



HAL
open science

Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*

Laurent Hébert

► **To cite this version:**

Laurent Hébert. Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Caen, 2008. Français. NNT : . tel-00787051

HAL Id: tel-00787051

<https://theses.hal.science/tel-00787051>

Submitted on 11 Feb 2013

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.



UNIVERSITE DE CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : INSTITUT DE BIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE (I.B.F.A.)
ECOLE DOCTORALE NORMANDE CHIMIE-BIOLOGIE



THESE

présentée par

M. Laurent HEBERT

et soutenue

le 13 Mars 2008

en vue de l'obtention du

DOCTORAT de L'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

(Arrêté du 7 Août 2006)

Titre : Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*

MEMBRES du JURY

M. Saulius KULAKAUSKAS	Chargé de Recherche INRA, Jouy-en-Josas	<i>Rapporteur</i>
M. Philippe LANGELLA	Directeur de Recherche INRA, Jouy-en-Josas	<i>Rapporteur</i>
M. Carlos BLANCO	Professeur, Université de Rennes	<i>Examineur</i>
Mme Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER	Chargée de Recherche INRA, Jouy-en-Josas	<i>Examineur</i>
M. Yanick AUFRAY	Professeur, Université de Caen	<i>Directeur de thèse</i>
M. Abdellah BENACHOUR	Maître de Conférences, Université de Caen	<i>Co-Directeur de thèse</i>



UNIVERSITE DE CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R. : INSTITUT DE BIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE (I.B.F.A.)
ECOLE DOCTORALE NORMANDE CHIMIE-BIOLOGIE



THESE

présentée par

M. Laurent HEBERT

et soutenue

le 13 Mars 2008

en vue de l'obtention du

DOCTORAT de L'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

(Arrêté du 7 Août 2006)

Titre : Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*

MEMBRES du JURY

M. Saulius KULAKAUSKAS	Chargé de Recherche INRA, Jouy-en-Josas	<i>Rapporteur</i>
M. Philippe LANGELLA	Directeur de Recherche INRA, Jouy-en-Josas	<i>Rapporteur</i>
M. Carlos BLANCO	Professeur, Université de Rennes	<i>Examineur</i>
Mme Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER	Chargée de Recherche INRA, Jouy-en-Josas	<i>Examineur</i>
M. Yanick AUFRAY	Professeur, Université de Caen	<i>Directeur de thèse</i>
M. Abdellah BENACHOUR	Maître de Conférences, Université de Caen	<i>Co-Directeur de thèse</i>

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon Directeur de thèse, Monsieur Yanick Auffray, pour m'avoir accueilli dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement de l'Université de Caen. Je vous remercie de la confiance et de la liberté que vous m'avez accordées ainsi que pour les conseils avisés que vous m'avez prodigués.

Je remercie tout particulièrement mon co-directeur de thèse et encadrant, Abdellah Benachour. Merci pour ta patience et ta disponibilité ; ton aide, tout au long de cette thèse, m'a été particulièrement précieuse.

Je remercie Saulius Kulakauskas, Chargé de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas et Philippe Langella, Directeur de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. J'exprime également tous mes remerciements à Carlos Blanco, Professeur de l'Université de Rennes et à Marie-Pierre Chapot-Chartier, Chargée de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier la région Basse-Normandie et l'INRA pour avoir co-financé ce travail de thèse.

L'analyse de la structure du peptidoglycane a été effectuée à l'Unité de Biochimie Bactérienne de l'INRA de Jouy-en-Josas, dirigée par Véronique Monnet. Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire pour leur accueil et particulièrement Marie-Pierre Chapot-Chartier et Pascal Courtin pour leur savoir-faire et leur gentillesse.

Je remercie aussi les membres de l'équipe de Maurizio Sanguinetti de l'Université de Rome, ceux de l'équipe de Pascale Serror à l'INRA de Jouy-en-Josas pour leur contribution à ce travail.

Je remercie Stéphanie Gente et Jean-Marie Laplace pour m'avoir permis de passer "de l'autre côté de la barrière" lors des vacances que j'ai effectuées au sein de l'IUT Génie Biologique de Caen.

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, pour leur gentillesse, leur sympathie et leur bonne humeur. Merci à tout le personnel technique, Isabelle Biauou, Annick Blandin, Béatrice Gillot, Evelyne Marchand et Marie-Jeanne Pigny, sans qui le travail serait beaucoup plus laborieux.

Je profite de ces remerciements pour adresser une pensée particulière à la famille de Marie-Cécile Dubourg.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe enseignante du LME pour la qualité des enseignements délivrés durant ma Licence et ma Maîtrise. L'ensemble des connaissances que vous nous avez transmises m'a vraiment permis de "trouver ma voie" et de faire naître mon affection pour la Microbiologie et la Biologie Moléculaire. De plus, merci pour votre disponibilité au quotidien.

Je remercie bien évidemment tous les étudiants et post-doc que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant toute cette période, Alain B., Anaïs, Aurélie B.V., Aurélie H., Cécile, Chen, Damien G., Johan, Linda, Nico S., Nico V, Sébastien, Sophie, Stéphanie, Xue, Yin-Yin. Merci à tous pour la bonne humeur qui règne dans le laboratoire.

Merci en particulier à Thierry pour m'avoir légué son travail sur le sécrétome et les protéines de surface ainsi que son bureau tant convoité.

Je tiens spécialement à souhaiter bon courage aux prochaines sur la liste des docteurs c'est à dire Eliette, chez les "microbes" (tu continueras quand même à m'approvisionner en points Bon Mayennais ?) et Tiphaine, chez les "végétaux" (promis, pas fais exprès de finir avant toi !).

Merci aux stagiaires qui m'ont apporté leur aide pendant cette thèse. Fany, même si notre collaboration fut brève, ta sympathie et ta gentillesse furent un plaisir. François, merci pour ta bonne humeur et ton amitié, j'espère avoir réussi à te transmettre une partie de mes connaissances et de ma passion et surtout n'oublie pas cet adage : "Laurent rime avec prévoyant !".

André, mon successeur, le lysozyme coule désormais dans tes veines, je te souhaite bon courage et bonne chance pour la suite de ta thèse, ainsi que pour celle de Karine et te remercie pour le plaisir que j'ai eu à collaborer avec toi.

Merci aux différents relecteurs de dernière minute pour votre disponibilité, votre appui m'a beaucoup aidé.

Je voudrais aussi saluer les membres du Laboratoire de Physiologie Végétale avec qui j'ai eu plaisir à cohabiter. Je remercie particulièrement Christine Gourbe pour son aide dans les démarches administratives auprès de l'INRA et de l'Université.

Pour reprendre un ordre plus chronologique, je voudrais remercier Philippe Gaudu et Alexandra Gruss pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée lors de mes stages de Maîtrise et de DEA. Philippe, mes débuts dans la recherche ont été de grands moments de plaisir et de découverte et je t'en suis très reconnaissant. Je tiens aussi à remercier une deuxième fois Philippe Langella pour le soutien qu'il m'apporte depuis cette période. Je n'oublie pas tous les étudiants rencontrés à Jouy-en-Josas, pour les nombreuses discussions scientifiques et pour toutes les soirées passées ensemble.

A propos des soirées entre amis, je me dois de remercier chaleureusement tous les membres de la "Guiguibande": Arnaud et Lucie J., Benoît et Lucie B., Damien et Céline, Emmanuel et Catherine, Guillaume et Chloé, Nicolas H., Nicolas T... Malgré les années qui passent et les kilomètres qui nous séparent, savoir que je peux toujours compter sur vous Représente (X) énormément pour moi. Rassurez-vous, même si mon travail sur *Enterococcus faecalis* touche à sa fin, j'aurai encore l'occasion de vous faire part de mes diverses réflexions sur les bactéries fécales et sur tous les autres sujets qui vous (... ou plutôt me) passionnent tant.

Merci aussi à DM, Burk et PartyPoker, qui m'auront grandement aidé à me détendre après les journées de manips.

Parmi les personnes qui ont compté durant cette thèse je me dois de remercier tout particulièrement Jérémy avec qui j'ai écumé pendant de nombreuses années les bancs de la fac et qui a eu la bonne idée d'effectuer sa thèse dans le même bâtiment que moi. Les nombreuses heures passées devant un café, une bière, une Embuscade ou un club de golf resteront pour moi de grands moments. Je te remercie, Julie, pour avoir accepté que Jérémy rentre parfois tard le soir et je vous félicite tous les deux pour votre jolie petite Camille, qui je l'espère aura un avenir radieux (et pourquoi pas dans la biologie...).

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de la confrérie du "Saucisson-Bière" pour avoir bien voulu introniser un " 'crobe". Votre compagnie m'aura permis de clôturer de longues semaines dans la joie et la bonne humeur. Dans l'ensemble, j'espère avoir été "digne" de vous et je compte bien sur la nouvelle génération pour prendre le relais.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire ayant participé aux matches de Badminton du jeudi midi. Bien que cela rende les après-midi un peu fatigantes, ces moments de détente furent pour moi un vrai plaisir (sauf pour mon vieux dos).

zzzzzzzzzzzzzzzzzzzzt : Par la force des choses je remercie aussi Ratoune qui vient de marcher sur mon clavier...

Pour revenir sur l'aspect sportif, je tiens à remercier Maurice pour ses cours de golf truculents ainsi que ceux avec qui j'y ai participé, c'est à dire Bertrand, Damien G., Jérémy, Julie (et Christie).

Pour leur soutien et leurs encouragements constants, je remercie toute ma famille, sans qui je n'aurais pas pu effectuer ma thèse dans de si bonnes conditions. Je remercie particulièrement ma Mère et Fabien que je félicite pour leur récent mariage, ainsi que mes Frères et leurs familles.

Last but not least, je te remercie Sandrine pour ta présence à mes cotés et pour tout ce que tu représentes pour moi. Je vais faire bref : Merci pour tout ! (sauf pour m'obliger à tailler la haie et tondre la pelouse !).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
ABREVIATIONS	9
AVANT-PROPOS	10
AVANT-PROPOS	11
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. Principales caractéristiques du genre <i>Enterococcus</i> et de l'espèce <i>faecalis</i>	14
I. 1. Caractères généraux	14
I. 2. Niches écologiques des entérocoques	14
I. 3. Utilisation des entérocoques dans l'alimentation	15
I. 4. Les entérocoques, des bactéries pathogènes opportunistes	16
I. 4. 1. Résistance aux antibiotiques chez les entérocoques	16
I. 4. 2. Mécanismes d'infection <i>in vivo</i>	17
I. 4. 3. Facteurs de virulence chez <i>E. faecalis</i>	18
II. Paroi des bactéries à Gram positif	19
II. 1. Le peptidoglycane (PG)	20
II. 1. 1. Structure du PG	21
II. 1. 2. Biosynthèse du PG	21
II. 1. 3. Cytosquelette et biosynthèse du PG	23
II. 1. 4. Caractérisation d'un périplasme chez les bactéries à Gram positif	24
II. 1. 5. Architecture du PG	25
II. 1. 6. Rôle du PG dans la pathogénèse	25
II. 2. Les acides téichoïques	26
II. 2. 1. Composition des WTA et des LTA	26
II. 2. 2. Synthèse des WTA et des LTA	27
II. 2. 2. a. Synthèse des WTA	27
II. 2. 2. b. Synthèse des LTA	28
II. 2. 3. D-alanylation des TA	29
II. 2. 4. Rôle des TA dans la physiologie bactérienne	30
II. 2. 5. Rôle des TA dans la pathogénicité	30
II. 3. Les protéines de surface bactérienne et les protéines sécrétées	31
II. 3. 1. Voies de sécrétion	31
II. 3. 2. Protéines liées à la membrane	34
II. 3. 2. a. Protéines transmembranaires	34
II. 3. 2. b. Lipoprotéines	34
II. 3. 2. c. Protéines ancrées dans la membrane	34
II. 3. 3. Protéines liées de manière covalentes à la paroi	35
II. 3. 4. Protéines liées de manière non covalente à la paroi	36
II. 3. 4. a. Unités répétées de liaison à la paroi	36
II. 3. 4. b. Protéines du S-layer	37
II. 4. Capsule	37
II. 5. Les enzymes de dégradation du PG	37
II. 5. 1. Rôle et régulation des autolysines	39
II. 5. 2. Sources exogènes d'hydrolases du PG	39
III. Le lysozyme	40
III. 1. Les étapes importantes dans la découverte du lysozyme	40
III. 2. Le lysozyme dans le domaine de la santé publique et l'alimentation	41
III. 3. Propriétés biochimiques du lysozyme	42
III. 4. Découverte de différentes familles de lysozyme	43
III. 5. Mécanisme d'action du lysozyme	44
III. 6. Activité non enzymatique du lysozyme	46
III. 7. Régulation de l'expression du lysozyme	47
III. 8. Mécanismes de résistance contre le lysozyme	48
III. 8. 1. Inhibition de l'action lytique du lysozyme	48

III. 8. 2. Inactivation du lysozyme	50
III. 8. 3. Inhibition de l'action non lytique du lysozyme	51
MATERIELS ET METHODES	53
I. Souches bactériennes, plasmides, oligonucléotides et conditions de culture	54
II. Méthodes d'analyses physiologiques	57
II. 1. Tests de sensibilité au lysozyme	57
II. 2. Criblage d'une banque de mutants aléatoires d' <i>E. faecalis</i> vis-à-vis de la sensibilité au lysozyme	57
II. 3. Survie en macrophages de souris	58
II. 4. Tests d'immobilisation en milieu semi-liquide	58
II. 5. Tests de sensibilité aux antibiotiques	59
III. Méthodes de génétique et de biologie moléculaire	59
III. 1. Extraction des acides nucléiques	59
III. 1. 1. Extraction d'ADN plasmidique	59
III. 1. 2. Extraction d'ADN chromosomique	59
III. 1. 3. Extraction des ARN totaux	60
III. 2. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	60
III. 3. Réaction de PCR Quantitative en temps réel	61
III. 3. 1. PCR quantitative en temps réel à partir de matrices issues de cultures bactériennes	61
III. 3. 2. PCR quantitative en temps réel à partir de matrices issues de bactéries isolées de macrophages	62
III. 4. Digestion par les endonucléases de restriction, déphosphorylations et ligatures	63
III. 5. Séquençage de l'ADN	63
III. 6. Préparation et transformation des cellules électrocompétentes d' <i>E. coli</i> et d' <i>E. faecalis</i>	64
III. 7. Mutagenèse chez <i>E. faecalis</i>	65
III. 7. 1. Mutagenèse dirigée par simple recombinaison homologue	65
III. 7. 2. Mutagenèse dirigée par double recombinaison homologue	65
IV. Méthodes d'analyses physico-chimiques	66
IV. 1. Extraction des protéines totales	66
IV. 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	67
IV. 3. Electrophorèse bidimensionnelle	68
IV. 4. Révélation par coloration au bleu de Coomassie	68
IV. 5. Révélation par coloration au bleu Colloïdal	68
IV. 6. Spectrométrie de masse	69
IV. 7. Microscopie électronique	69
IV. 8. Surproduction et purification de la protéine EF1843 par le système QIAexpress.	70
IV. 9. Analyse de la structure du PG	71
IV. 9. 1. Extraction du PG	71
IV. 9. 2. Digestion du PG par la mutanolysine	72
IV. 9. 3. Réduction des muropeptides	72
IV. 9. 4. Séparation HPLC et analyse MALDI-TOF	72
V. Méthodes d'analyses bioinformatiques	73
RESULTATS ET DISCUSSION	74
Chapitre I : Analyse du sécrétome et des protéines de surface d'<i>E. faecalis</i>	75
I. 1. Contexte de l'étude	75
I. 2. PCR quantitative en temps réel	76
I. 3. Analyse de l'organisation structurale des gènes EF2224, et EF3054	77
I. 4. Analyse physiologique des mutants Δ EF2224 et Δ EF3054	78
I. 5. Conclusion	80
Chapitre II : Recherche par approche ciblée des déterminants génétiques responsables de la résistance au lysozyme chez <i>E. faecalis</i>	82
II. 1. Contexte de l'étude	82
II. 2. Identification de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lysozyme	82
II. 2. 1. Caractérisation du gène EF0783	82
II. 2. 2. Caractérisation du gène EF1843	83
II. 2. 3. Caractérisation du gène EF0590	85
II. 3. Recherche d'un lien entre résistance au lysozyme et présence des gènes EF1843, EF0783 et EF0590	86
II. 4. Construction des mutants Δ EF1843, Δ EF0783 et du double mutant Δ EF1843/ Δ EF0783	88
II. 5. Analyse de la sensibilité au lysozyme	88

