ce travail, j'ai cloné *ptsH* codant HPr d'*A. tumefasciens* dans trois différents vecteurs d'expression, pQE30 (étiquette poly-histidine en N-terminale), pQE70 (étiquette poly-histidine en C-terminale) et pGEX-2T (étiquette GST en C-terminale).

Seule la purification d'HPr portant un tag glutathione, a réussi. J'ai été également amené à purifier HprK/P d'*A. tumefasciens* (*hprK* a été cloné dans pQE30 par Mlle Arbia Khémiri). Cette dernière est tronquée dans sa partie N-terminale. Mlle Khémiri avait tenté de cloner le gène codant l'EIIA^{Man} qui est en opéron avec *hprK*. Toutefois il s'est avéré que le gène cloné portait une mutation ponctuelle. C'est pourquoi, j'ai effectué une mutagenèse dirigée pour corriger cette mutation : un oligonucléotide dégénéré permettant de corriger la mutation a été construit. A l'aide de PCR à triple voie, je suis parvenue à restaurer la version sauvage de ce gène. Suite à cela, j'ai purifié l'EIIA^{Man}.

J'ai réalisé par la suite un test de phosphorylation d'HPr d'*A. tumefasciens* par l'HprK/P de la même bactérie. Il s'est avéré que l'HprK/P d'*A. tumefasciens* est capable de phosphoryler son HPr en présence d'ATP ([³²P] ATP), toutefois aucune activité phosphorylase de l'HprK/P n'a été mise en évidence.

Ce travail est poursuivi par Mlle Alexa Bourand qui cherche à produire les deux protéines du système à deux composants ChvI-ChvG, et à démontrer une éventuelle interaction de ces protéines avec HPr ou l'EIIA^{Man} d'*A. tumefasciens*.

VII. Références Bibliographiques

- Allen, G. S., Steinhauer, K., Hillen, W., Stülke, J. & Brennan, R. G. 2003. Crystal structure of HPr kinase/phosphatase from *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 326: 1203-1217
- Alpert CA, Dorschug M, Saffen D, Frank R, Deutscher J, Hengstenberg W. 1985. The bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Isolation of active site peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography and determination of their primary structure. *J Chromatogr.* 326:363-71
- Alvarez-Dominguez C, Roberts R, Stahl PD. 1997. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J Cell Sci.* 110 (Pt 6):731-43
- Angelidis AS, Smith GM. 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7492-8
- Arnaud M, Vary P, Zagorec M, Klier A, Debarbouille M, Postma P, Rapoport G. 1992. Regulation of the *sacPA* operon of *Bacillus subtilis*: identification of phosphotransferase system components involved in SacT activity. *J Bacteriol.* 174(10):3161-70
- Arnaud, M., Debarbouille, M., Rapoport, G., Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. (1996). *In vitro* reconstitution of transcriptional antitermination by the SacT and SacY proteins of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 271, 18966-18972
- Audette GF, Engelmann R, Hengstenberg W, Deutscher J, Hayakawa K, Quail JW, Delbaere LT. 2000. The 1.9 Å resolution structure of phospho-serine 46 HPr from *Enterococcus faecalis*. *J Mol Biol.* 303(4):545-53
- Bachem, S. & Stülke, J. 1998. Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the phosphotransferase system. *J Bacteriol.* 180, 5319-5326
- Barabote RD, Saier MH Jr. 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(4):608-34
- Beauregard KE, Lee KD, Collier RJ, Swanson JA. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med.* 186(7):1159-63

- Begley M, Sleator RD, Gahan CG, Hill C. 2005. Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 73(2):894-904
- Behari, J., Youngman, P. 1998. A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol* 180:6316-6324
- Bierne, H., and Cossart, P. 2002. InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasins and a growth factor. *J Cell Sci* 115: 3357-3367
- Bierne, H., Garandeau, C., Pucciarelli, M.G., Sabet, C., Newton, S., Garcia-del Portillo, F., Cossart, P., and Charbit, A. 2004. Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 186: 1972-1982
- Bockmann R, Dickneite C, Middendorf B, Goebel W, Sokolovic Z. 1996. Specific binding of the *Listeria monocytogenes* transcriptional regulator PrfA to target sequences requires additional factor(s) and is influenced by iron. *Mol Microbiol.* 22(4):643-53
- Bockmann, R., Dickneite, C., Goebel, W., and Bohne, J. 2000. PrfA mediates specific binding of RNA polymerase of *Listeria monocytogenes* to PrfA-dependent virulence gene promoters resulting in a transcriptionally active complex. *Mol Microbiol* 36: 487-497
- Boël, G., Mijakovic, I., Maze, A., Poncet, S., Taha, M. K., Larribe, M., Darbon, E., Khemiri, A., Galinier, A. & Deutscher, J. 2003. Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5: 206-15
- Bohne, J., Sokolovic, Z., and Goebel, W. 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 11: 1141-1150
- Bohne J, Kestler H, Uebele C, Sokolovic Z, Goebel W. 1996. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol Microbiol.* 20(6):1189-98
- Borezee E, Pellegrini E, Beretti JL, Berche P. 2001. SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.* 147(Pt 11):2913-23

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Braun L, Dramsi S, Dehoux P, Bierne H, Lindahl G, Cossart P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol.* 25(2):285-94
- Braun L, Nato F, Payrastre B, Mazie JC, Cossart P. 1999. The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Mol Microbiol.* 34(1):10-23
- Braun, L., Ghebrehiwet, B., and Cossart, P. 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J* 19: 1458-1466
- Brehm, K., Ripio, M.T., Kreft, J., Vazquez-Boland, J.A. 1999. The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by β -glucosides. *J Bacteriol* 181:5024-5032
- Brochu, D. & Vadeboncoeur, C. 1999. The HPr(Ser) kinase of *Streptococcus salivarius*: purification, properties, and cloning of the *hprK* gene. *J. Bacteriol.* 181:709-717
- Buchrieser C, Rusniok C, Kunst F, Cossart P, Glaser P; *Listeria* Consortium. 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35(3):207-13. Review
- Butler MJ, Deutscher J, Postma PW, Wilson TJ, Galinier A, Bibb MJ. 1999. Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett.*177(2):279-88
- Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, Frangeul L, Cossart P. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 10(5):238-45. Review
- Cabanes, D., Sousa, S., Cebria, A., Lecuit, M., Garcia-del Portillo, F., and Cossart, P. 2005. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *Embo J* 24: 2827-2838

- Camilli A, Goldfine H, Portnoy DA. 1991. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med.* 173(3):751-4
- Camilli, A., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* 8: 143-157
- Casadevall A, Pirofski LA. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 67(8):3703-13. Review
- Chakraborty, T., Leimeister-Wachter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T., and Notermans, S. 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* 174: 568-574
- Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J., Claiborne, A. 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
- Charrier, V., Deutscher, J., Galinier, A. & Martin-Verstraete, I. 1997. Protein phosphorylation chain of a *Bacillus subtilis* fructose-specific phosphotransferase system and its participation in regulation of the expression of the *lev* operon. *Biochemistry* 36 : 1163-1172
- Chassy BM, Thompson J. 1983. Regulation of lactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system and beta-D-phosphogalactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol.* 154(3):1195-203
- Chastanet A, Derre I, Nair S, Msadek T. 2004. *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol.* 186(4):1165-74
- Chauvaux, S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. 1998. CcpB, a novel transcription factor implicated in catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180: 491-497
- Chauvin, F., Brand, L. & Roseman, S. 1994a. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer equilibrium by fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* 269 : 263-20269

- Chauvin, F., Brand, L. & Roseman, S. 1994b. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer transition kinetics by fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* 269 : 270-20274
- Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vazquez-Boland JA; European *Listeria* Genome Consortium. 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*. 8;99(1):431-6
- Christensen DP, Benson AK, Hutkins RW. 1998. Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* scott A *ptsH* and *ptsI* genes, coding for HPr and enzyme I, respectively, of the phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol*. 64(9):3147-52
- Christensen, D.P., Benson, A.K., Hutkins, R.W. 1999. Mutational analysis of the role of HPr in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 65:2112-2115
- Coffey A, van den Burg B, Veltman R, Abee T. 2000. Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*. 88(1):132-41
- Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., and Berche, P. 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 57: 3629-3636
- Cossart P, Kocks C. 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. 13(3):395-402. Review
- Cossart P. 2002. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int. J. Med. Microbiol*. 291: 401-409
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., and Lecuit, M. 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 13: 23-31
- Cotter PD, O'Reilly K, Hill C. 2001. Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. *J Food Prot*. 64(9):1362-8
- Cotter PD, Gahan CG, Hill C. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol Microbiol*. 2001 40(2):465-75

- Cowart ER, Lashmet J, McIntosh ME and Adams TJ. 1990. Adherence of a virulent strain of *Listeria monocytogenes* to the surface of a hepatocarcinoma cell line via lectin-substrate interaction. *Microbiol.* 153(3) : 282-286
- Cozzone, A.J. 2005. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Biol Biotechnol*
- Dalet K, Arous S, Cenatiempo Y, Hechard Y. 2003. Characterization of a unique sigma54-dependent PTS operon of the lactose family in *Listeria monocytogenes*. *Biochimie.* 85(7):633-8
- Dannelly HK, Roseman S. 1992. NAD⁺ and NADH regulate an ATP-dependent kinase that phosphorylates enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(23):11274-6
- Dannelly HK, Roseman S. 1996. Active site phosphorylation of enzyme I of the bacterial phosphotransferase system by an ATP-dependent kinase. *J Biol Chem.* 271(25):15285-91
- Darbon, E., Galinier, A., Le Coq, D., Deutscher, J. 2001. Phosphotransfer functions of mutated *Bacillus subtilis* HPr-like protein Crh carrying a histidine in the active site. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:439-444
- Darbon, E., Servant, P., Poncet, S., Deutscher, J. 2002. Antitermination by GlpP, catabolite repression *via* CcpA, and inducer exclusion elicited by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression. *Mol Microbiol* 43:1039-1052
- David V, Gouin E, Troys MV, Grogan A, Segal AW, Ampe C, Cossart P. 1998. Identification of cofilin, coronin, Rac and capZ in actin tails using a *Listeria* affinity approach. *J Cell Sci.* (Pt 19):2877-84
- Derre I, Rapoport G, Devine K, Rose M, Msadek T. 1999. ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 32(3):581-93
- Derre I, Rapoport G, Msadek T. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 31(1):117-31
- De Reuse H, Huttner E, Danchin A. 1984. Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: evidence for the existence of a single transcriptional unit. *Gene.* 32(1-2):31-40

- De Reuse H, Roy A, Danchin A. 1985. Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence of the *ptsH* gene. *Gene* 35(1-2):199-207
- Deutscher, J. & Saier, M. H., 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
- Deutscher, J., Kessler, U., Alpert, C. A. & Hengstenberg, W. 1984. Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-ser-HPr and its possible regulatory function. *Biochemistry* 23:4455- 4460
- Deutscher, J., Engelmann, R. 1984. Purification and characterization of an ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* 23:157-162
- Deutscher J, Sauerwald H. 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(3):829-36
- Deutscher, J., Pevec, B., Beyreuther, K., Kiltz, H. H. & Hengstenberg, W. 1986. Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry* 25: 6543-6551
- Deutscher, J., Sossna, G. & Gonzy-Treboul, G. 1989. Regulatory functions of the phosphocarrier protein HPr of the phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 5:167-174
- Deutscher, J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier Jr, M.H., Steinmetz, M. 1994. Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176:3336-3344
- Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., Hillen, W. 1995. Protein kinase-dependent HPr/*CcpA* interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 15:1049-1053

- Deutscher, J., Fischer, C., Charrier, V., Galinier, A., Lindner, C., Darbon, E. & Dossonnet, V. 1997. Regulation of carbon metabolism in gram-positive bacteria by protein phosphorylation. *Folia Microbiol (Praha)* 42:171-178
- Deutscher, J., Galinier, A., Martin-Verstraete, I. 2002. Carbohydrate uptake and metabolism; in Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (eds.): *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. Washington, D.C., ASM Press, pp 129-150
- Deutscher, J., Herro, R., Bourand, A., Mijakovic, I., and Poncet, S. 2005. P-Ser-HPr--a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1754: 118-125
- de Vos WM, Boerrigter I, van Rooyen RJ, Reiche B, Hengstenberg W. 1990. Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* 265(36):22554-60
- Dhar G, Faull KF, Schneewind O. 2000. Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry.* 39(13):3725-33
- Dickneite, C., Bockmann, R., Spory, A., Goebel, W., and Sokolovic, Z. 1998. Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol Microbiol* 27: 915-928
- Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wachter M, Wuenscher M, Chakraborty T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11(5):1981-90
- Dons L, Rasmussen OF, Olsen JE. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 6(20):2919-29
- Dons L, Olsen JE, Rasmussen OF. 1994. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. *DNA Seq.* 4(5):301-11
- Dossonnet, V., Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J. 2000. Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr kinase/P-Ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J Bacteriol* 182:2582-2590
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., and Buchrieser, C. 2004. New aspects regarding evolution

- and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* 72: 1072-1083
- Dramsi S, Kocks C, Forestier C, Cossart P. 1993. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol Microbiol.* 9(5):931-41
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inIB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 16: 251-261
- Dramsi S, Cossart P. 2002. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J Cell Biol.* 156(6):943-6
- Dramsi S, Cossart P. 2003. Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infect Immun.* 71(6):3614-8
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. 2004. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 53: 639-649
- Dramsi S, Trieu-Cuot P, Bierne H. 2005. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res Microbiol.* 156(3):289-97.
- Drevets, D.A. 1999. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect Immun* 67: 3512-3517
- Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., Labadie, J. 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 68:1491-1498
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., and Cossart, P. 2002. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* 45: 1095-1106
- Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol.*;58:587-610. Review
- Dussurget O, Dumas E, Archambaud C, Chafsey I, Chambon C, Hebraud M, Cossart P. 2005. *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol Lett.* 250(2):253-61

- Eisermann R, Fischer R, Kessler U, Neubauer A, Hengstenberg W. 1991. Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Purification and protein sequencing of the *Staphylococcus carnosus* histidine-containing protein, and cloning and DNA sequencing of the *ptsH* gene. Eur J Biochem. 10;197(1):9-14
- Eiting, M., Hagelüken, G., Schubert, W.D., Heinz, D.W. 2005. The mutation G145S in *PrfA*, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. Mol Microbiol 56:433-446
- el-Kabbani, O. A., Waygood, E. B. & Delbaere, L. T. 1987. Tertiary structure of histidine-containing protein of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Escherichia coli*. J Biol Chem 262: 12926-12929
- Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C, Hess J, Lottspeich F, Goebel W, Sokolovic Z. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. Mol Microbiol. 21(4):823-37
- Ermolaeva S, Novella S, Vega Y, Ripio MT, Scotti M, Vazquez-Boland JA. 2004. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. Mol Microbiol. 52(2):601-11
- Fieulaine, S., Morera, S., Poncet, S., Monedero, V., Gueguen-Chaignon, V., Galinier, A., Janin, J., Deutscher, J. & Nessler, S. 2001. X-ray structure of HPr kinase: a bacterial protein kinase with a P-loop nucleotide binding domain. EMBO J. 20:3917-3927
- Finlay BB, Cossart P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science. 2;276(5313):718-25
- Flanary PL, Allen RD, Dons L, Kathariou S. 1999. Insertional inactivation of the *Listeria monocytogenes cheYA* operon abolishes response to oxygen gradients and reduces the number of flagella. Can J Microbiol. 45(8):646-52
- Fox D.K., Meadow N.D., and Roseman S. 1986. Phosphate transfer between acetate kinase and enzyme I of the bacterial phosphotransferase system. J Biol Chem. 261:13498-13503
- Fox D.K., Presper K.A., Adhya S., Roseman S., Garges S. 1992. Evidence for two promoters upstream of the *pts* operon : regulation by the cAMP receptor protein regulatory complex. Proc Natl Acad Sci USA. 89 : 7056-7059