II. 6. Effet de la mutation des gènes EF1843 et EF0783 sur la survie d' <i>E. faecalis</i> dans les macrophages péritonéaux de souris	89
II. 7. Analyse de la composition des mucopeptides du PG d' <i>E. faecalis</i>	90
II. 8. Purification de la protéine EF1843	94
II. 9. Analyse de l'expression de EF1843 et de son incidence sur la structure du PG	95
II. 10. Discussion et conclusion	96
Chapitre III : Recherche par approche globale de déterminants génétiques responsables de la résistance au lysozyme chez <i>E. faecalis</i>	100
III. 1. Mutagenèse aléatoire chez <i>E. faecalis</i> JH2-2	100
III. 2. Recherche des membres du régulon sigV par étude protéomique	101
III. 3. Recherche des membres du régulon sigV par approche transcriptomique	104
III. 4. Conclusion	106
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXE 1	126
ANNEXE 2	146

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram positif.....	20
Figure 2 : Représentation schématique de la structure du PG d' <i>E. faecalis</i>	21
Figure 3 : Biosynthèse des acides téichoïques et du PG.	22
Figure 4 : Représentation schématique du modèle d'assemblage du PG chez <i>B. subtilis</i>	24
Figure 5 : Structure des WTA et des LTA.	27
Figure 6 : Voie de biosynthèse des acides lipotéichoïques (54).....	29
Figure 7 : Voies d'export protéique chez <i>B. subtilis</i> (117).	32
Figure 8 : Représentation des trois principaux types de peptides signal avec leurs caractéristiques.	33
Figure 9 : Signaux d'export d'une protéine possédant un motif LPXTG.....	35
Figure 10 : Représentation du PG indiquant les liaisons chimiques clivées par les hydrolases.	38
Figure 11 : Structure tridimensionnelle du lysozyme.....	41
Figure 12 : Structure du PG et site de clivage du lysozyme.....	44
Figure 13 : Interaction du lysozyme avec le PG.....	45
Figure 14 : Séquence de réaction de glycosyle hydrolase permettant une rétention de configuration anomérique (ex : lysozyme).	45
Figure 15 : Séquence de réaction de glycosyle hydrolase inversant la configuration anomérique.	46
Figure 16 : Structure et modification du PG.	48
Figure 17 : Mécanisme proposé de résistance aux CAMP chez <i>S. aureus</i>	52
Figure 18 : Schéma de la construction de mutants à l'aide du plasmide pMAD.....	66
Figure 19 : Organisation structurale des régions chromosomiques des gènes (a) EF2224 et (b) EF3054.	77
Figure 20 : Cinétiques de croissance de la souche JH2-2 et du mutant EF3054 en milieu GM17.....	79
Figure 21 : Représentation schématique de l'organisation génétique du gène EF0783.....	83
Figure 22 : Alignement de séquences de 3 N-acétylglucosamine déacétylases de <i>L. monocytogenes</i> (<i>LmPgdA</i>), <i>L. lactis</i> (<i>LlPgdA</i>) et de <i>S. pneumoniae</i> (<i>SpPgdA</i>) avec la protéine EF1843.....	84
Figure 23 : Représentation schématique de l'organisation génétique du gène EF1843.....	85
Figure 24 : Représentation schématique de l'organisation génétique du gène EF0590.....	86
Figure 25 : Exemple du test de sensibilité au lysozyme effectué sur des souches d' <i>E. faecalis</i> d'origine environnementale.	87
Figure 26 : Sensibilité au lysozyme de la souche JH2-2 et des mutants Δ EF1843, Δ EF0783, Δ EF0783- Δ EF1843 et Δ sigV.....	89
Figure 27 : Evolution de la survie intra-cellulaire de souches d' <i>E. faecalis</i> et d' <i>E. coli</i> dans des macrophages intra-péritonéaux de souris.	90
Figure 28 : Séparation par RP-HPLC des muuropeptides de la souche JH2-2 d' <i>E. faecalis</i> et du mutant Δ EF0783.	92
Figure 29 : Structure des muuropeptides du PG d' <i>E. faecalis</i>	92
Figure 30 : Analyse en SDS-PAGE de l'extrait protéique obtenu après surexpression de la protéine EF1843 et purification par chromatographie d'affinité.	95
Figure 31 : Séparation par électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines totales de la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2.....	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs de virulence chez <i>E. faecalis</i>	19
Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude.	55
Tableau 3 : Plasmides utilisés au cours de cette étude.	55
Tableau 4 : Amorces utilisées au cours de ce travail.....	56
Tableau 5 : Composition des gels de séparation SDS-PAGE 12 %.....	67
Tableau 6 : Composition des gels de concentration SDS-PAGE 4 %.....	68
Tableau 7 : Analyse par PCR en temps réel des gènes identifiés consécutivement à l'hybridation différentielle.	76
Tableau 8 : Corrélation entre résistance au lysozyme et détection par PCR du gène EF1843.	87
Tableau 9 : Masse moléculaire des mucopeptides de la souche d' <i>E. faecalis</i> JH2-2.	93
Tableau 10 : Conditions d'expression et identification des protéines d'intérêt sélectionnées lors des expériences d'électrophorèses bidimensionnelles (Figure 31).....	103
Tableau 11 : Facteurs d'inhibition de plusieurs gènes d'intérêt.	104
Tableau 12 : Liste des 40 gènes les moins exprimés dans le mutant <i>sigV</i> par rapport à la souche JH2-2.....	105

ABREVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ADNc	ADN complémentaire
Amp	Ampicilline
APS	Ammonium persulfate
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovin serum albumin
CAMP	Cationic antimicrobial peptides
Cm	Chloramphénicol
CWB	Cell wall-binding repeats
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DO _{600nm}	Densité optique à 600 nm
DTT	Dithiothréitol
ECF	Extra cytoplasmique function
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
Em	Erythromycine
ERV	Entérocoques résistant à la vancomycine
HEWL	Hen egg white lysozyme
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropylthiogalactoside
Ivy	Inhibitor of vertebrate lysozyme
Kan	Kanamycine
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LTA	Lipoteichoic acid
Ltg	Lipoprotéine diacylglycéryl transférase
Mb	Megabases
MgM	Magnésium minimum
MOPS	Acide 3-morpholine propanesulfonique
Opp	Oligo peptide perméase
pb	Paire de bases
PBP	Penicillin binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Peptidoglycane
PGRP	Peptidoglycan recognition protein
RBS	Site de fixation des ribosomes (ribosome binding site)
rpm	Révolution par minute
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIC	Streptococcal Inhibitor of Complement
SLH	S-layer homology
TA	Acides téichoïques
Tat	Twin-arginine translocation
Tris	N,N,N,N'-tétraméthyl éthylidiamine
UFC	Unité formant colonie
WTA	Wall teichoic acids
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Dés le début des années 1990, le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) de l'Université de Caen a orienté sa thématique de recherche vers l'étude des aspects physiologiques et moléculaires de la réponse aux variations des conditions environnementales des bactéries lactiques. Dans le cadre de la collaboration des équipes de recherches Universitaires avec les Etablissements Publics à caractère Scientifique et Technologique (EPST), notre laboratoire a été associé à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) sous forme d'Unité Sous Contrat (USC) à partir de l'année 2000.

Le modèle d'étude retenu par notre laboratoire est la bactérie lactique *Enterococcus faecalis*. Celle-ci appartient au groupe des entérocoques et possède la capacité de coloniser le tractus gastro-intestinal ainsi que des aptitudes naturelles et acquises à résister à de nombreux antibiotiques. Ces aspects confèrent à cet organisme, qui présente généralement une virulence intrinsèque faible, une excellente opportunité de devenir pathogène. En effet, considéré dans les années 1970 comme inoffensif, *E. faecalis* représente de nos jours le troisième pathogène hospitalier aux Etats-Unis et le 5^{ème} en France. Le choix de ce modèle d'étude est conforté par le fait qu'actuellement, la prévention des maladies nosocomiales et la résistance aux antibiotiques deviennent des problèmes majeurs de santé publique.

En plus de leur capacité de résistance à de nombreux antibiotiques, les entérocoques sont souvent porteurs de facteurs de virulence qui favorisent la colonisation et l'invasion tissulaire de l'hôte et leurs assurent une protection vis-à-vis des réponses immunitaires innées et acquises. Bien que plusieurs protéines de surface et sécrétées impliquées dans la virulence aient été identifiées, peu de choses sont connues concernant les mécanismes de la pathogenèse chez *E. faecalis*. De plus, les mécanismes permettant à *E. faecalis* de résister à l'une des enzymes les plus importantes et les plus répandues du système immunitaire inné qui est le lysozyme, sont à ce jour inconnus.

L'ensemble de ces éléments nous a servi de base dans la recherche de facteurs pouvant favoriser ou inciter une bactérie à passer d'un état de commensalisme à celui de pathogène.

La synthèse bibliographique présentée dans ce manuscrit est divisée en trois parties. La première résume les connaissances actuelles sur *E. faecalis*, son environnement, son intérêt dans les domaines de la santé publique et de l'agro-alimentaire. La seconde partie se veut être l'état de l'art de la paroi des bactéries à Gram positif. Dans la dernière partie sont

décrit des données acquises depuis une centaine d'années, sur les différents aspects et propriétés du lysozyme ainsi que sur les mécanismes mis en place par les bactéries pour se prémunir de son action.

Après un chapitre consacré à la description des différentes techniques d'analyse utilisées lors de ce travail de thèse, les résultats sont présentés en trois parties :

1) Une étude, préalablement initiée au sein de notre laboratoire, visant à comparer les niveaux d'expression des gènes codant pour des protéines de surface et des protéines sécrétées entre la souche d'*E. faecalis* JH2-2 et les isolats cliniques V583 et MMH594 a permis l'identification de plusieurs gènes d'intérêt. Deux d'entre eux ont été retenus pour une analyse plus approfondie (mutagenèse et caractérisation phénotypique).

2) Afin de comprendre les raisons pour lesquelles *E. faecalis* persiste lors d'infections, nous avons essayé de comprendre, les causes de sa résistance au lysozyme. Ainsi, nous avons mis en évidence l'implication dans la résistance au lysozyme d'une protéine responsable de la modification du peptidoglycane par *O*-acétylation et nous avons également montré que contrairement à *S. aureus*, la *O*-acétylation n'est pas le déterminant majeur de la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*.

3) Finalement nous nous sommes tournés vers des approches globales (électrophorèse bidimensionnelle de protéines, puce à ADN et criblage d'une banque de mutants insertionnels) dans le but d'identifier de nouveaux déterminants géniques participant aux mécanismes de résistance au lysozyme chez *E. faecalis*.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Principales caractéristiques du genre *Enterococcus* et de l'espèce *faecalis*

I. 1. Caractères généraux

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %). Ce sont des organismes anaérobies aérotolérants, oxydase et catalase négatives bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans leur génome (1). En 1984, des expériences d'hybridation ADN-ADN et l'analyse des séquences des ARNr16S ont permis de montrer que les espèces *Streptococcus faecium* et *S. faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier leur transfert dans le genre *Enterococcus* (2). A ce jour, 33 espèces forment le genre *Enterococcus* (3). Cependant, l'évolution des techniques de taxonomie, ainsi que l'intérêt grandissant pour ce groupe de bactéries laisse augurer d'autres réarrangements possibles dans la phylogénie de ce genre. Les entérocoques ont une température de croissance optimale de 35 °C bien que la plupart des espèces de ce genre peuvent croître à des températures allant de 10 à 45 °C. Ils peuvent aussi croître en présence de 6,5 % de NaCl, à pH 9,6, et ils survivent à un traitement de 60 °C pendant 30 min (certaines exceptions existent quant à ces capacités). De part leur faculté à métaboliser les sucres en produisant (majoritairement) de l'acide lactique, les entérocoques appartiennent également au groupe des bactéries lactiques. La plupart des entérocoques appartiennent au groupe sérologique D de la classification de Lancefield (4).

En France, environ 75 % des souches d'entérocoques identifiées lors d'infections nosocomiales appartiennent à l'espèce *E. faecalis*. Par conséquent, la majorité des études sur les mécanismes d'infection des entérocoques est menée sur cette espèce.

I. 2. Niches écologiques des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques telles que l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (10^5 - 10^8 CFU/g de matière fécale), plus rarement dans le vagin (5) ou la cavité buccale (6). On les retrouve également dans les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer, le sol, sur les végétaux et chez les insectes (7, 8). Plus exceptionnellement, leur présence est signalée dans le tractus intestinal des animaux à sang froid (batraciens, reptiles et insectes) (9).

De nombreuses études ont établi que *faecalis* est l'espèce la plus communément retrouvée parmi les entérocoques (10-12). Ainsi, disséminé avec les excréments humains, les déjections animales et les déchets domestiques, *E. faecalis* se retrouve dans l'environnement immédiat de l'homme. En raison de ses capacités de résistance, cette bactérie est communément utilisée comme indicateur de contamination fécale afin de tester la qualité hygiénique des échantillons environnementaux (13).

I. 3. Utilisation des entérocoques dans l'alimentation

La présence d'entérocoques peut-être détectée dans de nombreux aliments comme le Comté, la Mozzarella, différents fromages traditionnels de pays méditerranéens ou encore des produits fermentés tels que des légumes ou des saucisses (pour une revue, voir (14)). Il a été démontré que cette présence n'était pas toujours due à une contamination fécale (8). La résistance des entérocoques aux températures de pasteurisation et leur adaptabilité aux différents substrats et aux conditions de culture (basses et hautes températures, pH extrêmes et salinité) justifie qu'ils soient retrouvés, aussi bien dans les aliments à base de produits crus (lait, viande...), que dans ceux élaborés suite à des traitements technologiques. La contribution des entérocoques aux propriétés organoleptiques de ces aliments (par le développement d'arômes) et leur aptitude à produire des bactériocines sont d'importantes caractéristiques pour leurs applications en biotechnologie (15, 16). Par contre, la présence d'entérocoques dans le tractus gastro-intestinal des animaux peut mener à la contamination de la viande durant l'abatage et provoquer des phénomènes d'altération (17).

Les entérocoques peuvent aussi être utilisés comme probiotiques (18, 19). Même si l'utilisation de souches d'*E. faecium* et d'*E. faecalis* pour la composition de probiotiques à usage humain reste limitée, les souches d'*E. faecalis* semblent plus largement utilisées comme complément alimentaire pour animaux (18). Depuis 2004, 10 préparations contenant *E. faecium* sont autorisées en tant qu'additifs alimentaires dans l'Union Européenne dont certaines sont considérées comme cliniquement efficaces dans la prévention des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (20) ou dans le traitement des diarrhées infantiles (21).

Toutefois, l'utilisation d'entérocoques dans l'alimentation reste controversée. Bien que l'effet probiotique de certaines souches soit clairement établi, l'émergence et l'augmentation des maladies humaines attribuées aux entérocoques et leur multirésistance aux antibiotiques, a soulevé des inquiétudes concernant leur utilisation dans l'industrie alimentaire (19).

I. 4. Les entérocoques, des bactéries pathogènes opportunistes

Considérés comme anodins il y a une vingtaine d'années, les entérocoques sont maintenant clairement identifiés comme une des causes majeures d'infections nosocomiales. Ils font partie des pathogènes nosocomiaux les plus communs, et sont responsables d'infections urinaires ou intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies, d'endocardites et de méningites (22, 23). Aux Etats-Unis, les entérocoques sont le troisième genre bactérien isolé lors de bactériémies (24) et la seconde cause d'infections nosocomiales (25). C'est aussi le genre le plus souvent cité lors d'infections de plaies chirurgicales dans les unités de soins intensifs (26).

En France, d'après une étude publiée récemment portant sur 15803 cas d'infections nosocomiales, les entérocoques ont été identifiés comme responsables de 6,4 % des cas, ce qui leur confère le cinquième rang (27). Sur 641 souches d'entérocoques identifiées, 3,1 % présentaient une résistance à la vancomycine, représentant moins de 0,01 % de la totalité de ces infections en France.