- Freitag, N.E., Youngman, P., and Portnoy, D.A. 1992. Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 174: 1293-1298
- Freitag NE, Rong L, Portnoy DA. 1993. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. Infect Immun. 61(6):2537-44
- Freitag NE, Portnoy DA. 1994. Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*. Mol Microbiol. 12(5):845-53
- Fujita, Y. & Miwa, Y. 1994. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon mediated by the CcpA protein. J Bacteriol 176:511-513
- Fujita, Y., Miwa, Y., Galinier, A., Deutscher, J. 1995. Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt cis*-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. Mol Microbiol 17:953-960
- Gagnon G, Vadeboncoeur C, Levesque RC, Frenette M. 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(1):71-8
- Gagnon G, Vadeboncoeur C, Frenette M. 1993. Phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*: characterization of the *ptsH* gene and its product. Gene. 136(1-2):27-34
- Gagnon G, Vadeboncoeur C, Gauthier L, Frenette M. 1995. Regulation of *ptsH* and *ptsI* gene expression in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. Mol Microbiol. 16(6):1111-21
- Gagnon G, Vadeboncoeur C, Frenette M. 1995. Transcriptional regulation of the *pts* operon in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. Dev Biol Stand.85:357-62
- Gahan CG, Hill C. 2000. The use of listeriolysin to identify *in vivo* induced genes in the gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. 36(2): 498-507
- Gahan CG, O'Mahony J, Hill C. 2001. Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating *in vivo* expression. Infect Immun. 69(6):3924-32

- Gaillard, J.L., Berche, P., and Sansonetti, P. 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 52: 50-55
- Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P. 1987. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* 55(11):2822-9
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65: 1127-1141
- Gaillard JL, Jaubert F, Berche P. 1996. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes *in vivo*. *J Exp Med.* 183(2):359-69
- Gaillot O, Pellegrini E, Bregenholt S, Nair S, Berche P. 2000. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 35(6):1286-94
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J., Martin-Verstraete, I. 1997. The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8439-8444
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M.-C., Deutscher, J., Haiech, J. 1998. New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1823-1828
- Galinier, A., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. 1999. Phosphorylation of either Crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *J Mol Biol* 286, 307-314
- Gassner M, Stehlik D, Schrecker O, Hengstenberg W, Maurer W, Ruterjans H. 1977. The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. ¹H and ³¹P-nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr. *Eur J Biochem.* 75(1):287-96
- Geerse RH, van der Pluijm J, Postma PW. 1989. The repressor of the PEP:fructose phosphotransferase system is required for the transcription of the *pps* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 218(2):348-52

- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 55(7):1641-6
- Geoffroy C., Raveneau, J ., Beretti, J. L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.A., Alouf, J.E., and Berche, P. 1991. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 59(7): 2382-2388
- Giammarinaro, P. & Paton, J. C. 2002. Role of RegM, a homologue of the catabolite repressor protein CcpA, in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 70: 5454-5461
- Gilbreth, S.E., Benson, A.K., Hutkins, R.W. 2004. Catabolite repression and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol* 49:95-98
- Ginsburg A, Peterkofsky A. 2002. Enzyme I: the gateway to the bacterial phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system. *Arch Biochem Biophys.* 397(2):273-8. Review
- Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couve E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Dominguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, Garcia-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gomez-Lopez N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Perez-Diaz JC, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vazquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science.* 294(5543):849-52.
- Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA. 2002. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol.* 156(6):1029-38
- Gonzy-Treboul G, Steinmetz M. 1987. Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: cloning of the region containing the *ptsH* and *ptsI* genes and evidence for a *crr*-like gene. *J Bacteriol.* 169(5):2287-90
- Gonzy-Treboul G, Zagorec M, Rain-Guion MC, Steinmetz M. 1989. Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*:

- nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. *Mol Microbiol.* 3(1):103-12
- Gosseringer, R., Kuster, E., Galinier, A., Deutscher, J. & Hillen, W. 1997. Cooperative and noncooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J Mol Biol* 266:665-676
- Gouin E, Dehoux P, Mengaud J, Kocks C, Cossart P. 1995. *iactA* of *Listeria ivanovii*, although distantly related to *Listeria monocytogenes actA*, restores actin tail formation in an *L. monocytogenes actA* mutant. *Infect Immun.* 63(7):2729-37
- Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H, Villiers V, Gounon P, Sansonetti PJ, Cossart P. 1999. A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci.* (Pt 11):1697-708
- Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ. 1997. Internalin B promotes the replication of *Listeria monocytogenes* in mouse hepatocytes. *Infect Immun.* 65(12):5137-41
- Grif K, Patscheider G, Dierich MP, Allerberger F. 2003. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(1):16-20
- Groisman EA. 2001a. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol.* 183(6):1835-42. Review
- Groisman EA. 2001b. Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press
- Grundling A, Gonzalez MD, Higgins DE. 2003. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J Bacteriol.* 185(21):6295-307
- Gunnawijk, M.G.W., Poolman, B. 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
- Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis KN. 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 20(1):119-26

- Hammen PK, Waygood EB, Klevit RE. 1991. Reexamination of the secondary and tertiary structure of histidine-containing protein from *Escherichia coli* by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 30(51):11842-50
- Hanawa T, Fukuda M, Kawakami H, Hirano H, Kamiya S, Yamamoto T. 1999. The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones*. 4(2):118-28
- Henkin, T. M., Grundy, F. J., Nicholson, W. L. & Chambliss, G. H. 1991. Catabolite repression of alphaamylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol Microbiol* 5: 575-584
- Henry R, Shaughnessy L, Loessner MJ, Alberti-Segui C, Higgins DE, Swanson JA. 2006. Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol*. 8 (1):107-19 16367870
- Herro, R., Poncet, S., Cossart, P., Buchrieser, C., Gouin, E., Glaser, P., and Deutscher, J. 2005. How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9: 224-234
- Herzberg, O., Reddy, P., Sutrina, S., Saier, M. H., Jr., Reizer, J. & Kapadia, G. 1992. Structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2499-2503
- Hoch, J.A. 1991. Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* 204:305-320.
- Hoe, N.P., and Goguen, J.D. 1993. Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175: 7901-7909
- Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Yoshida H, Takahashi H, Aiba H, Postma PW. 1998. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol Microbiol*. 30(3):487-98
- Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Inada T, Aiba H, Postma PW. 1998. Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 28(4):755-65
- Hubner G, Konig S, Koch MH, Hengstenberg W. 1995. Influence of phosphoenolpyruvate and magnesium ions on the quaternary structure of enzyme I of the

- phosphotransferase system from gram-positive bacteria. *Biochemistry*. 34(48):15700-3
- Hueck C, Kraus A, Hillen W. 1994. Sequences of *ccpA* and two downstream *Bacillus megaterium* genes with homology to the *motAB* operon from *Bacillus subtilis*. *Gene*. 143(1):147-8
- Hueck, C. J. & Hillen, W. 1995. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* 15:395-401
- Hueck, C. J., Kraus, A., Schmiedel, D. & Hillen, W. 1995. Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. *Mol Microbiol* 16: 855-864
- Ireton K, Cossart P. 1997. Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu Rev Genet*. 31:113-38
- Jacquet, Ch.; Brouillé, F.; Saint-Clément, C.; Catimel, B., and Rocourt, J. 1999. La listériose humaine en France en 1998. *Bull. Epidém. Hebdo*. 37:153-154
- Jaradat ZW, Wampler JW, Bhunia AW. 2003. A *Listeria* adhesion protein-deficient *Listeria monocytogenes* strain shows reduced adhesion primarily to intestinal cell lines. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 192(2):85-91
- Jault, J. M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. & Galinier, A. 2000. The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* 275, 1773-1780
- Jia Z, Quail JW, Waygood EB, Delbaere LT. 1993. The 2.0-Å resolution structure of *Escherichia coli* histidine-containing phosphocarrier protein HPr. A redetermination. *J Biol Chem*. 268(30):22490-501
- Jia, Z., Vandonselaar, M., Hengstenberg, W., Quail, J. W. & Delbaere, L. T. 1994. The 1.6 Å structure of histidine-containing phosphotransfer protein HPr from *Streptococcus faecalis*. *J Mol Biol* 236:1341-1355
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110: 551-561
- Jones, D. 1988. The place of *Listeria* among the gram positive bacteria. *Infection* 16: S85-88