La facilité avec laquelle les entérocoques acquièrent des résistances à des antibiotiques, couplée à leur capacité de survie dans l'environnement, les rend spécialement adaptés pour devenir des pathogènes opportunistes. L'accroissement des populations sensibles, l'augmentation de la durée d'hospitalisation et la large utilisation des antibiotiques participent aussi à ce phénomène.

Les infections à entérocoques peuvent provenir de nombreuses sources, comme les cathéters intra-veineux, urinaire ou biliaire, les corps étrangers, les plaies chirurgicales ou encore *via* la cavité buccale (22, 28). Certaines études ont aussi montré que les entérocoques pouvaient être transmis par les mains du personnel soignant, le matériel clinique (29) ou encore de patient à patient (30).

I. 4. 1. Résistance aux antibiotiques chez les entérocoques

La remarquable capacité à résister aux antibiotiques des entérocoques leur confère un avantage sélectif important pour survivre dans un environnement où l'utilisation de ceux-ci est massive.

Parmi ces antibiotiques, on trouve la vancomycine qui est l'antibiotique de dernier recours lors de nombreuses infections causées par des bactéries à Gram positif. Les entérocoques résistant à la vancomycine (ERV) ont été identifiés pour la première fois en Europe en 1987 (31, 32) et 15 ans après ils représentaient 25 % des isolats d'entérocoques

issus de patients américains. Toutefois, l'épidémiologie des infections à ERV diffère en fonction des pays. En effet, leur proportion en France est restée assez faible avec une prévalence de 3 % sur l'ensemble des entérocoques (27). La démonstration récente de la transmission, chez l'homme, de cette résistance d'un entérocoque à une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline chez deux patients américains souligne le danger potentiel de la coexistence dans le même réservoir de ces deux pathogènes (33).

Lors d'infections sévères à entérocoques, les traitements usuels consistent en la combinaison d'ampicilline et d'aminoglycosides (gentamicine) qui sont connus pour avoir un effet synergique. Dans les cas causés par des ERV, de fortes doses d'ampicilline et de sulbactam, de chloramphénicol ou de doxycycline avec un nouvel antibiotique comme la quinupristine-dalfopristine ou le linézolide peuvent-être utilisés. Toutefois, des souches résistantes pour chacun de ces antibiotiques ont déjà été identifiées (34).

I. 4. 2. Mécanismes d'infection *in vivo*

Les raisons pour lesquelles une bactérie commensale peut devenir pathogène ne sont pas encore bien comprises. Une des hypothèses serait que l'apparition d'une perturbation dans l'équilibre hôte-commensal permette aux bactéries intestinales de gagner des sites extra-intestinaux et provoquer une infection. Cette situation peut être générée par des traitements aux antibiotiques, une blessure chez l'hôte ou une altération du système immunitaire. En effet, ce déséquilibre pourrait mener à la translocation des micro-organismes de la lumière intestinale vers le système sanguin et causer une dissémination systémique (35). Lors d'infections endogènes réalisées avec *E. faecalis*, Wells et ses collaborateurs (36) ont proposé un modèle dans lequel, ces bactéries seraient transportées de l'intestin aux systèmes sanguin et lymphatique par l'intermédiaire de cellules épithéliales intestinales ou de macrophages. Cette hypothèse implique qu'*E. faecalis* soit capable de survivre à l'intérieur des macrophages et plus généralement dans les cellules phagocytaires. Certaines études étayaient cette théorie : en effet, il a été démontré grâce à un modèle d'infection intra-péritonéal, qu'*E. faecalis* est capable de persister plus longtemps dans les macrophages de souris que d'autres microorganismes saprophytes de la flore intestinale comme *Lactococcus lactis* ou une souche d'*Escherichia coli* non pathogène (37). Cette capacité de survie, malgré les stress générés par les cellules phagocytaires (stress oxydant, stress acide, agression de la paroi par des enzymes tels que le lysozyme), montre encore l'extraordinaire capacité d'*E. faecalis* à résister aux agressions de l'environnement.

I. 4. 3. Facteurs de virulence chez *E. faecalis*

Les facteurs de virulence sont définis comme des éléments qui augmentent la capacité du microorganisme à provoquer la maladie : ils ne sont pas indispensables à la survie de la bactérie mais diminuent son potentiel pathogène lorsqu'ils sont absents (38). Ces facteurs ont pour rôle de permettre l'adhérence aux cellules hôtes et à la matrice extra-cellulaire, faciliter l'invasion des tissus, moduler la réponse immunitaire et inflammatoire et causer des dommages par l'intermédiaire de toxines. Bien que la pathogénicité des entérocoques soit discutée dans certaines situations, des facteurs de virulence ont été décrits dans des modèles expérimentaux, mais les données concernant leur fréquence dans les isolats cliniques sont rares. De plus, la relation entre présence du facteur de virulence et gravité de la maladie n'est que peu soulignée. La liste des principaux facteurs de virulence identifiés chez *E. faecalis* est présentée dans le Tableau 1. Toutefois, les résultats obtenus lors de l'infection avec des souches portant ou non trois facteurs de virulence (hémolysine, substance d'agrégation et gélatinase) montrent que ces facteurs, bien qu'aggravant la maladie, n'expliquent pas à eux seuls le pouvoir pathogène des entérocoques (39).

En plus de ces facteurs de virulence *E. faecalis* possède des capacités physiologiques lui permettant d'accroître son caractère pathogène. Parmi ces capacités on peut citer celles :

- de passer à un état viable mais non cultivable (VBNC) (40) qui semble lié à la capacité de persister dans l'organisme lors d'infections chroniques (41)
- de former des biofilms qui permet entre autre de coloniser des surfaces, de se protéger de l'action des substances antimicrobiennes, de médier l'adhésion et l'invasion aux cellules hôtes (42).

Tableau 1 : Facteurs de virulence chez *E. faecalis*.

Facteur	Rôle	Référence
Phéromones	Conjugaison : dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques et facteurs de virulences	(39, 43)
Substance d'agrégation (AS)	Conjugaison : Protéine de surface dont l'expression est inductible par les phéromones et qui permet l'agrégation des cellules et l'adhésion aux cellules intestinales de l'hôte	(43)
EfaA	Adhésine : Antigène de surface, intervient lors d'endocardites	(44)
Ace	Adhésine : Adhésion au collagène, exprimée en conditions de stress	(45)
Esp	Adhésine : Adhésion et contournement du système immunitaire de l'hôte et formation de biofilms	(46)
Acides lipotéichoïques (LTA)	Récepteurs de l'AS, adhésion aux cellules eucaryotes, rôle dans l'apoptose de certaines lignées cellulaires comme les macrophages	(39)
Gélatinase (GelE)	Endopeptidase extracellulaire : hydrolyse la gélatine, le collagène et l'hémoglobine. Gène co-transcrit avec <i>sprE</i> , codant une sérine protéase	(47, 48)
Cytolysine/hémolysine	Lyse cellulaire : activité sur les macrophages, les érythrocytes ou les bactéries à Gram positif	(49)
Epa, Cps	Biosynthèse de polysaccharides : rôle dans la survie dans les cellules phagocytaires	(50)
FsrAC	Système à deux composants : contrôle l'expression de <i>gelE</i> et <i>sprE</i> .	(47)
Gls24	Protéine générale de stress	(51, 52)

II. Paroi des bactéries à Gram positif

La paroi bactérienne (Figure 1) est une structure fascinante, simple de conception et à la fois sophistiquée et complexe dans son assemblage. Cette structure est si indispensable chez les bactéries qu'elle est historiquement la cible clé des thérapies antibactériennes. Cette structure est aussi considérée par certains comme la caractéristique définissant le règne *Bacteria* dans sa globalité (53). Conçue pour résister à la pression de turgescence exercée par la cellule bactérienne, la paroi doit être assez rigide pour fournir une intégrité physique à la cellule mais aussi suffisamment flexible pour permettre son expansion. Ces propriétés sont conférées par différents types de peptidoglycane (PG) dont les plus notables sont ceux des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Le PG est lié de manière covalente ou non avec des acides teichoïques, des polysaccharides et des protéines. L'ensemble de ces molécules confère aux bactéries des parois avec des propriétés propres à chaque espèce voire à chaque

souche. Pour les pathogènes, la paroi contribue grandement à leur virulence, leur interaction avec le système immunitaire, le développement de symptômes chez l'hôte... Bien que la paroi bactérienne ait été le sujet de nombreuses études, on observe un regain d'intérêt pour celle-ci suite à la mise en évidence récente de processus complexes impliqués dans son assemblage et sa structure.

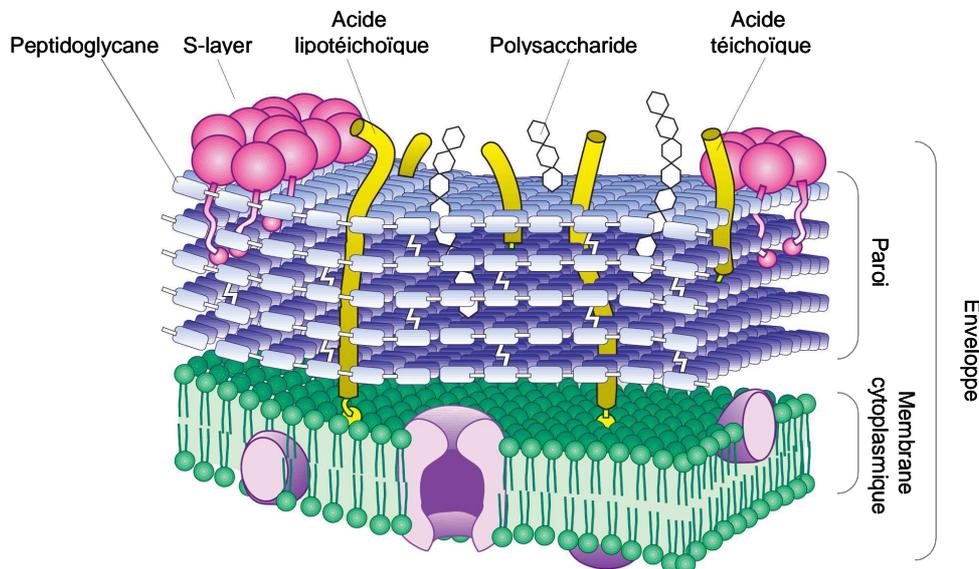


Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram positif.

La bicouche phospholipidique renfermant des protéines incorporées est recouverte par plusieurs couches de PG formant une carapace comprenant des polysaccharides, des acides téichoïques, lipotéichoïques, le tout peut-être entouré par une couche externe de protéines de type S-layer. Pour la clarté, les protéines associées à la paroi ne sont pas représentées (54).

II. 1. Le peptidoglycane (PG)

Le PG est une structure macromoléculaire continue, localisée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique de presque toutes les eubactéries et qui se retrouve exclusivement dans ces organismes (55). Sa principale fonction est de préserver l'intégrité cellulaire en résistant à la pression osmotique interne. Il est aussi responsable du maintien d'une forme cellulaire définie et il est intimement impliqué dans le processus de division cellulaire (56). Son absence chez des cellules placées dans un milieu hypotonique entraîne le phénomène de turgescence et aboutit à la rupture de la membrane cytoplasmique. Sous certaines conditions, des cellules déficientes en PG peuvent être maintenues sous forme de protoplastes ou de sphéropastes, mais elles perdent leur forme et la division cellulaire est entravée ou grandement perturbée.

II. 1. 1. Structure du PG

Les principaux composants de cette macromolécule sont des chaînes de glycanes linéaires, reliées entre elles par des petits peptides (Figure 2). Les chaînes de glycanes sont composées par l'alternance d'unités de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Toutes les liaisons entre les sucres sont de type β ,1-4. Le groupement carboxyle de chaque NAM est substitué par une sous-unité peptidique qui est le plus souvent de type : L-alanyl- γ -D-glutamyl-diaminopimelyl(ou L-lysyl)-D-Alanyl-D-Alanine dans un PG natif et qui peut par la suite perdre un ou les deux résidus D-alanine après maturation. Les chaînes de PG voisines sont interconnectées soit par une liaison peptidique directe entre une sous-unité peptidique d'une chaîne avec une autre soit par un court pont peptidique entre deux sous-unités peptidiques. Bien que la composition des peptides puisse varier énormément d'une espèce à l'autre, la composition du squelette carbohydrate est généralement considérée comme étant constante.

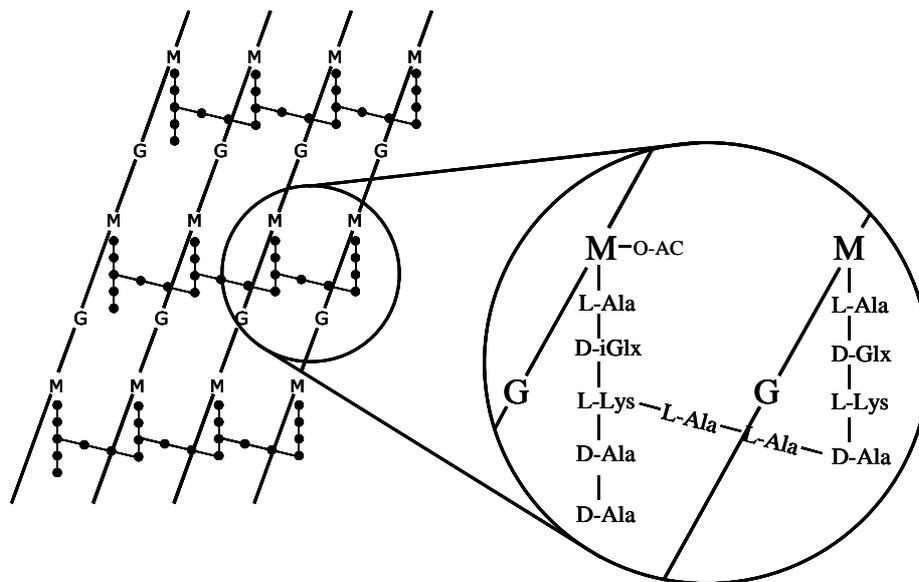


Figure 2 : Représentation schématique de la structure du PG d'*E. faecalis*.

G = N-acétylglucosamine ; M = acide N-acétylmuramic ; L-ala = L-alanine ; D-ala = D-alanine ; D-iGlx : D-isoglutamine ou D-isoglutamate ; L-Lys : L-lysine ; O-Ac : O-acétylation.

II. 1. 2. Biosynthèse du PG

La biosynthèse du PG a été étudiée chez de nombreux organismes et une vue d'ensemble valide pour les bactéries à Gram positif et négatif a émergé (57-62). La biosynthèse d'une molécule aussi complexe que le PG ne peut se faire en une seule étape réactionnelle simple. Deux principales étapes sont généralement distinguées. La première

concerne l'assemblage de l'unité dissaccharide-peptide monomérique *via* une série de précurseurs UDP (Uridine 5'-phosphate) et d'intermédiaires lipidiques (Figure 3). 6 étapes cytoplasmiques (catalysées par les protéines MurA à MurF) mènent à la formation de précurseurs UDP-NAM-pentapeptide à partir de UDP-NAG.

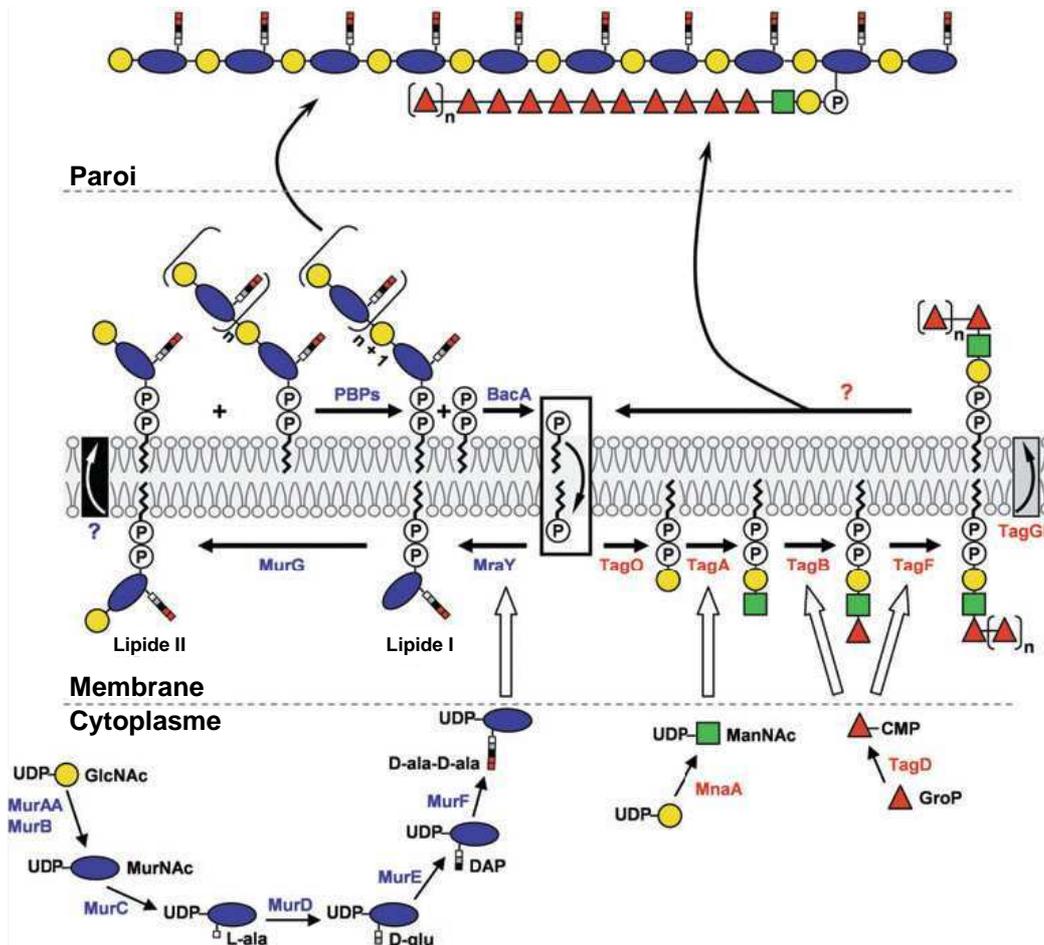


Figure 3 : Biosynthèse des acides téichoïques et du PG.

Les biosynthèses du PG et des précurseurs des acides téichoïques sont respectivement représentées sur la gauche et la droite du schéma. La convergence des deux voies vers le substrat commun undecaprenyl-phosphate est marquée par un rectangle noir. La distinction entre les compartiments cytosoliques, membranaires et pariétaux est représentée par les lignes grises. Il est à noter que la polymérisation des acides téichoïques s'effectue de manière intra-cellulaire alors que celle du PG intervient à l'extérieur de la cellule. Schéma tiré de (63).

Ensuite le transfert de la partie phospho-pentapeptide-NAM à l'accepteur membranaire, le undecaprenyl-phosphate, est catalysé par la transférase MraY et rejoint le lipide I. L'addition de NAG au lipide I par la transférase MurG mène au lipide II ; qui porte l'unité monomérique dissaccharide peptide complète : NAG-NAM-L-Ala- γ -D-Glu-A₂pm (ou L-Lys)-D-Ala-D-Ala (A₂pm, Acide diaminopimélique). Durant la formation des intermédiaires lipidiques, la sous-unité peptidique peut subir différentes modifications (amidation, addition d'autres acides aminés...). L'intermédiaire lipidique final est transloqué

par un mécanisme inconnu à travers l'environnement hydrophobe représenté par la membrane jusqu'aux sites d'incorporation externe des unités monomériques dans le PG en croissance. Ce mécanisme impliquerait les enzymes RodA et FtsW (64).

La seconde étape de synthèse du PG concerne la polymérisation des monomères à l'extérieur de la surface de la membrane cytoplasmique et l'accrochage du matériel nouvellement synthétisé à ceux déjà présents (Figure 3). Cette action est effectuée par les PBP (penicillin binding protein) dont font partie les glycosyltransferases qui catalysent la formation des chaînes linéaires de glycanes et les transpeptidases qui catalysent la formation des ponts peptidiques (65).

Des modifications de la structure du PG par ajout ou retrait de groupements acétyles ont été observées et caractérisées mais cette partie sera traitée plus en détail par la suite.

II. 1. 3. Cytosquelette et biosynthèse du PG

Les procaryotes ont été depuis longtemps considérés comme dépourvu de structure interne organisée et de cytosquelette. La morphologie cellulaire a traditionnellement été considérée comme étant déterminée par la paroi (66). Toutefois, la manière par laquelle le PG permet la détermination de la forme de la cellule n'avait pas été élucidée. C'est en 2001 que fut découvert la première protéine participant à la morphogénèse bactérienne (67, 68). Ce gène, nommé *mreB*, est un homologue éloigné de l'actine, que l'on retrouve dans la quasi totalité des génomes bactériens séquencés. Cette protéine a la capacité de s'auto-assembler en filaments hélicoïdaux localisés juste en-dessous de la face interne de la membrane plasmique (69). Il a été montré que l'insertion de PG néo-synthétisé chez *B. subtilis* suivait la même forme hélicoïdale (70). Il a ensuite été démontré que MreB formait un échafaudage contrôlant la forme cellulaire en dirigeant la synthèse de la paroi. Ce gène semble essentiel pour la plupart des bactéries. De plus, il semblerait que les protéines MreC et MreD dont les gènes sont exprimés en opéron avec le gène codant MreB, formeraient un complexe au niveau membranaire qui recevrait les informations structurelles des pseudo-filaments d'actine formés par MreB et transmettrait cette information aux PBP afin d'orienter les sites d'incorporation du PG néosynthétisé (Figure 4).

La protéine FtsZ quant à elle, est un homologue des tubulines eucaryotes qui s'assemblent en une structure en forme d'anneaux au niveau du septum de division (71). Cette protéine joue un rôle essentiel dans la division cellulaire et dans le recrutement de la machinerie de septation (72).

II. 1. 4. Caractérisation d'un périplasma chez les bactéries à Gram positif

La notion de périplasma, chez les bactéries à Gram positif, a déjà été suggérée mais jusqu'ici aucun espace périplasmique n'avait été réellement observé. Grâce à une technique de microscopie électronique à cryo-transmission et à une préparation des échantillons basée sur une méthode de vitrification cellulaire, Matias et Beveridge ont montré pour la première fois l'existence d'une zone de 22 nm pouvant correspondre à un espace périplasmique chez *B. subtilis* et *S. aureus* (73, 74) (Figure 4). Cet espace suffisamment large pour contenir un complexe protéique de la taille d'un ribosome, laisse facilement imaginer que la synthèse du PG soit dirigée par un complexe protéique composé de PBPs et d'hydrolases, dont l'activité serait dirigée par les éléments du cytosquelette bactérien (63).

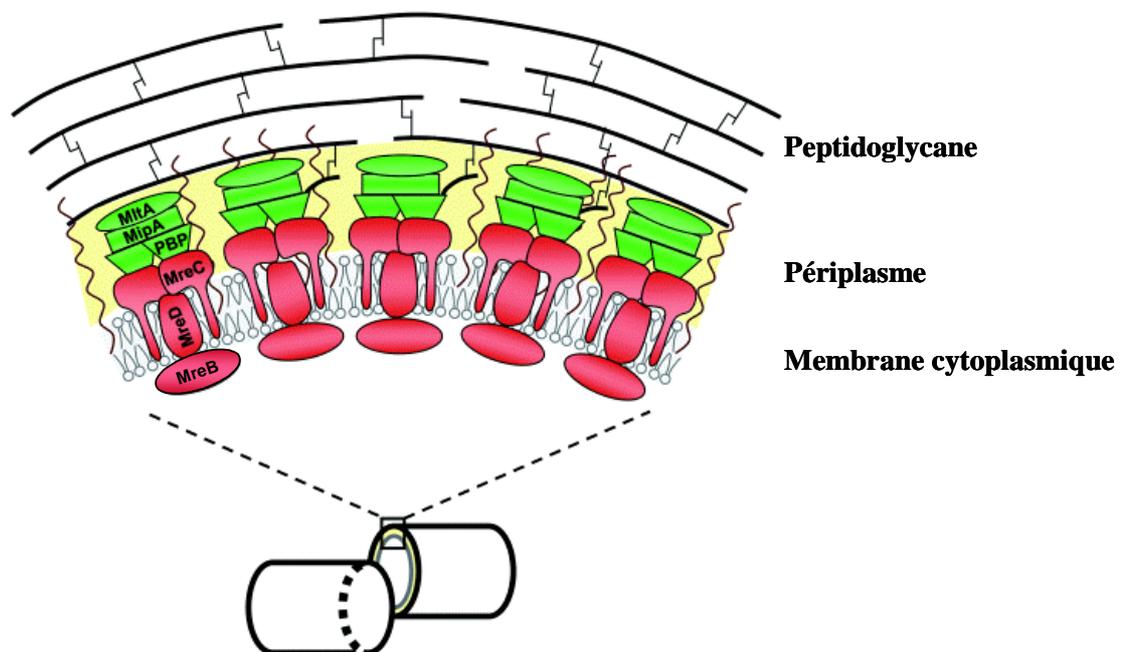


Figure 4 : Représentation schématique du modèle d'assemblage du PG chez *B. subtilis*.

Cette vue conceptuelle représente une section transversale de la paroi de *B. subtilis* telle qu'elle a été décrite par Bhavsar *et al.* (63). Ce modèle incorpore le concept d'une insertion du PG dirigée par le cytosquelette (représenté en rouge) et celui de l'existence d'un espace périplasmique (représenté en jaune). Le complexe multiprotéique du cytosquelette composé de MreB, MreC et MreD transmet les informations sur l'organisation spatiale du cytosol vers le complexe de bio-synthèse du PG situé dans le périplasma (représenté en vert) et composé de PBPs, d'hydrolases du PG (MltA) et d'enzyme de repliement (MipA). Les LTA (représentés en marron) sont ancrés dans la membrane, traversent l'espace périplasmique et s'étendent dans le PG (les chaînes de glycanes et les ponts peptidiques sont représentés respectivement par des lignes noires épaisses et des lignes noires fines). Les wall teichoic acids (WTA) et les segments transmembranaires des PBPs ne sont volontairement pas représentés.

II. 1. 5. Architecture du PG

Malgré des études de diffractions, menées il y a environ 20 ans, la structure tridimensionnelle du PG n'avait jusqu'ici pas encore été élucidée (75). La conception classique de l'organisation du PG correspond à celle d'un réseau horizontal de chaînes polysaccharidiques entourant la cellule, reliées entre elles par les ponts peptidiques. Cependant, certains auteurs ont proposé à partir d'études basées sur la résonance magnétique nucléaire, un modèle alternatif, dans lequel le PG serait composé de chaînes perpendiculaires à la membrane, formant ainsi, un échafaudage interconnecté par les chaînes peptidiques (76).

II. 1. 6. Rôle du PG dans la pathogénèse

Le PG est connu comme étant un effecteur biologique important possédant différentes activités stimulatrices telles que des propriétés d'adjuvant (77), d'activateur de macrophages (78), de modulateur du sommeil à ondes lentes (79, 80), d'inducteur d'arthrites (81) ou encore de cytotoxique (82). La plupart des molécules déclenchant ces effets sont des petits fragments de PG, appelés muropeptides, qui dérivent de la macromolécule du PG et résultent certainement d'un processus de turn-over de cette structure. Ces muropeptides sont le résultat de l'action de D,D-carboxypeptidases et d'hydrolases. Cependant, il y a encore quelques années, peu de choses étaient connues à propos de la manière dont le PG provoque une telle variété de réponses chez l'hôte. En 1996, la première protéine eucaryote reconnaissant le PG a été identifiée chez le ver à soie (83) et nommée PGRP (peptidoglycan recognition protein). Par la suite, ces molécules ont aussi été identifiées chez les mammifères. En 2003, des avancées majeures ont eu lieu, dans l'identification des récepteurs cytosoliques, connus en tant que "nucleotide-binding oligomerization domain" (Nod1 et Nod2), comme senseurs exclusifs de muropeptides (84-88). En effet, Nod1 reconnaît NAG-NAM-L-alanine- γ -D-glutamate-*meso*DAP et Nod2 reconnaît NAG-NAM-L-alanine-D-glutamate.

Etant donné que les récepteurs PGRP et Nod reconnaissent des produits de dégradation du PG, la détection de celui-ci par l'hôte requiert préalablement un traitement du PG soit par des hydrolases bactériennes endogènes, soit par des enzymes de l'hôte pour que les récepteurs se lient à leurs agonistes. Par conséquent, n'importe quel mécanisme qui prévient le relargage de ces muropeptides ou modifie leur structure peut constituer un mécanisme d'évasion du système immunitaire inné (89).

II. 2. Les acides téichoïques

En marge du PG, la paroi bactérienne de la plupart des bactéries à Gram positif contient des acides téichoïques (TA) qui peuvent représenter de 30 à 60 % du poids total de la paroi (90). Les acides téichoïques comprennent ceux liés de manière covalente à la paroi (wall teichoic acids, WTA), et ceux liés de manière covalente aux lipides membranaires (lipoteichoic acid, LTA).

Les TA avec le PG constituent une matrice polyanionique qui confère à la paroi ses fonctions d'élasticité, de porosité et de résistance à la pression (90). Il existe une grande diversité dans la composition de ces polymères. Certaines espèces, telles que *Lactococcus lactis*, n'ont pas de WTA mais seulement des LTA (54). Les bactéries ne possédant pas de LTA, possèdent généralement d'autres polymères anioniques ayant des fonctions similaires comme des lipomannanes (*Micrococcus lysodeikticus*) (91) ou des lipoglycannes (*Bifidobacterium bifidum*) (92). Un autre exemple de l'importance de ces polymères anioniques est que chez *B. subtilis*, une carence en phosphate provoque un remplacement des WTA par un polymère d'acides téichuroniques qui est dépourvu de phosphate (93). Chacun de ces exemples illustre le rôle crucial de ces polymères anioniques pour la croissance bactérienne.

II. 2. 1. Composition des WTA et des LTA

Les WTA ont une importante variabilité de composition. Ce sont généralement des polymères anioniques de glycerol-phosphate, de ribitol-phosphate ou de glucosyl-phosphate, reliés au PG (94). La liaison au PG est effectuée par une unité ManNac(β 1-4)NAM, reliée à un NAM du PG par une liaison 1-6 phosphodiester (Figure 5) (95). Une à trois unités de glycerol-phosphate sert de pont entre l'unité de liaison et le polymère anionique composé de 15 à 60 sous-unités. De part la présence des groupements phosphates et carboxyl (COO^-), ces polymères ont une charge globale négative.

Les LTA sont généralement des polymères anioniques de glycerol-phosphate liés à une ancre membranaire glycolipidique de type Glucose(β 1-4)Glucose(β 1-3)diacylglycerol. Il peut toutefois exister des LTA constitués de monomères de Gal-Gal-Gro-P (Gro-P pour glycerophosphate) ou de Gal-Gro-P (94).

Selon les bactéries ces chaînes peuvent être substituées au niveau des groupements hydroxyl libres par des groupements, D-alanine, NAM, galactose (LTA) ou glucose (WTA) (90).