- Jones, B. E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. & Klevit, R. E. 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
- Jonquieres, R., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. 2001. Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 42: 955-965
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. M. & Sonenshein, A. L. 2000. CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 295:865-878
- Kalbitzer HR, Hengstenberg W, Rosch P, Muss P, Bernsmann P, Engelmann R, Dorschug M, Deutscher J. 1982. HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high-resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. *Biochemistry*. 21(12):2879-85
- Kalbitzer HR, Neidig KP, Hengstenberg W. 1991. Two-dimensional ¹H NMR studies on HPr protein from *Staphylococcus aureus*: complete sequential assignments and secondary structure. *Biochemistry*. 30(46):11186-92
- Kalbitzer, H. R. & Hengstenberg, W. 1993. The solution structure of the histidine-containing protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* as determined by two-dimensional ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 216:205-214
- Kalbitzer HR, Gorler A, Li H, Dubovskii PV, Hengstenberg W, Kowolik C, Yamada H, Akasaka K. 2000. ¹⁵N and ¹H NMR study of histidine containing protein (HPr) from *Staphylococcus carnosus* at high pressure. *Protein Sci*. 9(4):693-703
- Karatzas KA, Wouters JA, Gahan CG, Hill C, Abee T, Bennik MH. 2003. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol Microbiol*. 49(5):1227-38
- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., and Goebel, W. 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 169: 1291-1297
- Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P. 2006. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol*. 8(3):457-70

- Kim, J. H., Guvener, Z. T., Cho, J. Y., Chung, K. C. & Chambliss, G. H. 1995. Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J Bacteriol* 177: 5129-5134
- Kim, H. J., Roux, A. & Sonenshein, A. L. 2002a. Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Mol Microbiol* 45:179-190.
- Kim, H. J., Jourlin-Castelli, C., Kim, S. I. & Sonenshein, A. L. 2002b. Regulation of the *Bacillus subtilis* *ccpC* gene by *ccpA* and *ccpC*. *Mol Microbiol* 43:399-410
- Klarsfeld AD, Goossens PL, Cossart P. 1994. Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol.* 13(4):585-97
- Klevit, R. E. & Waygood, E. B. 1986. Two-dimensional ¹H NMR studies of histidine-containing protein from *Escherichia coli*. 3. Secondary and tertiary structure as determined by NMR. *Biochemistry* 25: 7774-7781
- Kocks C, Hellio R, Gounon P, Ohayon H, Cossart P. 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci.* 105 :699–710.
- Kohlbrecher D, Eisermann R, Hengstenberg W. 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(7):2208-14
- Kok M, Bron G, Erni B, Mukhija S. 2003. Effect of enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) on virulence in a murine model. *Microbiology.* 149(Pt 9):2645-52
- Kolb, A., Igarashi, K., Ishihama, A., Lavigne, M., Buckle, M., and Buc, H. 1993. *E. coli* RNA polymerase, deleted in the C-terminal part of its alpha-subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the *lacPI* and at the *galPI* promoter. *Nucleic Acids Res* 21: 319-326
- Kollmann TR, Way SS, Harowicz HL, Hajjar AM, Wilson CB. 2004. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol.* 6(3):235-42
- Kraus A, Hillen W. 1997. Analysis of CcpA mutations defective in carbon catabolite repression in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol Lett.* 153(1):221-6

- Kraus, A., Kuster, E., Wagner, A., Hoffmann, K. & Hillen, W. 1998. Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol* 30: 955-963
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., Hengstenberg, W. 1999. The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* 31:59-66
- Kreft, J., and Vazquez-Boland, J.A. 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* 291: 145-157.
- Krüger, S. & Hecker, M. 1995. Regulation of the putative *bglPH* operon for aryl-beta-glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177: 5590-5597
- Krüger, S., Gertz, S., Hecker, M. 1996. Transcriptional analysis of *bglPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J Bacteriol* 178:2637-2644
- Kruse R, Hengstenberg W, Beneicke W, Kalbitzer HR. 1993. Involvement of various amino- and carboxyl-terminal residues in the active site of the histidine-containing protein HPr of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus carnosus*: site-directed mutagenesis with the *ptsH* gene, biochemical characterization and NMR studies of the mutant proteins. *Protein Eng.* 6(4):417-23
- Kuhn M, Goebel W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 57(1):55-61
- Kukuruzinska MA, Harrington WF, Roseman S. 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Studies on the molecular weight and association of enzyme I. *J Biol Chem.* 257(23):14470-6
- Kukuruzinska MA, Turner BW, Ackers GK, Roseman S. 1984. Subunit association of enzyme I of the *Salmonella typhimurium* phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. Temperature dependence and thermodynamic properties. *J Biol Chem.* 259(19):11679-81
- Kundig W, Ghosh S, Roseman S. 1964. Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 52:1067-74

- Kuster, E., Luesink, E. J., de Vos, W. M. & Hillen, W. 1996. Immunological crossreactivity to the catabolite control protein CcpA *Bacillus megaterium* is found in many gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett 139: 109-115
- Lai, X. & Ingram, L. O. 1995. Discovery of a *ptsHI* operon, which includes a third gene (*ptsT*), in the thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. Microbiology 141, 1443-1449
- Lasa I, David V, Gouin E, Marchand JB, Cossart P. 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. Mol Microbiol. 18(3):425-36
- Lasa I, Cossart P. 1996. Actin-based bacterial motility: towards a definition of the minimal requirements. Trends Cell Biol. 6(3):109-14
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W., and Kreft, J. 1994. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. Mol Microbiol 13: 141-151
- Leboeuf, C., Auffray, Y. & Hartke, A. 2000a. Cloning, sequencing and characterization of the *ccpA* gene from *Enterococcus faecalis*. Int J Food Microbiol 55: 109-113
- Leboeuf, C., Leblanc, L., Auffray, Y., Hartke, A. 2000b. Characterization of the *ccpA* gene of *Enterococcus faecalis*: identification of starvation-inducible proteins regulated by *ccpA*. J Bacteriol 182:5799-5806
- Lebrun M, Mengaud J, Ohayon H, Nato F, Cossart P. 1996. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. Mol Microbiol. 21(3):579-92
- Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P. 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. Infect Immun. 65(12):5309-19
- Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaikin M, Gumbiner B, Cossart P. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. EMBO J. 18(14):3956-63
- Lecuit M, Hurme R, Pizarro-Cerda J, Ohayon H, Geiger B, Cossart P. 2000. A role for alpha-and beta-catenins in bacterial uptake. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(18):10008-13

- Lecuit, M., and Cossart, P. 2001. *Listeria monocytogenes*. Mol Med Microbiol. Sussman, S. (ed). Academic Press 2 : 1437-1462
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., and Cossart, P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. Science 292: 1722-1725
- Lee, S.J., Boos, W., Bouche, J.P., Plumbridge, J. 2000. Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. EMBO J 19:5353-5361
- Leimeister-Wachter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., and Chakraborty, T. 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 8336-8340
- Leimeister-Wachter M, Domann E, Chakraborty T. 1991. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. 5(2):361-6
- Lengeler, J. W., Jahreis, K. & Wehmeier, U. F. 1994. Enzymes II of the phospho enol pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. Biochim Biophys Acta 1188,1-28
- Lengeler, J. & Jahreis, K. 1996. Phosphotransferase systems pr PTSs as carbohydrate transport and as signal transduction systems. In *Handbook of Biological Physics*, pp. 573-598. Edited by W. Konings, H. Kaback & J. Lolkema.
- Lindner, C., Galinier, A., Hecker, M. & Deutscher, J. 1999. Regulation of the activity of the *Bacillus subtilis* antiterminator LicT by multiple PEP-dependent, enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation. MolMicrobiol 31, 995-1006
- Lindner, C., Hecker, M., Le Coq, D., Deutscher, J. 2002. *Bacillus subtilis* mutant LicT antiterminators exhibiting enzyme I- and HPr-independent antitermination affect catabolite repression of the *bgIPH* operon. J Bacteriol 184:4819-4828
- Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, Chakraborty T. 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. Infect Immun. 63(10):3896-903.
- Lopez JM, Thoms B. 1977. Role of sugar uptake and metabolic intermediates on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 129(1):217-24

- Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H.-M., Merzbacher, M., Stülke, J. 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
- Luesink, E. J., van Herpen, R. E., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. 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
- Luesink EJ, Beumer CM, Kuipers OP, De Vos WM. 1999. Molecular characterization of the *Lactococcus lactis ptsHI* operon and analysis of the regulatory role of HPr. *J Bacteriol.* 181(3):764-71
- Luo Q, Rauch M, Marr AK, Muller-Altrock S, Goebel W. 2004. *In vitro* transcription of the *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlC* and *mpl* reveals overlapping PrfA-dependent and -independent promoters that are differentially activated by GTP. *Mol Microbiol.* 52(1):39-52
- Lux R, Jahreis K, Bettenbrock K, Parkinson JS, Lengeler JW. 1995. Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(25):11583-7
- Mahr, K., Hillen, W. & Titgemeyer, F. 2000. Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl Environ Microbiol* 66:277-283
- Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. 1999. Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell.* 4(6):1063-72
- Marr AK, Joseph B, Mertins S, Ecke R, Muller-Altrock S, Goebel W. 2006. Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J Bacteriol.* 188(11):3887-901
- Marquez, J. A., Hasenbein, S., Koch, B., Fieulaine, S., Nessler, S., Russell, R. B., Hengstenberg, W. & Scheffzek, K. 2002. Structure of the full-length HPr kinase/phosphatase from *Staphylococcus xylosus* at 1.95 Å resolution: Mimicking the product/substrate of the phospho transfer reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3458-3463

- Marquis H, Doshi V, Portnoy DA. 1995. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun.* 63(11):4531-4
- Martin, I., Débarbouillé, M., Klier, A., Rapoport, G. 1989. Induction and metabolite regulation of levanase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 171:1885-1892
- Martin-Verstraete, I., Stülke, J., Klier, A. & Rapoport, G. 1995. Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis levanase* operon. *J Bacteriol* 177:6919-6927
- Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Stülke, J., Galinier, A., Erni, B., Rapoport, G., Deutscher, J. 1998. Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR. *Mol Microbiol* 28:293-303
- Martin-Verstraete, I., Galinier, A., Darbon, E., Quentin, Y., Charrier, V., Kilhoffer, M.-C., Haiech, J., Rapoport, G., Deutscher, J. 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
- McClure, P.J., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 14 : 77-91
- McLauchlin J, Audurier A, Frommelt A, Gerner-Smidt P, Jacquet C, Loessner MJ, van der Mee-Marquet N, Rocourt J, Shah S, Wilhelms D. 1996. Who study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. *Int J Food Microbiol.* 32(3):289-99
- Meadow ND, Fox DK, Roseman S. 1990. The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annu Rev Biochem.* 59:497-542. Review
- Mengaud, J., Braun-Breton, C., and Cossart, P. 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol* 5: 367-372
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.A., Milon, G., and Cossart, P. 1991. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* 5: 2273-2283

- Mengaud J, Geoffroy C, Cossart P. 1991. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect Immun.* 59(3):1043-9
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-932
- Mijakovic, I., Poncet, S., Galinier, A., Monedero, V., Fieulaine, S., Janin, J., Nessler, S., Marquez, J.A., Scheffzek, K., Hasenbein, S., Hengstenberg, W., Deutscher, J. 2002. Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13442-13447
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., Youngman, P. 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 23:1075-1085
- Milenbachs Lukowiak, A., Mueller, K.J., Freitag, N.E., Youngman, P. 2004. Deregulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology* 150:321-333
- Miller RA, Britigan BE. 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 10(1):1-18
- Milohanic E, Jonquieres R, Cossart P, Berche P, Gaillard JL. 2001. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells *via* its cell wall anchor. *Mol Microbiol* 39(5):1212-24
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* 47: 1613-1625
- Misset O, Brouwer M, Robillard GT. 1980. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Evidence that the dimer is the active form of enzyme I. *Biochemistry.* 19(5):883-90
- Miwa, Y., Saikawa, M. & Fujita, Y. 1994. Possible function and some properties of the CcpA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140 (Pt 10):2567-2575

- Miwa, Y., Nagura, K., Eguchi, S., Fukuda, H., Deutscher, J. & Fujita, Y. 1997. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol Microbiol* 23:1203-1213
- Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M. & Fujita, Y. 2000. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 28:1206-1210
- Miwa, Y. & Fujita, Y. 2001. Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*iol*) operon. *J Bacteriol* 183:5877-5884
- Monedero, V., Gosalbes, M. J. & Perez-Martinez, G. 1997. Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J Bacteriol* 179:6657-6664
- Monedero, V., Kuipers, O.P., Jamet, E., Deutscher, J. 2001. Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 183:3391-3398
- Monedero, V., Poncet, S., Mijakovic, I., Fieulaine, S., Dossonnet, V., Martin-Verstraete, I., Nessler, S., Deutscher, J. 2001. Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *EMBO J* 20:3928-3937
- Monod, J. 1942. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Paris: Hermann et Cie
- Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. & Saier, M. H., 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
- Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T. 1999. Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* 13(6):655-65
- Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. 1999. Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol.* 181(2):401-10
- Mueller KJ, Freitag NE. 2005. Pleiotropic enhancement of bacterial pathogenesis resulting from the constitutive activation of the *Listeria monocytogenes* regulatory factor PrfA. *Infect Immun.* 73(4):1917-26

- Murray EGD, Webb SA and Swann MBR. 1926. A disease in rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed organism: *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). J Pathol Bacteriol 29 : 407–439
- Nadon CA, Bowen BM, Wiedmann M, Boor KJ. 2002. Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 70(7):3948-5.
- Nair S, Frehel C, Nguyen L, Escuyer V, Berche P. 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. 31(1):185-96
- Nair S, Milohanac E, Berche P. 2000. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 68(12):7061-8
- Nam, T.W., Cho, S.H., Shin, D., Kim, J.H., Jeong, J.Y., Lee, J.H., Roe, J.H., Peterkofsky, A., Kang, S.O., Ryu, S., Seok, Y.J. 2001. The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. EMBO J 20:491-498
- Napper S, Anderson JW, Georges F, Quail JW, Delbaere LT, Waygood EB. 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(35):11260-7
- Nelson SO, Wright JK, Postma PW. 1983. The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. EMBO J. 2(5):715-720
- Nelson KE, Fouts DE, Mongodin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, Rasko DA, Angiuoli SV, Gill SR, Paulsen IT, Peterson J, White O, Nelson WC, Nierman W, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Haft DH, Selengut J, Van Aken S, Khouri H, Fedorova N, Forberger H, Tran B, Kathariou S, Wonderling LD, Uhlich GA, Bayles DO, Luchansky JB, Fraser CM. 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. Nucleic Acids Res. 32(8):2386-95
- Neves, A. R., Ramos, A., Nunes, M. C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., de Vos, W. M., Almeida, J. & Santos, H. 1999. *In vivo* nuclear magnetic resonance studies of glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis*. Biotechnol Bioeng 64: 200-212