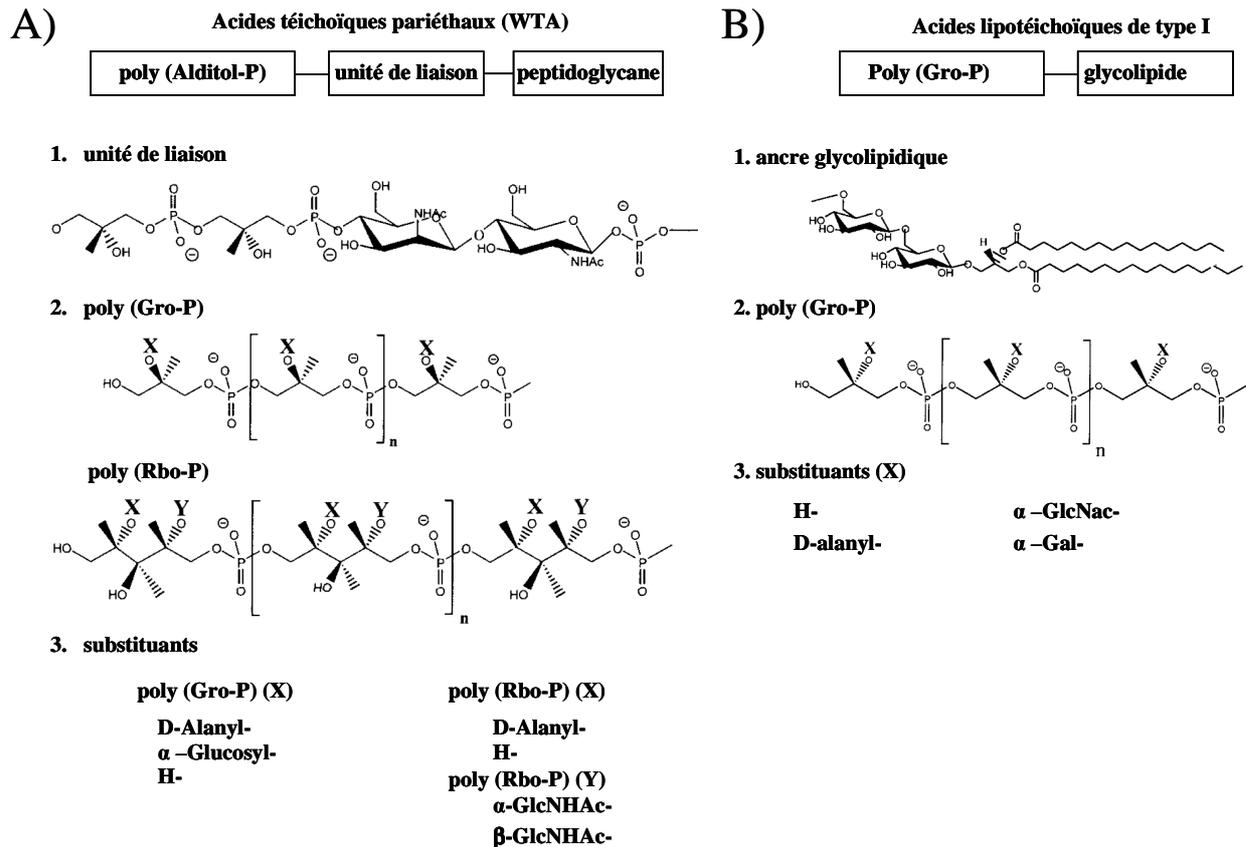


Figure 5 : Structure des WTA et des LTA.

A) Structure des WTA. B) Structure des LTA. Adapté à partir de (90).

II. 2. 2. Synthèse des WTA et des LTA

A l'exception de l'ajout des D-alanyl, les WTA et les LTA sont synthétisés par des voies différentes (96). En effet, pour des bactéries comme *B. subtilis* 186 qui ont des WTA et des LTA composés d'unités de Gro-P, la source de ces unités diffère pour chacun des polymères. De part la différence d'origine des unités Gro-P, les chaînes ne sont pas stéréoisomériquement identiques. Les LTA ne sont donc pas les précurseurs des WTA (90).

II. 2. 2. a. Synthèse des WTA

Les gènes de la voie de biosynthèse des WTA ont été identifiés chez *Bacillus* et ont été annotés *tagABDEFGHO* (63). D'après le modèle proposé, la biosynthèse des WTA peut être divisée en trois étapes : i) synthèse de l'ancre P-ManNAc-NAG, ii) polymérisation des polyols et iii) assemblage du polymère au PG (Figure 3).

Durant la première étape, la synthèse de l'ancre P-ManNAc-NAG fait intervenir successivement TagO qui transfère un NAG-1-P d'un UDP-NAG vers un undecaprenyl-phosphate ancré à la paroi (intervenant aussi lors de la synthèse du PG) puis par l'action de TagA qui transfère un ManNAc (provenant de la conversion de UDP-NAG en UDP-ManNAc par MnaA) de l'UDP-ManNAc au groupement 4-hydroxyl du NAG.

Lors de la deuxième étape, un GroP couplé par TagD avec une cytidine monophosphate (CMP) est ajouté sur le groupement 4-hydroxyl du ManNAc par TagB. Le composé ainsi formé est ensuite utilisé par tagF comme précurseur pour la polymérisation des autres monomères GroP.

La glucosylation du polymère par TagE et l'export du polymère *via* un transporteur de type ABC, TagGH, complète cette biosynthèse intra-cellulaire (63).

Les enzymes catalysant l'assemblage du polymère néo-synthétisé au PG restent encore à identifier.

II. 2. 2. b. Synthèse des LTA

Contrairement à la voie de synthèse des WTA, celle des LTA reste très peu documentée. En effet, bien qu'elle ait été décrite depuis de nombreuses années, il y a peu de gènes identifiés comme intervenant dans cette biosynthèse. L'assemblage de ce polymère peut se diviser en trois étapes : i) synthèse de l'ancre lipidique membranaire, ii) polymérisation et iii) translocation (Figure 6).

i) Le diglucosyldiacylglycérol est synthétisé au niveau du cytoplasme bactérien par l'enzyme YpfP, qui permet le transfert du glucose sur le diacylglycérol à partir d'un substrat UDP-Glc (97). De plus il a été mis en évidence chez *B. subtilis* que l' α -phosphoglucomutase (PgcA) (98) et l'UTP: α -glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GtaB) étaient requis pour la synthèse de l'UDP-Glc (99).

ii) Il a été montré que les diacylglycérol-P de la membrane lipidique étaient les donneurs de Gro-P pour la synthèse de LTA (100, 101). Les mécanismes et les gènes impliqués dans la polymérisation des Gro-P restent à identifier.

iii) A notre connaissance la seule protéine identifiée comme impliquée dans les mécanismes de translocation est la protéine LtaA facilite le transport du diglucosyldiacylglycérol à travers la membrane cytoplasmique et délivre ainsi le diglucosyldiacylglycérol comme substrat pour la synthèse des LTA (102).

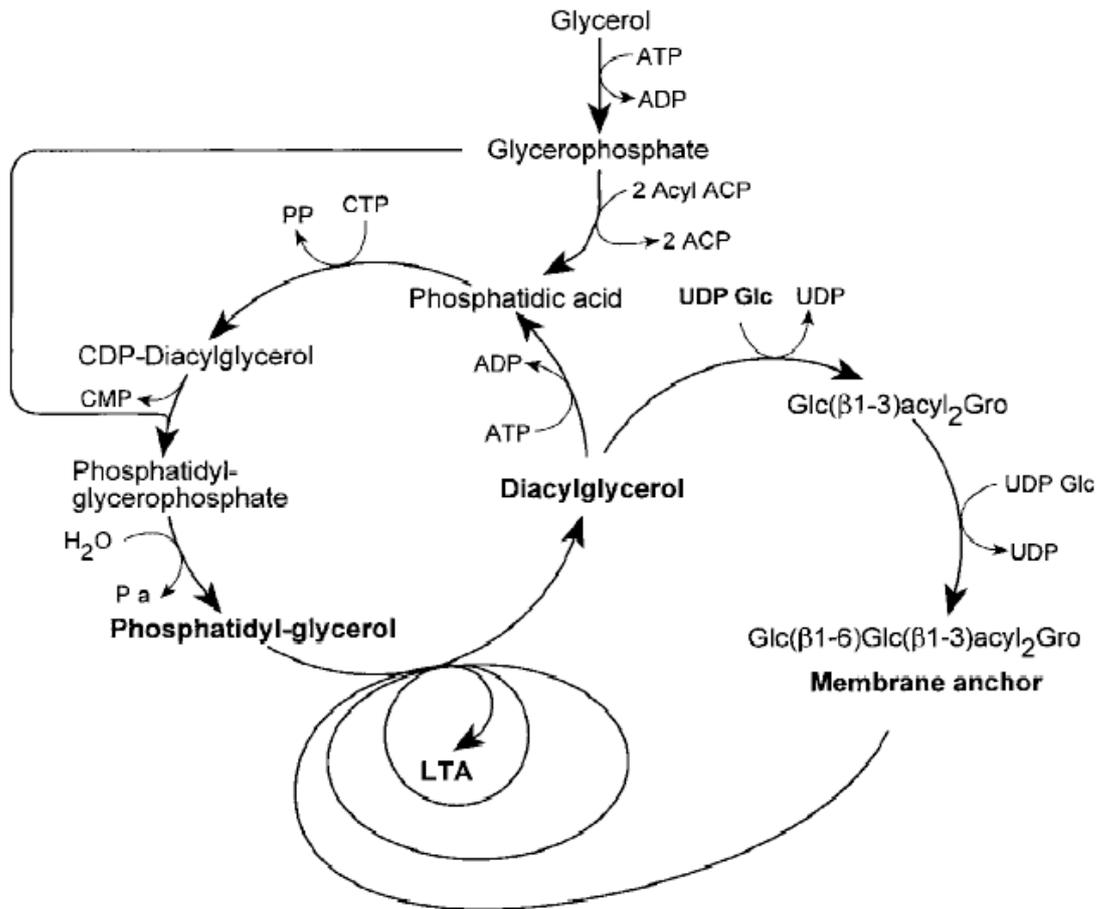


Figure 6 : Voie de biosynthèse des acides lipotéichoïques (54).

II. 2. 3. D-alanylation des TA

Les résidus D-alanyl ester protonnés sont un des substituants principaux des TA pour de nombreuses bactéries à bas GC%. De par la présence d'un grand nombre de groupements phosphates sur les TA, ceux-ci ont un fort caractère anionique et la modification de ce polymère par des D-Alanine, qui apportent un groupement amine ($-\text{NH}_3^+$) chargé positivement, permet de neutraliser partiellement cette charge. Les résidus D-alanyl sont liés de manière covalente aux TA par une liaison ester. Le degré d'alanylation des TA peut varier de 0 à 0,88 en fonction des souches et des conditions environnementales (90). Il faut toutefois noter que les WTA et les LTA de *Streptococcus pneumoniae* possèdent à la place des D-alanyl des substituants phosphorylcholine (103).

La D-alanylation des TA nécessite 4 protéines codées par les gènes de l'opéron *dltABCD*. Les protéines DltABD permettent l'exportation de la D-alanine à l'extérieur de la bactérie, où la réaction de D-alanylation des TA est catalysée par Dlt (90).

Trois rôles principaux ont été attribués aux D-alanyl-TA :

- moduler l'activité des autolysines (par modulation de la charge de surface)
- maintenir l'homéostasie cationique et participer à l'assimilation des métaux cationiques

- définir les propriétés électrochimiques de la paroi.

En fonction des espèces, les résidus D-alanyl ont été montrés comme intervenant dans de nombreux autres phénomènes tels que : la résistance aux peptides cationiques antimicrobiens (cationic antimicrobial peptides, CAMP), l'adhésion, la formation de biofilm, la tolérance au stress acide, l'agrégation des bactéries, le repliement protéique, la résistance aux antibiotiques, la sensibilité aux UV et la virulence (90).

II. 2. 4. Rôle des TA dans la physiologie bactérienne

En fonction des études, les TA ont été décrits comme étant essentiels tel que chez *B. subtilis* (104) ou chez *Listeria monocytogenes* (105), ou cruciaux pour la physiologie bactérienne puisque des mutants dépourvus de WTA ont été récemment obtenus chez *B. subtilis* (106) et *S. aureus* (107) bien que ces mutants soient gravement affectés dans leur morphologie et leur croissance.

Les TA contribuent de différentes manières à la physiologie bactérienne et bien que leur rôle ne soit pas encore totalement clair, plusieurs fonctionnalités ont été proposées :

- capteur de cations grâce à leur caractéristique anionique (108, 109)
- réservoir de phosphate pour les polymères de glycérol ou ribitol phosphate (54)
- créer un gradient de pH à travers la paroi par séquestration de protons (110)
- impliqués dans la régulation de l'autolyse par fixation aux PG hydrolases cationiques (111)
- médiateurs de l'attachement non covalent des protéines du S-layer au PG (112)
- implication dans l'adsorption des phages (113)
- participent à l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire et par conséquent aux propriétés adhésives (notamment chez *E. faecalis* lors de la conjugaison bactérienne) (114).

II. 2. 5. Rôle des TA dans la pathogénicité

Les TA peuvent être relâchés dans le milieu extérieur principalement après bactériolyse induite par les peptides cationiques (dont le lysozyme) et les bêta-lactames. Ils se lient aux cellules cibles soit non spécifiquement aux membranes phospholipidiques, ou bien

spécifiquement aux récepteurs CD14 et aux récepteurs Toll-like (115). Les TA liés à ces cibles peuvent interagir avec les anticorps circulant et activer la cascade du complément pour générer un phénomène d'induction de mort cellulaire chez l'hôte. Les TA déclenchent aussi la production par les neutrophiles et les macrophages d'espèces réactives de l'oxygène, de monoxyde d'azote, de protéinases, de peptides cationiques antimicrobiens... qui peuvent agir en synergie pour causer des dommages cellulaires. Ainsi, les TA partagent de nombreuses propriétés pathogéniques avec les endotoxines (lipopolysaccharides) et peuvent-être considérés comme des facteurs de virulence ayant un rôle important dans les infections et les séquelles post-infection (116).

II. 3. Les protéines de surface bactérienne et les protéines sécrétées

Les protéines de surface jouent un rôle important dans la physiologie bactérienne car ce sont elles qui, entre autres, régulent l'interaction avec l'environnement, facilitent l'import de nutriments, l'export de produits toxiques et qui participent à l'adhésion et la colonisation. Pour être associées à la surface, ces protéines synthétisées dans le cytoplasme, doivent emprunter des voies de translocation communes à celles des protéines sécrétées. Ce paragraphe traitera donc aussi bien des protéines de surface bactérienne que des protéines sécrétées dans le milieu extérieur. Après une vue d'ensemble des différentes voies de sécrétion, nous détaillerons les différentes localisations subcellulaires ainsi que les signaux permettant l'adressage des protéines.

II. 3. 1. Voies de sécrétion

De nombreux travaux ont été effectués sur la sécrétion protéique notamment chez *B. subtilis*, mettant en évidence des mécanismes conservés qui semblent valables pour la plupart des bactéries à Gram positif. Il résulte de ces études 4 voies principales permettant l'export de protéines à partir du cytoplasme (Figure 7). La voie permettant la sécrétion du plus grand nombre de protéines est de loin la voie de sécrétion de type Sec. Au regard de cela, les voies de translocation Tat (twin-arginine translocation), d'export des pseudopilines, et des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette), peuvent être considérées comme des voies spécifiques par lesquelles seulement un petit nombre de protéines transite.

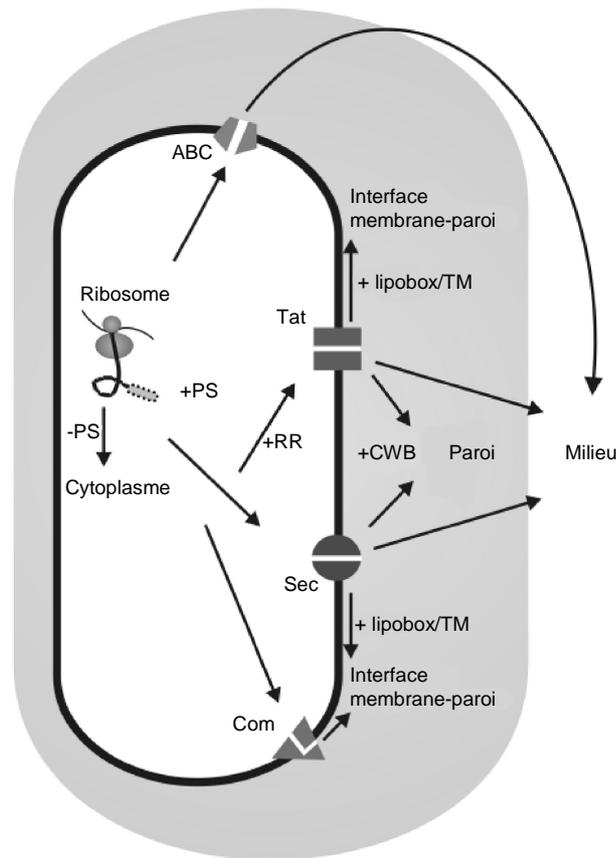


Figure 7 : Voies d'export protéique chez *B. subtilis* (117).