- Nicholson, W. L. & Chambliss, G. H. 1985. Isolation and characterization of a *cis*-acting mutation conferring catabolite repression resistance to alpha-amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 161: 875-881
- Nicholson, W. L. & Chambliss, G. H. 1986. Molecular cloning of *cis*-acting regulatory alleles of the *Bacillus subtilis amyR* region by using gene conversion transformation. *J Bacteriol* 165: 663-670
- Nicholson, W. L., Park, Y. K., Henkin, T. M., Won, M., Weickert, M. J., Gaskell, J. A. & Chambliss, G. H. 1987. Catabolite repression-resistant mutations of the *Bacillus subtilis* alpha-amylase promoter affect transcription levels and are in an operator-like sequence. *J Mol Biol* 198: 609-618
- Niebuhr K, Chakraborty T, Rohde M, Gazlig T, Jansen B, Kollner P, Wehland J. 1993. Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets". *Infect Immun.* 61(7):2793-802
- Nguyen, C. C. & Saier, M. H., Jr. 1995. Phylogenetic analysis of the putative phosphorylation domain in the pyruvate kinase of *Bacillus stearothermophilus*. *Res Microbiol.* 146 : 713-9
- Padan E, Patel L, Kaback HR. 1979. Effect of diethylpyrocarbonate on lactose/proton symport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(12):6221-5
- Pandiripally VK, Westbrook DG, Sunki GR, Bhunia AK. 1999. Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. *J Med Microbiol.* 48(2):117-24
- Parche S, Schmid R, Titgemeyer F. 1999. The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur J Biochem.* 265(1):308-17
- Park, S.F., Stewart, G.S., and Kroll, R.G. 1992. The use of bacterial luciferase for monitoring the environmental regulation of expression of genes encoding virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Gen Microbiol* 138: 2619-2627
- Park S.F., Kroll RG. 1993 Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol- specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 8(4):653-61

- Park JH, Lee YS, Lim YK, Kwon SH, Lee CU, Yoon BS. 2000. Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 186(1):35-40
- Parkinson J.S. 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell.* 73 : 857-871
- Paulsen, I. T., Nguyen, L., Sliwinski, M. K., Rabus, R. & Saier, M. H., Jr. 2000. Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J Mol Biol* 301: 75-100
- Pearson, L.J., and Marth, E.H. 1990. *Listeria monocytogenes*--threat to a safe food supply: a review. *J Dairy Sci* 73: 912-928
- Pilgrim S, Stritzker J, Schoen C, Kolb-Maurer A, Geginat G, Loessner MJ, Gentschev I, Goebel W. 2003 .Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther* 10(24):2036-45
- Pilgrim S, Kolb-Maurer A, Gentschev I, Goebel W, Kuhn M. 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect Immun* 71(6):3473-84
- Pizarro-Cerda, J., Sousa, S., and Cossart, P. 2004. Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. *C R Biol* 327: 523-531
- Plumbridge J. 1999. Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 33(2):260-73
- Poolman B, Royer TJ, Mainzer SE, Schmidt BF. 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(1):244-53
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., and Hinrichs, D.J. (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 167: 1459-1471
- Powell BS, Court DL, Inada T, Nakamura Y, Michotey V, Cui X, Reizer A, Saier MH Jr, Reizer J. 1995. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. *J Biol Chem.* 270(9):4822-39
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57:543-594

- Premaratne RJ, Lin WJ, Johnson EA. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 57(10):3046-8
- Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P., Martin-Verstraete, I. 1999. Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 181:6889-6897
- Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Sarnacki S, Monnet JP, Berche P, Gaillard JL. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. Infect Immun. 66(2):747-55
- Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Berche P, Milon G, Geissmann F, Gaillard JL. 2001. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. Cell Microbiol. 3(5):331-40.
- Pullen K, Rajagopal P, Branchini BR, Huffine ME, Reizer J, Saier MH Jr, Scholtz JM, Klevit RE. 1995. Phosphorylation of serine-46 in HPr, a key regulatory protein in bacteria, results in stabilization of its solution structure. Protein Sci. 4(12):2478-86
- Racz, P., Tenner, K., Mero, E. 1972. Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. Lab Invest 26 : 694-700
- Rajagopal P, Waygood EB, Klevit RE. 1994. Structural consequences of histidine phosphorylation: NMR characterization of the phosphohistidine form of histidine-containing protein from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Biochemistry. 33(51):15271-82
- Raveneau J, Geoffroy C, Beretti JL, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P. 1992. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. Infect Immun. 60(3):916-21
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. Nature. 416(6878):291-7
- Reglier-Poupet H, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Berche P, Charbit A, Raynaud C. 2003. Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. J Biol Chem. 278(49):49469-77

- Reglier-Poupet H, Pellegrini E, Charbit A, Berche P. 2003. Identification of LpeA, a PsaA-like membrane protein that promotes cell entry by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 71(1):474-82
- Reizer, J. & Panos, C. 1980. Regulation of beta-galactoside phosphate accumulation in *Streptococcus pyogenes* by an expulsion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5497-5501
- Reizer J., and Peterkofsky A. 1987. Sugar transport and metabolism in gram positive bacteria
- Reizer, J., Sutrina, S.L., Wu, L.-F., Deutscher, J., Reddy, P., Saier Jr, M.H. 1992. Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267:9158-9169
- Reizer, J., Hoischen, C., Reizer, A., Pham, T. N. & Saier, M. H., Jr. 1993. Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and HPr of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Protein Sci* 2, 506-521
- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stulke, J., Karamata, D., Saier, M. H., Jr. & Hillen, W. 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* 27, 1157-1169
- Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier Jr, M. H. & Stülke, J. 1999. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145, 3419-3429
- Renna, M. C., Najimudin, N., Winik, L. R. & Zahler, S. A. 1993. Regulation of the *Bacillus subtilis alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* 175: 3863-3875.
- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. 1997. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* 65: 1515-1518
- Renzoni A, Cossart P, Dramsi S. 1999. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Mol Microbiol*. 34(3):552-61

- Ripio, M.T., Brehm, K., Lara, M., Suarez, M., and Vazquez-Boland, J.A. 1997a. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* 179: 7174-7180
- Ripio MT, Dominguez-Bernal G, Lara M, Suarez M, Vazquez-Boland JA. 1997b. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 179(5):1533-40
- Rocourt, J., and Seeliger, H.P. 1985. Distribution of species of the genus *Listeria*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 259 : 317-330
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., and Piffaretti, J.C. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* 42:171-174
- Rocourt, J. and Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. In : food microbiology-fundamentals and frontiers (M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville, eds). ASM Press.: 337-352
- Roossien, F. F., Brink, J. & Robillard, G. T. 1983. A simple procedure for the synthesis of [32P]phosphoenolpyruvate *via* the pyruvate kinase exchange reaction at equilibrium. *Biochim Biophys Acta* 760:185-7
- Rouquette C, Ripio MT, Pellegrini E, Bolla JM, Tascon RI, Vazquez-Boland JA, Berche P. 1996. Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 21(5):977-87
- Rouquette C, de Chastellier C, Nair S, Berche P. 1998. The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol.* 27(6):1235-45
- Ryser E.T., and Marth E.H. 1991. Occurrence and survival of *Listeria monocytogenes* in natural environments. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ryser E.T., (ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 22-33
- Ryu, S., Ramseier, T., Michotey, V., Saier Jr, M. H., Garges, S. 1995. Effects of the FruR regulator on transcription of the *pts* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270:2489-2486

- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., and Bierne, H. 2005. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun* 73: 6912-6922
- Saier MH Jr, Reizer J. 1992. Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol.* 174(5):1433-8
- Saier Jr, M. H., Chauvaux, S., Deutscher, J., Reizer, J. & Ye, J. J. 1995. Protein phosphorylation and regulation of carbon metabolism in gram-negative versus gram-positive bacteria. *Trends Biochem Sci* 20, 267-71
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schumacher, M.A., Allen, G.S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., Brennan, R.G. 2004. Structural basis for allosteric control of the transcription regulator *CcpA* by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118:731-741
- Schubert WD, Gobel G, Diepholz M, Darji A, Kloer D, Hain T, Chakraborty T, Wehland J, Domann E, Heinz DW. 2001. Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J Mol Biol.* 28; 312(4):783-94
- Scotti M, Lacharme-Lora L, Wagner M, Chico-Calero I, Losito P, Vazquez-Boland JA. 2006. Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial *in vitro-in vivo* paradox. *Nat Med.* 12(5):515-7
- Seeliger, H., and Jones, D. 1986. Genus *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath, M., Sarpe and Holt (eds), pp. 1235-1245
- Seok, Y. J., Zhu, P. P., Koo, B. M. & Peterkofsky, A. 1998. Autophosphorylation of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system requires dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 250:381-384
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Ebricht, R., and Cossart, P. 1996. A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* 20: 785-797
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., Cossart, P. 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J Bacteriol* 177:6469-6476

- Shetron-Rama LM, Mueller K, Bravo JM, Bouwer HG, Way SS, Freitag NE. 2003. Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level *in vitro* expression of host cytosol-induced gene products. *Mol Microbiol.* 48(6):1537-51
- Shin, B. S., Choi, S. K. & Park, S. H. 1999. Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene. *J Biochem (Tokyo)* 126: 333-339
- Simpson, C. L. & Russell, R. R. 1998. Identification of a homolog of CcpA catabolite repressor protein in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 66:2085-2092
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. 1980 Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30 : 229-420
- Sleator RD, Hill C. 2005. A novel role for the LisRK two-component regulatory system in *Listeria* osmotolerance. *Clin Microbiol Infect.* 11(8):599-601.
- Sleator RD, Wemekamp-Kamphuis HH, Gahan CG, Abee T, Hill C. 2005. A PrfA-regulated bile exclusion system (BileE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 55(4):1183-95
- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun.* 63(11):4231-7
- Sousa, S., Cabanes, D., El-Amraoui, A., Petit, C., Lecuit, M., Cossart, P. 2004. Unconventional myosin VIIa and vezatin, two proteins crucial for *Listeria* entry into epithelial cells *Journal of Cell Science.* 117, 2121-2130
- Sousa, S., Cabanes, D., Colland, F., Lecuit, M., Legrain, P., Cossart, P. 2005. ARHGAP10, a new partner of μ -catenin involved in its recruitment at adherens junctions and in entry of *Listeria* into mammalian cells. *Nat. Cell Biol*
- Spiro, S., and Guest, J.R. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 6: 399-428
- Steinmetz, M., Richter, R. 1994. Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through *in vivo* recombination. *Gene* 142:79-83
- Stentz R., Lauret R., Ehrlich S. D., Morel-Deville F., Zagorec M. 1997. Molecular cloning and analysis of the *ptsHI* operon in *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2111-2116

- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 38(5):428-32
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Klier, A. & Rapoport, G. (1997). Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol. Microbiol.* 25, 65-78
- Stülke, J., Arnaud, M., Rapoport, G., Martin-Verstraete, I. 1998. PRD - a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol Microbiol* 28:865-874.
- Stülke, J. & Hillen, W. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2:195-201
- Stülke, J. & Hillen, W. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54: 849-880
- Swanson JA, Baer SC. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5(3):89-93
- Tanaka Y, Kimata K, Inada T, Tagami H, Aiba H. 1999. Negative regulation of the *pts* operon by Mlc: mechanism underlying glucose induction in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* 4(7):391-9
- Tanaka, Y., Kimata, K., Aiba, H. 2000. A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J* 19:5344-5352
- Tang P, Rosenshine I, Cossart P, Finlay BB. 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect Immun.* 64(6):2359-61
- Taylor CM, Beresford M, Epton HA, Sigee DC, Shama G, Andrew PW, Roberts IS. 2002. *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J Bacteriol.* 184(3):621-8
- Tchieu JH, Norris V, Edwards JS, Saier MH Jr. 2001. The complete phosphotranferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3(3):329-46. Review
- Thompson, J. & Saier, M. H., Jr. 1981. Regulation of methyl-beta-d-thiogalactopyranoside-6-phosphate accumulation in *Streptococcus lactis* by exclusion and expulsion mechanisms. *J Bacteriol* 146, 885-894

- Tilney LG, Portnoy DA. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 109(4 Pt 1):1597-608
- Tobisch, S., Stulke, J. & Hecker, M. 1999a. Regulation of the *lic* operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* 181, 4995-5003
- Tobisch, S., Zuhlke, D., Bernhardt, J., Stulke, J. & Hecker, M. 1999b. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 6996-7004
- Tortosa, P., Aymerich, S., Lindner, C., Saier, M. H., Jr., Reizer, J. & Le Coq, D. 1997. Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Biol Chem* 272, 17230-17237
- Tortosa, P., Declerck, N., Dutartre, H., Lindner, C., Deutscher, J., Le Coq, D. 2001. Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY. *Mol Microbiol* 41:1381-1393
- Turinsky, A. J., Grundy, F. J., Kim, J. H., Chambliss, G. H. & Henkin, T. M. 1998. Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J Bacteriol* 180, 5961-5967
- Vadeboncoeur, C., Frenette, M. & Lortie, L. A. 2000. Regulation of the *pts* operon in low G+C Gram-positive bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 483-90
- van Nuland NA, Grotzinger J, Dijkstra K, Scheek RM, Robillard GT. 1992. Determination of the three-dimensional solution structure of the histidine-containing phosphocarrier protein HPr from *Escherichia coli* using multidimensional NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.* 210(3):881-91
- van Nuland NA, Hangyi IW, van Schaik RC, Berendsen HJ, van Gunsteren WF, Scheek RM, Robillard GT. 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(5):544-59

- van Schaik, W., and Abee, T. 2005. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol* 16: 218-224
- Vasquez-Boland, J.-A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J. & Cossart, P. 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 60, 219–230
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. 2001. *Listeria*
- Vega Y, Dickneite C, Ripio MT, Bockmann R, Gonzalez-Zorn B, Novella S, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Vazquez-Boland JA. 1998. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J Bacteriol.* 180(24):6655-60
- Vega Y, Rauch M, Banfield MJ, Ermolaeva S, Scotti M, Goebel W, Vazquez-Boland JA. 2004. New *Listeria monocytogenes prfA** mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol.* 52(6):1553-65
- Veiga E, Cossart P. 2005. Ubiquitination of intracellular bacteria: a new bacteria-sensing system? *Trends Cell Biol.* 15(1):2-5. Review
- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Perez-Martinez, G. & Deutscher, J. 2000. Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol* 36, 570-84
- Wampler JL, Kim KP, Jaradat Z, Bhunia AK. 2004. Heat shock protein 60 acts as a receptor for the *Listeria* adhesion protein in Caco-2 cells. *Infect Immun.* 72(2):931-6
- Waygood EB. 1980. Resolution of the phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase system of *Escherichia coli* into two components: enzyme I/fructose and fructose-induced HPr-like protein (FPr). *Can J Biochem.* 58(10):1144-6
- Waygood EB. 1998. The structure and function of HPr. *Biochem Cell Biol.* 76(2-3):359-67. Review