Les protéines synthétisées par les ribosomes peuvent être exportées de différentes manières en fonction de la présence (+SP) ou de l'absence (-SP) d'un peptide signal N-terminal de sécrétion (voir ci-dessous) et la présence de signaux de rétention spécifiques (Figure 7). Les protéines dépourvues de peptide signal restent dans le cytoplasme. Les protéines devant être retenues sur la face externe de la membrane cytoplasmique peuvent contenir un segment transmembranaire (TM) ou une modification lipidique (lipobox). Elles sont exportées *via* les voies Sec ou Tat en fonction de la présence ou de l'absence d'un motif twin arginine (RR). Les pseudopilines sont exportées par le système Com. Les protéines devant être maintenues au niveau de la paroi peuvent être exportées par les voies Sec ou Tat. Pour être retenues au niveau de la paroi, les protéines matures doivent posséder des signaux répétés de liaison à la paroi (cell wall-binding repeats : CWB). De plus, des protéines peuvent-être sécrétées dans le milieu par les voies Sec ou Tat, ou par des transporteurs de type ABC.

Les peptides signal (Figure 8) sont généralement composés de trois domaines distincts (118). Le domaine N-terminal contient au moins un résidu lysine ou arginine, dont la

II. 3. 2. Protéines liées à la membrane

II. 3. 2. a. Protéines transmembranaires

Une protéine est dite transmembranaire lorsqu'elle traverse au moins une fois entièrement la membrane cytoplasmique, par l'intermédiaire d'une série d'acides aminés hydrophobes enchâssés dans la bi-couche phospholipidique. Ces zones nommées "segments transmembranaires", n'ont pas réellement de contraintes de séquence mis à part une longueur minimale de 12 aa et une forte hydrophobicité. Ces protéines membranaires peuvent avoir de nombreuses topologies en fonction du nombre de segments transmembranaires et de leur positionnement le long de la séquence protéique (122).

II. 3. 2. b. Lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des protéines liées de manière covalente par une cystéine N-terminale à un lipide membranaire. Elles sont caractérisées par la présence d'un peptide signal spécifique contenant une séquence conservée nommée lipo-box. Celle-ci contient invariablement un résidu cystéine situé juste après le site de clivage du peptide signal (117). Après la translocation du précurseur prolipoprotéine, l'enzyme lipoprotéine diacylglycéril transférase (Lgt) ajoute le groupement diacyl glycéril d'un glycérophospholipide au groupement SH de la cystéine de la lipo-box (123). Le groupe diacylglycéril est inséré dans la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique, empêchant le relargage de la protéine dans le milieu extracellulaire. Une signal peptidase de type II clive alors le peptide signal, relâchant ainsi la protéine mature (118). La lipoprotéine est ensuite amino-acétylée sur le résidu N-terminal par une phospholipide/apolipoprotéine transacylase (Lnt) provoquant l'accrochage de la protéine aux acides gras à chaînes longues de la membrane (124).

Les lipoprotéines peuvent être impliquées dans une large gamme de fonctions physiologiques en tant que transporteurs, adhésines, récepteurs, enzymes ou facteurs de virulence (125).

II. 3. 2. c. Protéines ancrées dans la membrane

De nombreuses protéines sécrétées dans le milieu extra-cellulaire, possèdent un peptide signal de sécrétion. Celui-ci permet l'adressage et la translocation de la protéine à travers la membrane cytoplasmique. Ce peptide signal N-terminal est classiquement clivé, durant le processus de translocation par une signal peptidase, permettant la libération de la protéine dans le milieu extracellulaire. Certaines protéines, bien que possédant un peptide

signal de sécrétion, ne possèdent pas le site de clivage reconnu par la signal peptidase. Par conséquent, la protéine une fois transloquée du cytoplasme vers le périplasma reste accrochée à la membrane par le segment hydrophobe du peptide signal (117, 118, 126). De plus, certaines protéines possédant un peptide signal de sécrétion susceptible d'être clivé, contiennent aussi un domaine transmembranaire supplémentaire en position C-terminale qui peut fonctionner comme motif d'ancrage à la membrane (117).

II. 3. 3. Protéines liées de manière covalentes à la paroi

A ce jour, le seul mécanisme connu permettant une liaison covalente de protéines au PG des bactéries à Gram positif, requiert un motif carboxy terminal spécifique comportant une séquence LPXTG (ou X représente n'importe quel acide aminé) (94, 127). Pour pouvoir être ancrées au PG, ces protéines doivent comporter en tout quatre motifs caractéristiques (Figure 9) : un peptide signal de sécrétion, un motif d'ancrage de type LPXTG et une ancre hydrophobe suivie d'un domaine chargé positivement.

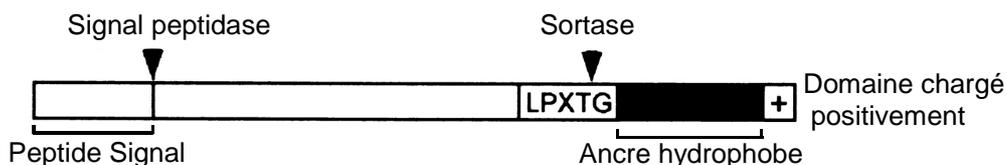


Figure 9 : Signaux d'export d'une protéine possédant un motif LPXTG.

Le modèle d'ancrage de protéines à la paroi peut être divisé en quatre étapes (i) le précurseur est exporté du cytoplasme grâce à son peptide signal de sécrétion (ii) pour prévenir la libération de la protéine dans le milieu extracellulaire, la protéine est retenue à la membrane par son domaine C-terminal hydrophobe chargé positivement (iii) la protéine est clivée entre la thréonine (T) et la glycine (G) du LPXTG par une transpeptidase membranaire responsable de l'ancrage des protéines : la sortase (iv) qui catalyse la transpeptidation entre le résidu thréonine et le groupement amine libre de la chaîne peptidique latérale du précurseur du PG (94, 128).

Bien qu'une grande majorité des motifs d'ancrage identifiés soient de type LPXTG, certaines protéines ayant une séquence différente du consensus LPXTG ont été identifiées. Ce type de protéines est souvent codé par des déterminants génétiques organisés en opéron

incluant un gène codant une sortase, suggérant ainsi que ces gènes interagissent en tant qu'enzyme et substrat (128).

II. 3. 4. Protéines liées de manière non covalente à la paroi

II. 3. 4. a. Unités répétées de liaison à la paroi

Certaines protéines possèdent des motifs – souvent répétés – leur permettant d'établir des liaisons faibles (non-covalentes) avec des éléments de la paroi (acides téichoïques, partie glycanique du PG ou encore des polymères secondaires) (129).

Chez *S. pneumoniae*, des études sur l'autolysine LytA ont révélé que le domaine C-terminal était responsable de la reconnaissance spécifique des résidus choline des acides téichoïques et lipotéichoïques (130). Ce domaine appelé CWBD1 (cell wall binding domain of type 1) est constitué d'éléments répétés d'environ 20 acides aminés chacun, dont le nombre varie de 1 à plus de 50 (124).

L'autolysine CwlB de *B. subtilis* (131) et l'adhésine Cwp66 de *Clostridium difficile* (132), partagent quand à elles une région N-terminale similaire composée de trois domaines répétés, responsable de leur liaison au PG. Ce domaine de liaison appelé CWBD2 est constitué d'éléments répétés d'environ 100 acides aminés chacun, dont le nombre varie généralement de 1 à 3.

Le motif LysM, qui tire son nom du fait qu'on le retrouve dans différentes autolysines bactériennes, permet la fixation des protéines directement sur le PG. Ce domaine est constitué d'éléments répétés d'environ 40 acides aminés chacun, dont le nombre varie généralement de 1 à 6 (133). On retrouve ce motif dans plus de 1500 protéines aussi bien chez les eucaryotes, les procaryotes que chez les *archae* (124).

Le motif GW a été identifié lors de l'étude de l'internaline B (InlB) de *L. monocytogenes*. Il permet une liaison non covalente à la surface cellulaire grâce à une liaison aux acides lipotéichoïques et est composé d'un motif répété d'environ 80 acides aminés contenant un dipeptide glycine(G)-tryptophane(W) donnant son nom à ce motif (134).

De plus, un nouveau motif de liaison à la paroi a été récemment mis en évidence chez *E. faecalis*. Ce motif nommé WxL (tryptophane-x-leucine) est composé de deux parties séparées d'environ 100 acides aminés contenant chacune un motif WxL conservé. Le ligand de ce motif semble être le PG (135).

II. 3. 4. b. Protéines du S-layer

A la surface de nombreux types d'organismes unicellulaires on retrouve une couche cristalline nommée "couche S" (S pour surface) ou S-layer (94). Cette couche est composée de sous-unités protéiques ou glycoprotéiques, recouvrant la totalité de la cellule et dont le poids moléculaire varie de 40 à 200 kDa (136). Bien que de nombreux rôles aient été attribués aux S-layer, leur fonction est encore relativement hypothétique et reste à élucider (137).

L'existence d'un domaine ciblant la paroi chez les protéines du S-layer a été montrée par Fujino (138) et Lupas (139) qui ont identifié un motif d'approximativement 55 acides aminés contenant 10 à 15 résidus conservés. Ce motif a été désigné domaine SLH (S-layer homology). Les domaines SLH composés habituellement de 1 à 3 modules sont considérés comme servant à adresser une protéine à la surface cellulaire et sont aussi retrouvés dans de nombreuses protéines associées à la surface cellulaire (112).

II. 4. Capsule

La capsule (CPS) désigne l'ensemble des polysaccharides attachés au PG par des liaisons ioniques ou covalentes. Cette structure, très répandue chez les bactéries, est bien souvent l'élément situé le plus en périphérie de la cellule. Elle joue ainsi un rôle d'interface entre la bactérie et l'environnement. Les CPS ne semblent pas indispensables à la survie des bactéries qui les produisent et ne paraissent pas non plus être utilisées comme source d'énergie (140). La capsule est pourtant d'un grand intérêt pour les cellules puisqu'elle est capable de les protéger contre la dessiccation et la prédation. Elle leur permet également d'adhérer à diverses surfaces (colonisation, formation de biofilm) et peut même leur conférer un certain pouvoir pathogène. Cependant, la capsule peut parfois conférer aux bactéries pathogènes la capacité d'être immunogènes en induisant la production d'anticorps lorsque celles-ci sont injectées dans un organisme (141).

II. 5. Les enzymes de dégradation du PG

Le métabolisme du PG est un processus dynamique puisque cette structure grandit et se divise en parfaite synchronisation avec la croissance et la division cellulaire. En outre, il est clairement établi que le PG est sujet à maturation, au renouvellement et au recyclage. Pour expliquer ces processus il est pressenti que les enzymes de clivage du PG exercent leurs fonctions en coordination avec les PBPs. En effet, une gamme étendue de différentes

hydrolases du PG existe pour presque toutes les liaisons covalentes (Figure 10). La chaîne polysaccharidique du PG est la cible de nombreuses hydrolases. La liaison β -1,4 entre les résidus NAM et NAG est clivée par le lysozyme et par les transglycosylases lytiques (LT). La liaison β -1,4 entre les résidus NAG et NAM est hydrolysée par des glucosaminidases et des amidases sont responsables du clivage de la liaison NAM-L-Ala (Figure 10). Les lysozymes et les transglycosylases lytiques clivent la même liaison mais génèrent différents produits de réaction. Tandis que les lysozymes catalysent une réaction hydrolytique, les LT clivent la liaison β -glycosidique par transglycosylation intra-moléculaire aboutissant à la formation d'acide 1,6-anhydromuramique. Le rôle de cette structure n'est pas connu mais il a été émis l'hypothèse que l'énergie de cette liaison pourrait être utilisée pour des réarrangements des chaînes de glycanes. De plus, l'anneau 1,6-anhydro peut aussi être considéré comme un produit spécifique de recyclage du PG (142).

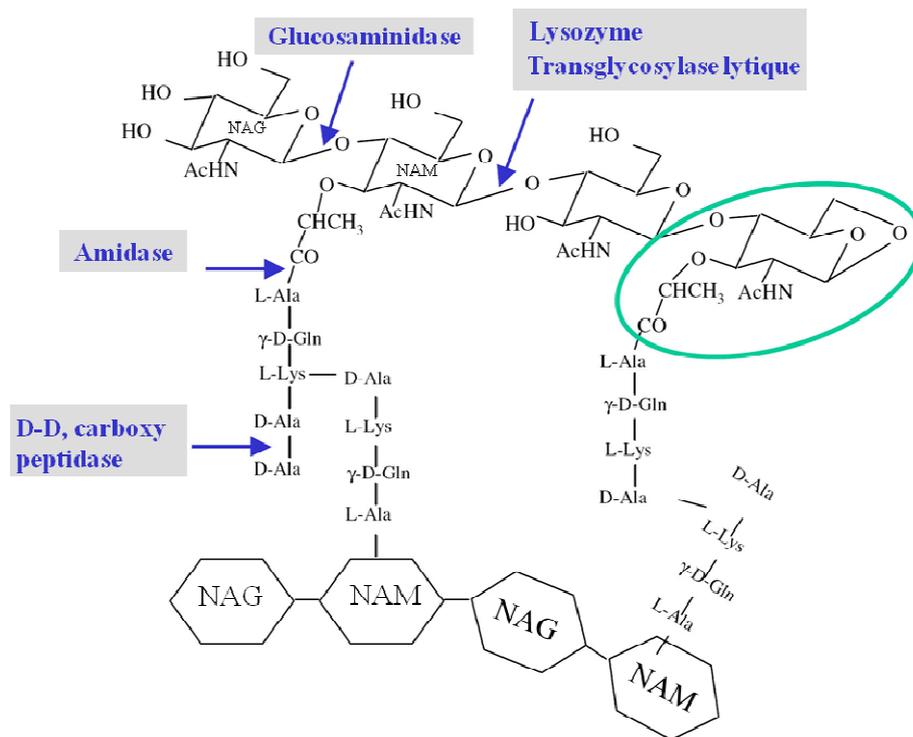


Figure 10 : Représentation du PG indiquant les liaisons chimiques clivées par les hydrolases.

Les hydrolases sont indiquées en bleu. Un résidu NAM contenant une liaison 1,6-anhydro résultant de l'action des transglycosylases lytiques est entouré en vert.

La dernière classe d'enzymes dégradant le PG est celle des endopeptidases qui coupent les liaisons au sein des chaînes peptidiques, les carboxypeptidases par exemple coupent le dernier ou l'avant dernier acide aminé de la chaîne peptidique.

Parmi les enzymes hydrolytiques du PG, sont nommées autolysines celles capables d'endommager l'intégrité du PG et par conséquent de provoquer une lyse bactérienne.

II. 5. 1. Rôle et régulation des autolysines

Le rôle des autolysines dans la physiologie bactérienne est multiple. Par leurs fonctions régulatrices sur la structure du PG, elles interviennent dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que l'assemblage et le recyclage du PG, la division cellulaire, la compétence, la formation de biofilm ou encore la virulence (pour revue, voir (143)).

De plus, les autolysines ont une activité finement contrôlée. Bien que celle-ci soit régulée au niveau transcriptionnel, en réponse aux variations des conditions environnementales (phase de croissance, présence d'antibiotique...) (143), elle l'est aussi au niveau post traductionnel. En effet, de nombreux facteurs interviennent sur leur activité tels que : la conformation du substrat (144), la modification du substrat (voir ci-dessous), la distribution des polymères secondaires (145) et l'environnement ionique (90).

Certains travaux ont également montré que les autolysines pouvaient aussi être régulées par des activités protéolytiques extracellulaires (146).

II. 5. 2. Sources exogènes d'hydrolases du PG

Il existe par ailleurs d'autres sources d'hydrolases du PG. En effet, bien que le PG soit une structure exclusivement retrouvée chez les bactéries, les autres organismes (animaux, végétaux, virus) ont développé pour plusieurs fonctions, la capacité de dégrader ce polymère.

Les virus infectant les bactéries (bactériophages) peuvent induire une lyse cellulaire par la production d'hydrolases phagiques du PG (endolysines).