- Weickert, M. J. & Chambliss, G. H. 1990. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6238-6242
- Weickert, M. J. & Adhya, S. 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressor. J. Biol. Chem. 267, 15869-15874.
- Weigel N, Kukuruzinska MA, Nakazawa A, Waygood EB, Roseman S. 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem. 257(23):14477-91
- Welch M.D., Iwamatsu A. and Mitchison T.J. 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. Nature 385 : 265–269.
- Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, Sleator RD, Gahan CG, Hill C, Abee T. 2002. Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. Appl Environ Microbiol. 68(10):4710-6
- West SE, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. J Bacteriol. 176(24):7532-42
- Wittekind, M., Reizer, J. & Klevit, R. E. 1990. Sequence-specific ¹H NMR resonance assignments of *Bacillus subtilis* HPr: use of spectra obtained from mutants to resolve spectral overlap. Biochemistry 29:7191-7200
- Wittekind, M., Rajagopal, P., Branchini, B. R., Reizer, J., Saier, M. H., Jr. & Klevit, R. E. 1992. Solution structure of the phosphocarrier protein HPr from *Bacillus subtilis* by two-dimensional NMR spectroscopy. Protein Sci 1:1363-1376
- Wong KK, Freitag NE. 2004. A novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products. J Bacteriol. 186(18):6265-76
- Wray, L. V., Jr., Pettengill, F. K. & Fisher, S. H. 1994. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis hut* operon requires a cis-acting site located downstream of the transcription initiation site. J Bacteriol 176 :1894-1902
- Wu LF, Tomich JM, Saier MH 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(4):687-703
- Wuenschel MD, Kohler S, Bubert A, Gerike U, Goebel W. 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. J Bacteriol. 175(11):3491-501
- Ye, J.-J., Neal, J.W., Cui, X., Reizer, J., Saier Jr, M.H. 1994. Regulation of the glucose:H⁺ symporter by metabolite-activated ATP-dependent phosphorylation of HPr in *Lactobacillus brevis*. J Bacteriol 176:3484-3492
- Ye, J. J. & Saier, M. H., Jr. 1995a. Cooperative binding of lactose and the phosphorylated phosphocarrier protein HPr(Ser-P) to the lactose/H⁺ symport permease of *Lactobacillus brevis*. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 417-421
- Ye, J. J. & Saier, M. H., Jr. 1995b. Allosteric regulation of the glucose:H⁺ symporter of *Lactobacillus brevis*: cooperative binding of glucose and HPr(ser-P). J Bacteriol 177, 1900-1902
- Yoshikawa H, Kawamura I, Fujita M, Tsukada H, Arakawa M, Mitsuyama M. 1993. Membrane damage and interleukin-1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O. Infect Immun. 61(4):1334-9
- Youngman, P. 1987. Plasmid vectors for recovering and exploiting Tn917 transpositions in *Bacillus* and other gram-positive bacteria, In K. Hardy (ed.), Plasmids: a practical approach. p. 79-103
- Yuan, M., Deleuil, F., Fällman, M. 2005. Interaction between the *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH and its macrophage substrate Fyn binding protein, FYB. J Mol Biol Biotechnol.
- Zagorec M, Postma PW. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*. Mol Gen Genet. 234(2):325-8
- Zalieckas, J. M., Wray, L. V., Jr. & Fisher, S. H. 1998a. Expression of the *Bacillus subtilis* *acsA* gene: position and sequence context affect *cre*-mediated carbon catabolite repression. J Bacteriol 180:6649-6654.
- Zalieckas, J. M., Wray, L. V., Jr., Ferson, A. E. & Fisher, S. H. 1998b. Transcription-repair coupling factoris involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *hut* and *gnt* operons. Mol Microbiol 27:1031-1038

- Zhu, P. P., Reizer, J., Reizer, A. & Peterkofsky, A. 1993. Unique monocistronic operon (*ptsH*) in *Mycoplasma capricolum* encoding the phosphocarrier protein, HPr, of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. Cloning, sequencing, and characterization of *ptsH*. J Biol Chem 268: 26531-40
- Zhu, P. P., Reizer, J. & Peterkofsky, A. 1994. Unique dicistronic operon (*ptsI-crr*) in *Mycoplasma capricolum* encoding enzyme I and the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: cloning, sequencing, promoter analysis, and protein characterization. Protein Sci 3, 2115-28
- Zhu PP, Lecchi P, Pannell L, Jaffe H, Peterkofsky A. 1995. Overproduction and purification of the *Mycoplasma capricolum* phosphocarrier protein, HPr, of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. Protein Expr Purif. 6(2):189-95

Abstract

The activity of the *Listeria monocytogenes* transcription activator PrfA, which is required for the expression of several virulence genes, including the hemolysin-encoding *hly*, is inhibited by the presence of glucose, fructose and other rapidly metabolizable carbon sources. This inhibition is not mediated via the main carbon catabolite repression mechanism operative in Gram-positive bacteria, since inactivation of the catabolite control protein A (CcpA) did not prevent repression of virulence genes by the above sugars. We used a *Bacillus subtilis* strain (BUG1199) containing the *prfA* gene under control of an IPTG-inducible promoter and the *lacZ* reporter gene fused to the PrfA-activated *L. monocytogenes hly* promoter to test whether the catabolite co-repressor P-Ser-HPr might be involved in PrfA regulation. Indeed, accumulation of P-Ser-HPr in an *hprK* mutant (*hprKV267F*) producing HPr kinase/phosphorylase (HPrK/P) with normal kinase, but almost no phosphorylase activity strongly inhibited transcription activation by PrfA even in the absence of a repressing sugar. In response to the concentration of certain metabolites, the bifunctional HPrK/P either phosphorylates HPr at Ser-46 (kinase function) or dephosphorylates P-Ser-HPr (phosphorylase function). Preventing the formation of P-Ser-HPr in the *hprKV267F* mutant by replacing Ser-46 in HPr with an alanine restored PrfA activity. In contrast, inactivation of *crh*, which encodes a HPr homologue that also becomes phosphorylated at Ser-46, did not enhance PrfA activity. PrfA in the *hprKV267F* mutant also remained inactive when the *ccpA* gene was mutated. In fact, disruption of *ccpA* in the *hprK* wild-type strain BUG1199 also led to the inactivation of PrfA, which is in agreement with previous findings that *ccpA* mutants contain large amounts of P-Ser-HPr similar to the *hprKV267F* mutant. It therefore seems that elevated concentrations of P-Ser-HPr due either to growth on rapidly metabolisable carbon sources or to specific mutations directly or indirectly inhibit PrfA activity. To carry out its catalytic function in sugar transport, HPr of the phosphotransferase system (PTS) is also phosphorylated by phosphoenolpyruvate and enzyme I at His-15. However, P-Ser-HPr is only very slowly phosphorylated by enzyme I, which probably accounts for PrfA inhibition. In agreement with this concept, disruption of the enzyme I- or HPr-encoding genes also strongly inhibited PrfA activity. PrfA activity therefore seems to depend on a fully functional PTS phosphorylation cascade.

Résumé

L'activité de PrfA, régulateur transcriptionnel de nombreux gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*, dont *hly*, est inhibée par des sucres rapidement métabolisés comme le glucose et le fructose. Cette inhibition ne suit pas le mécanisme général de répression catabolique des firmicutes, car l'inactivation de *ccpA* (catabolite control protein A) ne lève pas la répression de l'expression des gènes de virulence exercée par le glucose ou le fructose. Dans le but de tester si le co-répresseur P-Ser-HPr serait impliqué dans la régulation de l'activité de PrfA, nous avons utilisé la souche BUG1199 de *B. subtilis*, qui contient intégrés à son génome, *prfA* sous contrôle du promoteur *pspac* qui est inductible à l'IPTG, et la fusion *hly-lacZ*. La formation de la P-Ser-HPr requiert l'intervention d'une enzyme bifonctionnelle l'HPr kinase/phosphorylase (HPrK/P), qui en fonction de la concentration de certains métabolites, soit phosphoryle HPr sur sa Ser-46, soit déphosphoryle la P-Ser-HPr. L'allèle *hprKV267F* codant pour une HPrK/P qui a conservé une activité kinase normale mais ne possédant quasiment plus d'activité phosphorylase, favorise l'accumulation de la P-Ser-HPr dans la cellule. L'introduction de la mutation *hprKV267F* dans BUG1199 inhibe fortement l'activité de PrfA. La substitution dans HPr de la Ser-46 par une alanine empêche la formation de la P-Ser-HPr et restaure l'activité de PrfA, alors que l'inactivation de CcpA n'a aucun effet. Cependant l'interruption de *ccpA* dans BUG1199 à *hprK* sauvage, inhibe l'activité de PrfA. Cette répression de l'activité de PrfA dans le mutant $\Delta ccpA$ est probablement due aussi à l'accumulation de P-Ser-HPr dans la cellule, car elle est levée lorsque la Ser-46 dans HPr est remplacée par une alanine. Outre sa phosphorylation sur la Ser-46, HPr est également phosphorylée sur son His-15 par l'enzyme I (EI) via la cascade de phosphorylation PEP-dépendante du PTS (Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphoTransferase System). Cependant la P-Ser-HPr est un mauvais substrat pour l'EI, ce qui favorise probablement l'inhibition de PrfA. En effet, l'interruption des gènes codant pour HPr et/ou EI, inhibe également l'activité de PrfA. Ainsi pour être active, PrfA a besoin d'un PTS fonctionnel.