Les plantes et les animaux, quant à eux, produisent des hydrolases du PG afin de se prémunir de l'attaque des pathogènes. L'hydrolase du PG la plus répandue et la plus étudiée est le lysozyme.

III. Le lysozyme

Le lysozyme est depuis 75 ans une protéine considérablement étudiée. Il sert d'enzyme modèle dans de nombreux domaines comme la chimie, l'enzymologie, la cristallographie, la génétique, la biologie moléculaire, l'immunologie et l'évolution. Malgré ces études, de nombreux aspects concernant le rôle biologique de cette molécule ne sont pas encore précisément connus.

III. 1. Les étapes importantes dans la découverte du lysozyme

Les livres de bactériologie de la fin du 19^{ème} siècle décrivent la culture de bactéries à l'intérieur d'œufs de poules. Laschtschenko, un professeur d'hygiène de l'université de Tomsk (Russie), se questionna sur la faisabilité de l'utilisation des oeufs pour la culture de microorganismes et découvrit ainsi, le pouvoir bactéricide du blanc d'œuf de poule dès 1909 et en a conclu que celui-ci contenait des enzymes à caractère bactériolytique (147).

Depuis 1900, de nombreux scientifiques ont décrit l'action antibactérienne de la salive et des sécrétions corporelles (148). Sir Alexander Fleming fit une découverte similaire en 1921. Tandis qu'il souffrait d'un rhume, une goutte coulant de son nez, tomba sur la surface d'un milieu gélosé contenant une culture bactérienne. Autour de cette goutte, les bactéries ont commencé à disparaître et Fleming a été le premier à conclure que les sécrétions nasales contenaient une substance lytique. Fleming a appelé cette substance "lysozyme".

Dans son premier article sur le lysozyme, Fleming décrit que l'enzyme est présente dans les sécrétions du corps humain telles que les larmes, les sécrétions nasales et la salive, dans les tissus du corps et spécialement dans le cartilage. Le lysozyme est, de plus, retrouvé chez les animaux, les tissus végétaux et dans de grandes proportions dans le blanc d'œuf (149). Le lysozyme de différentes origines montre des activités bactéricides différentes en fonction des microorganismes, Fleming en a conclu qu'il existait différents types de lysozymes (150).

Depuis sa découverte, le lysozyme et particulièrement le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL pour hen egg white lysozyme) sert de modèle pour de nombreuses études. En 1963, la structure primaire du HEWL a été publiée par deux groupes de recherche différents (151, 152). Ce fut la première enzyme séquencée comportant les 20 acides aminés classiques. Seulement deux ans plus tard, le HEWL a été la première enzyme dont la structure en trois dimensions a été élucidée (Figure 11) (153, 154). La molécule comprend 2 domaines, l'un constitué majoritairement d'hélices- α et l'autre montrant un profil de repliement

particulièrement complexe dans lequel l'arrangement de la chaîne protéique se fait en trois sections orientées de manière antiparallèle. Ce fut la première description d'un feuillet- β dans une protéine globulaire. De plus, le HEWL a été la première enzyme pour laquelle un mécanisme d'action détaillé a été proposé (155).

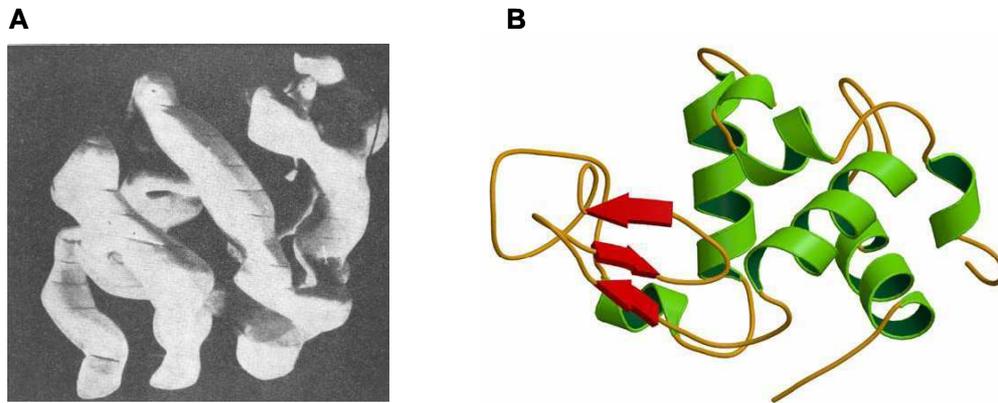


Figure 11 : Structure tridimensionnelle du lysozyme.

A) Modèle original de la structure du lysozyme à une résolution de 6 Å (153).

B) Représentation en ruban de la structure du lysozyme (154).

Près de 100 ans de recherche ont fait des lysozymes une des classes d'enzymes les mieux étudiées. A l'évidence, étant donné l'ampleur de la littérature sur ce thème, les lysozymes restent le sujet de nombreuses études en accord avec la prophétie de Fleming : "We shall hear more about lysozyme" (156).

III. 2. Le lysozyme dans le domaine de la santé publique et l'alimentation

Les résultats les plus probants sur l'utilisation du lysozyme dans des applications thérapeutiques ont émergé il y a plus de 40 ans lors d'un symposium sur le lysozyme (Third International Symposium on Lysozyme; Milan 1964). Les résultats exposés ont montré que le lysozyme était relativement efficace contre les infections bactériennes et virales et qu'il pouvait avoir un effet antalgique et anti-inflammatoire (157). Toutefois, il semble que de nos jours, l'utilisation du lysozyme dans l'industrie pharmaceutique soit assez anecdotique. Si l'on se réfère au dictionnaire Vidal, il existe sur le marché seulement 5 médicaments contenant du lysozyme (www.vidal.fr/substance/lysozyme-5852.htm). Ces médicaments sont tous utilisés pour le traitement de maux de gorge, d'aphtes ou de petites plaies buccales.

Le dosage du lysozyme, chez l'homme permet d'évaluer le degré d'activité (production et destruction) des lignées médullaires granulocytaires et monocytaires. Les taux sériques et

urinaires normaux sont compris entre 3 et 15 mg/l et les taux de lysozyme urinaire sont inférieurs à 2 mg/l. Ce dosage fait partie d'éléments de diagnostic de certaines maladies telles que des leucémies (158), certaines affections rénales (tubulopathie) (159) et il participe également à la surveillance de rejet de greffe d'organes (160).

En marge de cela, le lysozyme peut aussi être la cause de pathologies. En effet, une mutation sur le gène du lysozyme peut être à l'origine de la formation de dépôts d'amyloïde (amylose d'Ostertag). De part sa nature protéique, le lysozyme a des propriétés immunogènes et peut provoquer des allergies et des réactions anaphylactiques (161). Ce potentiel semblant être modéré, cette immunogénicité représente un problème mineur chez l'homme (162).

Quant à l'utilisation du lysozyme dans l'alimentation, il a été montré chez la souris et le rat, que la tolérance orale du lysozyme est de 4 g/kg (162). C'est suite à ces études que les autorités ont pu conclure que l'addition d'une faible quantité de lysozyme dans certains produits ne présentait pas de danger manifeste pour la santé humaine. En France l'utilisation du lysozyme dans l'industrie agroalimentaire est réservée à deux grandes filières que sont les technologies fromagère et viticole (163).

III. 3. Propriétés biochimiques du lysozyme

Le lysozyme est une protéine globulaire de 129 acides aminés (chez la poule). Elle se compose d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. L'activité enzymatique du lysozyme dépend évidemment, des facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la pression osmotique. Ces dépendances sont différentes pour chaque type de lysozyme. Cette enzyme est très stable dans une large gamme de température. Le lysozyme en poudre peut être conservé pendant de longues périodes (plus de 6 mois) à des températures supérieures à 30 °C sans perdre de son activité (164). Comme le HEWL comporte 4 ponts disulfures entre les cystéines 6-127, 30-115, 64-80 et 76-94, cette molécule est inhabituellement compacte et considérablement thermostable. Aucune perte d'activité n'est observée après un traitement de 3 min à 100 °C à pH 4,5 ou à 100 °C pendant 30 min à pH 5,3. Toutefois, après 30 min d'incubation à 70 °C et pH 7,9 ; il a été reporté une perte de 25 % de l'activité. La présence des ponts disulfure explique aussi la capacité du lysozyme à résister aux hautes pressions (163).

Le lysozyme fait aussi partie des rares enzymes ayant un goût sucré. Des expériences de mutagenèse dirigée ont d'ailleurs été effectuées afin de déterminer par quels mécanismes cette protéine active les récepteurs du goût (165).

III. 4. Découverte de différentes familles de lysozyme

Le lysozyme est très répandu dans la nature. Cette observation a été le point de départ de différentes études sur l'évolution du lysozyme et de la caractérisation de différentes familles de lysozymes. En 1932, Fleming fait l'observation que les lysozymes issus de différents tissus et sécrétions ont des capacités antibactériennes assez variables (150). De manière générale, le terme lysozyme est utilisé pour désigner le lysozyme de blanc d'œuf de poule, qui est en effet le représentant classique de ce type d'enzyme.

Avec le développement des études sur le lysozyme, il est vite devenu évident qu'il existait des types de lysozymes distincts de celui du blanc d'œuf de poule et d'autres types de lysozymes ont ainsi été découverts chez les oiseaux, les phages, les bactéries, les mycètes, les invertébrés et les plantes (166). A la suite de cela, les lysozymes ont été divisés en différents types : lysozymes de type-*c* (pour "chicken"), lysozymes de type-*g* (pour "goose"), lysozymes de type-*i* (pour "invertebrate"), lysozymes de type-*ch* (pour *Chalaropsis*), les lysozymes de plantes, les lysozymes bactériens et les lysozymes phagiques (167). Le lysozyme de blanc d'œuf de poule est associé aux lysozymes de type-*c*. Il est à noter que les lysozymes de type-*ch* (dont la mutanolysine) ont la capacité de cliver du PG modifié par *O*-acétylation alors qu'il n'est pas hydrolysé par les autres types de lysozyme.

Dans chacun des grands phylum dans lequel le lysozyme a été identifié, celui-ci peut jouer des rôles différents. Les génomes de bactériophages codent des lysozymes dont le rôle est de favoriser le relargage de virions par la lyse de la cellule hôte ou de faciliter l'infection (168). Les lysozymes bactériens jouent un rôle dans l'autolyse, l'élongation et la division cellulaire (169). Chez les végétaux, les lysozymes ont également une activité chitinase et auraient un rôle protecteur aussi bien contre les infections bactériennes que fongiques (170). Chez certains organismes (ruminants, insectes) du lysozyme est exprimé à différents endroits du tractus digestif. Ces enzymes auraient un rôle digestif et permettraient entre autre d'utiliser les bactéries comme source d'énergie, de phosphore et d'azote (171).

Les lysozymes diffèrent par leurs structures, leurs propriétés physicochimiques, et leurs critères immunologiques. Le seul critère commun à toutes ces enzymes est la capacité à cliver la liaison β -glycosidique entre le C-1 du NAM et le C-4 du NAG du PG.

III. 5. Mécanisme d'action du lysozyme

Comme indiqué ci-dessus, le lysozyme est une enzyme qui digère la paroi cellulaire des bactéries, en coupant le lien glycosidique $\beta(1-4)$ entre une molécule NAM et une molécule NAG, d'une chaîne de polysaccharides NAM-NAG. La coupure se fait entre le carbone 1 du NAM et le carbone 4 du NAG (Figure 12).

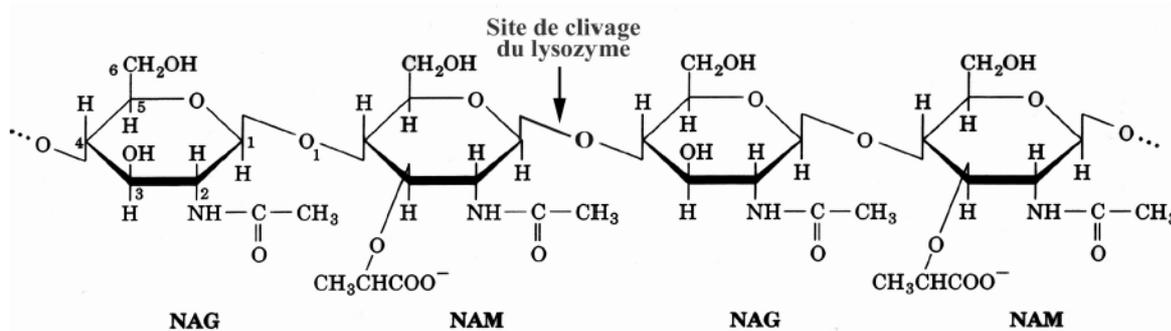


Figure 12 : Structure du PG et site de clivage du lysozyme.

Des lysozymes peuvent aussi couper des polysaccharides naturels (ex : chitine) ou synthétique (ex : poly NAG). En plus d'être la première enzyme dont la structure en 3 dimensions a été élucidée, le lysozyme est la première enzyme dont un mécanisme d'action a été proposé (155). Le mécanisme proposé par Philips a été largement reconnu comme un paradigme pour le clivage des substrats du lysozyme et ce n'est qu'en 2001 que ce mécanisme pris en exemple dans de nombreux ouvrages scolaires, a été corrigé en montrant l'existence d'un intermédiaire covalent substrat-enzyme (172).

Il y a 6 sites de liaisons nommés de A à F où se fixent les différents cycles glycosyles du substrat. Le site de coupure se situe entre les sites D et F (Figure 13). La Figure 14 montre la séquence réactionnelle menant au clivage du PG par le lysozyme. La molécule de PG se trouve associée avec le site de fixation de l'enzyme (binding site).

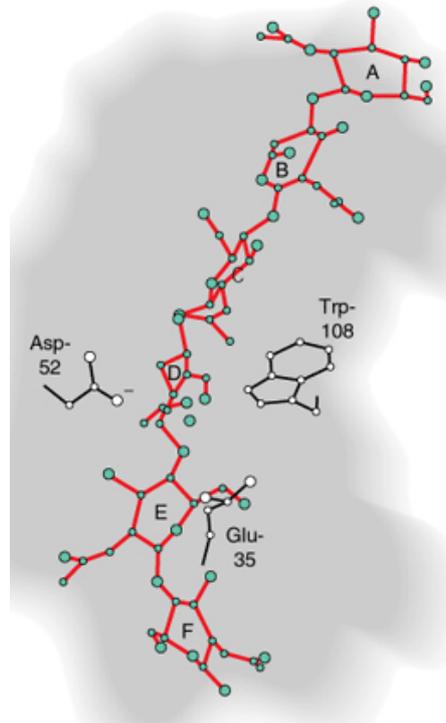


Figure 13 : Interaction du lysozyme avec le PG.

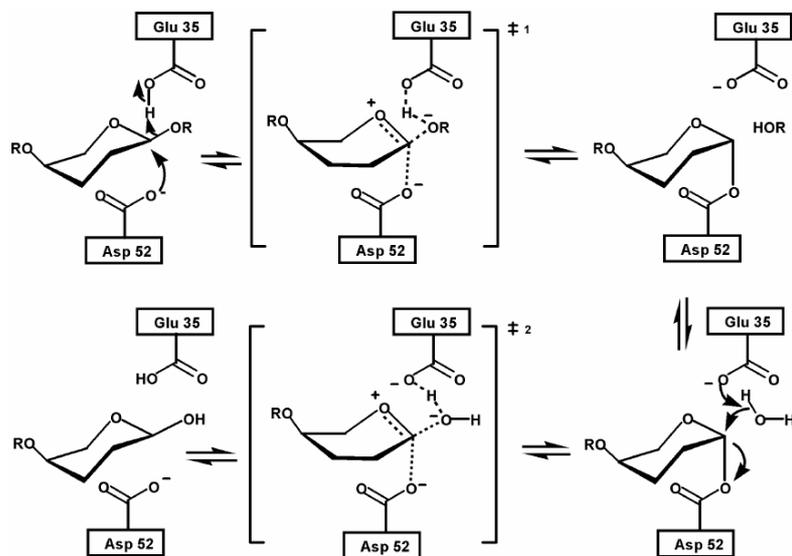


Figure 14 : Séquence de réaction de glycosyle hydrolase permettant une rétention de configuration anomérique (ex : lysozyme).

Un proton du résidu Glu 35 vient attaquer l'oxygène glycosidique menant au clivage de la liaison C1-O. L'ion oxocarbenium formé aboutit immédiatement à une liaison ester covalente avec une seconde chaîne carboxylate (l'Asp 52). La liaison ester est ensuite hydrolysée par une molécule d'eau. De par des effets d'encombrements stériques, l'attaque nucléophile peut uniquement se produire du côté β du centre anomérique, il en résulte une rétention de configuration anomérique (Figure 14).

Les lysozymes de divers organismes ne diffèrent pas uniquement par leur structure mais aussi par leurs mécanismes d'action. Tandis que les lysozymes de type *c* (dont le HEWL) conservent la configuration anomérique, les lysozymes de type *g*, *ch* et les lysozymes phagiques hydrolysent le substrat en inversant la configuration anomérique (173, 174). La liaison au substrat et l'activation des enzymes inversant la configuration est très similaire à celles gardant la conformation (Figure 15).

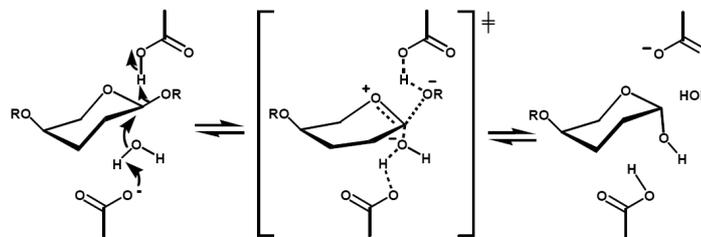


Figure 15 : Séquence de réaction de glycosyle hydrolase inversant la configuration anomérique.

Toutefois, le mécanisme réactionnel est très différent et n'implique pas d'intermédiaire covalent. La liaison glycosidique est clivée par un proton de l'acide carboxylique (Glu 73 pour le GEWL et Glu 11 pour T4L). Une molécule d'eau à proximité du carbone anomérique est activée par une liaison hydrogène au groupement carboxyle (Asp 20 pour T4L) qui sert de base catalytique. L'eau attaque le carbone anomérique du côté α par un simple mécanisme de déplacement résultant à une inversion de configuration (173).

Le mécanisme catalytique du lysozyme de type *Ch* est pour l'instant inconnu.

III. 6. Activité non enzymatique du lysozyme

En marge du mécanisme antibactérien bien connu, basé sur l'hydrolyse des chaînes du PG, deux modes d'action antibactériens non-enzymatiques (c'est à dire non catalytique et non hydrolytique) du lysozyme ont été proposés. En effet, de nombreux auteurs ont montré que la réduction ou l'élimination de l'activité enzymatique du lysozyme par des traitements

dénaturants (chaleur et dithiothréitol, DTT) ou par mutagenèse dirigée ne réduisait pas nécessairement l'activité bactéricide du lysozyme (163). Laible et Germaine (175) ont été les premiers à observer cet effet, en montrant que du lysozyme humain dont l'activité muramidase était inhibée par la réduction, à l'aide de dithiothréitol, des ponts disulfures essentiels à l'activité lytique, avait un potentiel bactéricide aussi important qu'un lysozyme humain natif (175). Ce mécanisme de lyse non-enzymatique provoqué par le lysozyme a aussi été démontré chez *S. aureus* (176) et chez *Listeria innocua* (177).

L'ensemble des études effectuées sur ce sujet suggère que le lysozyme peut entraîner une mort cellulaire par deux mécanismes différents. La première étape pour chacun de ces mécanismes consiste en l'attraction électrostatique du lysozyme chargé positivement par les acides teichoïques et lipoteichoïques et/ou les phospholipides de la surface cellulaire. Dans le mode d'action muramidase-indépendant, la mort cellulaire est le résultat soit de l'activation des autolysines (par interaction du lysozyme avec les acides teichoïques et/ou modification de la charge cationique membranaire) soit par une perturbation de la membrane cytoplasmique due aux caractéristiques intrinsèques de la protéine du lysozyme (pour revue, voir (163)).

Ainsi, depuis la découverte du deuxième mode d'action non lytique, du à ses propriétés cationiques, le lysozyme est de plus en plus considéré comme faisant partie intégrante de la classe des peptides cationiques antimicrobiens (cationic antimicrobial peptide, CAMP), dont font partie les défensines, les cathélicidines et les thrombocidines, qui sont des membres importants du système de défense immunitaire inné (178). Ce n'est que très récemment que les mécanismes bactériens de défense contre chacun de ces modes d'action ont été caractérisés chez *S. aureus* (179).

III. 7. Régulation de l'expression du lysozyme

Les différentes espèces ont développé divers mécanismes afin de réguler l'expression du lysozyme dans l'espace et le temps. Chez la poule, le gène du lysozyme se comporte de manière complètement différente dans les macrophages et l'oviducte (180). L'expression dans le macrophage est régulée par un activateur *cis*, tissu-spécifique et des éléments inhibiteurs ; son niveau d'expression est maximum quand les macrophages sont stimulés par des lipopolysaccharides bactériens (181). Dans l'oviducte l'expression du lysozyme est régulée par les hormones stéroïdes (182). Chez la souris, au lieu d'avoir un seul gène et deux mécanismes de régulation, le gène du lysozyme a subi un évènement de duplication

produisant deux gènes avec différents profils d'expression. Le premier lysozyme est exprimé dans les cellules de Paneth du petit intestin (où il contribue certainement à la digestion) et le second est exprimé dans les macrophages et les granulocytes (183).

III. 8. Mécanismes de résistance contre le lysozyme

Les bactéries ont co-évolué avec les effecteurs du système immunitaire de l'hôte, dont fait partie le lysozyme. Il n'est donc pas surprenant que certaines bactéries aient développé des systèmes de défense leur procurant un avantage sélectif sur les autres. La présence de tels mécanismes peut aider à comprendre les phénomènes de colonisations persistantes et/ou d'infections chroniques (178). Bien que le principe de ces modes de défense ait été proposé depuis de nombreuses années, ce n'est que depuis peu que les mécanismes moléculaires responsable de cette résistance commencent à être identifiés. De ces mécanismes de résistance, 3 catégories de fonctions ont été identifiées :

- l'inhibition de l'action lytique du lysozyme
- l'inhibition de l'action non lytique du lysozyme
- l'inactivation du lysozyme.

III. 8. 1. Inhibition de l'action lytique du lysozyme

Certaines bactéries produisent du PG résistant aux muramidases. Les principales modifications connues sont la *O*-acétylation du NAM et la dé-*N*-acétylation du NAG (Figure 16). Ces changements provoquent une modification du site de reconnaissance du lysozyme envers son substrat entraînant une réduction de son activité lytique.

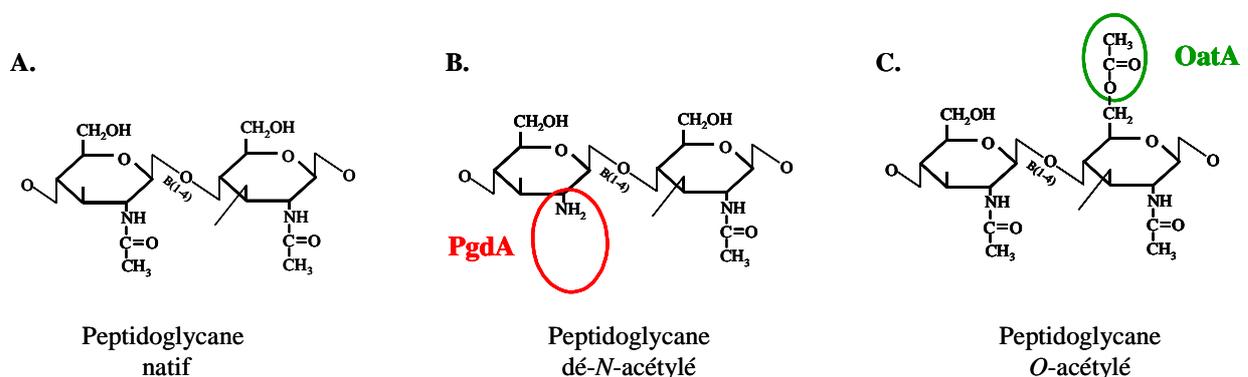


Figure 16 : Structure et modification du PG.

A. Structure du PG natif. B. Structure du PG dé-*N*-acétylé par l'enzyme PgdA. C. Structure du PG *O*-acétylé par l'enzyme OatA.

La *O*-acétylation du PG intervient au niveau du groupement hydroxyl du C6 du résidu NAM et provoque la formation d'un résidu 2,6-diacétylmuramyl (Figure 16). Cette modification prend place à l'extérieur de la membrane cytoplasmique après que le PG ait été assemblé (184). Cette modification a été décrite pour la première fois en 1958 indépendamment chez *Streptococcus faecalis* (185) et chez *Micrococcus luteus* (186). Depuis, la présence de PG *O*-acétylé a été observée chez de nombreuses bactéries (en 2000, 69 souches de 19 espèces différentes) aussi bien à Gram positif que négatif (187). Le taux naturel de *O*-acétylation varie de 10 à 70 % du nombre total de NAM (184).

La *O*-acétylation confère une protection contre l'action lytique des muramidases proportionnellement au taux de *O*-acétylation du PG (188). Il existe toutefois, certaines muramidases (comme la mutanolysine : *N,O*-diacétylmuramidase issue de *Streptomyces globisporus*) qui ne sont pas affectées par la présence de groupements *O*-acétyl (184). La résistance du PG *O*-acétylé aux muramidases représenterait un problème de santé publique puisque la présence de PG *O*-acétylé dans le système sanguin est à l'origine d'arthrites chroniques disparaissant après administration de mutanolysine (189).

En marge de son rôle dans la résistance au lysozyme, la *O*-acétylation a été identifiée comme intervenant dans d'autres mécanismes tels l'inactivation de certains antibiotiques (190, 191) et comme régulant l'activité d'autolysines (par modification chimique de leur substrat) en fonction de la phase de croissance ou de l'état physiologique (ex : état viable mais non cultivable) (142).

Plusieurs gènes responsables de cette modification ont été identifiés chez différentes bactéries, *aac(2')-Ia* chez *Providencia stuartii* (192), *oatA* chez *S. aureus* (193), *pacA* chez *Neisseria sp.*(191) et *adr* chez *S. pneumoniae* (191). Parmi ces 4 gènes, seuls *oatA* et *adr* partagent entre eux des homologies de séquence significatives.

Bien que plusieurs gènes soient identifiés dans le mécanisme de *O*-acétylation, la source du groupement acétylé n'est toujours pas identifiée. Il a été proposé en 1991 (194) que cette modification soit le produit d'un transfert d'acétylé *N*→*O* durant le recyclage du PG mais cette hypothèse n'a toujours pas été étayée.

La dé-*N*-acétylation du NAG est aussi une modification bien connue du PG. A notre connaissance, la description de cette modification remonte à 1971 (195). De même que la *O*-acétylation, la dé-*N*-acétylation intervient dans les mécanismes de résistance au lysozyme (196) par modification du substrat de l'enzyme. La dé-*N*-acétylation du NAG intervient en moyenne sur 17 % du total des muropeptides (163), ce qui suffit à conférer une résistance au lysozyme. En plus de conférer une résistance au lysozyme, le rôle physiologique proposé

pour cette modification est la régulation des hydrolases impliquées dans la synthèse et l'autolyse du PG (197). Une seule famille de gènes a été identifiée comme responsable de cette modification et nommé *pgdA* (pour peptidoglycane *N*-acétylglucosamine déacétylase A) (198). Ce gène a d'abord été identifié chez *S. pneumoniae* puis des homologues ont été caractérisés comme responsable de dé-*N*-acétylation chez plusieurs autres bactéries : *B. cereus*, *B. anthracis* (199), *L. monocytogenes* (200) et *L. lactis* (201). On peut aussi noter que la dé-*N*-acétylation du résidu NAM a été caractérisée chez *B. subtilis* (202, 203). Le gène à l'origine de cette dé-*N*-acétylation a été nommé *pdaA* mais cette modification n'a pas été identifiée comme conférant une résistance au lysozyme chez *B. subtilis*.

Des études récentes montrent que le PG et ses produits de dégradation feraient partie des éléments moléculaires associés à la présence de pathogènes qui sont reconnus par l'hôte grâce à des récepteurs intra-cellulaires du système immunitaire inné comme les protéines Nod et les récepteurs Toll-like (89, 204). Il a donc été proposé que la *O*-acétylation et la dé-*N*-acétylation constitueraient des mécanismes d'échappement, affectant la capacité de l'hôte à mettre en place une réponse immunitaire adaptée pendant l'infection. Ceci a récemment été confirmé puisque la dé-*N*-acétylation du PG a été caractérisée comme un mécanisme très efficace permettant d'échapper au système de défense immunitaire inné de l'hôte (200).

Une troisième modification de la structure du PG intervenant dans la résistance au lysozyme, la *N*-glycolylation de l'acide muramique, est rencontrée uniquement chez certaines mycobactéries et chez quelques bactéries apparentées (205).

III. 8. 2. Inactivation du lysozyme

Afin de se prémunir de l'action du lysozyme, certaines bactéries ont la capacité de produire des agents inhibant son action. A ce jour, seuls deux inhibiteurs protéiques ont été clairement identifiés. L'inhibiteur protéique du lysozyme le mieux caractérisé a été découvert récemment et "par hasard" chez *E. coli*. Quand le gène "orphelin" (gène possédant très peu d'homologie avec l'ensemble des gènes des banques de données) *ykfE* a été fusionné avec une queue poly-histidine puis surexprimé pour étudier la fonction de son produit protéique ; la protéine YfkE copurifia avec le lysozyme utilisé durant l'extraction pour lyser les cellules (206). YfkE a ensuite été caractérisée non seulement comme se fixant spécifiquement et fortement au lysozyme mais aussi comme inhibant son activité enzymatique. Etant donné que l'inhibition était spécifique des lysozymes de type c, *ykfE* a été renommé *ivy* pour "inhibitor

of vertebrate lysozyme" (206). Il a été montré ensuite que Ivy pouvait aussi inhiber le GEWL et le T4L (207). Ce fut le premier inhibiteur protéique du lysozyme caractérisé. Cette protéine homo-dimérique a une localisation périplasmique. La structure tridimensionnelle de la protéine Ivy a permis de révéler la présence d'une petite boucle de quelques acides aminés (type de repliement décrit pour la première fois) qui épouse d'une manière extrêmement spécifique le site actif du lysozyme (208).

Le second inhibiteur protéique décrit se nomme SIC (streptococcal inhibitor of complement) et a été caractérisé chez *S. pyogenes* (209). Cette protéine inhibe, le lysozyme mais également, l'activité antimicrobienne du complément, l'inhibiteur de protéase sécrété par les leucocytes et les β -défensines. (209, 210). Il a été montré que l'interaction entre SIC et le lysozyme était de nature ionique et qu'une protéine de SIC pouvait se lier approximativement à 4 molécules de lysozyme et pouvait provoquer sa précipitation dans le milieu (211).

III. 8. 3. Inhibition de l'action non lytique du lysozyme

Le mode d'action non lytique du lysozyme semble être provoqué soit par l'activation de l'autolyse bactérienne soit par la perturbation de la membrane plasmique. Dans ces deux cas, la première étape consiste en l'attraction électrostatique du lysozyme chargé positivement par les acides teichoïques et lipoteichoïques et/ou les phospholipides (chargés négativement) de la surface bactérienne. Les mécanismes de défense mis en place par les bactéries ont pour but d'empêcher cette attraction en modifiant la charge ionique pariétale (212).

Deux modifications des molécules anioniques ont à ce jour été identifiées comme conférant une résistance accrue aux CAMP : la D-alanylation des TA et l'ajout de L-lysine aux phosphatidylglycérol (Figure 17). Ces deux mécanismes ont été identifiés chez *S. aureus* et sont respectivement dus à l'opéron *dlt* (213) et au gène *mprF* (214).

Bien que l'absence de WTA chez *S. aureus* provoque une augmentation de la sensibilité au lysozyme il semblerait que l'élément lui conférant sa résistance soit plutôt la D-alanylation des WTA que les WTA eux-mêmes (215, 216).

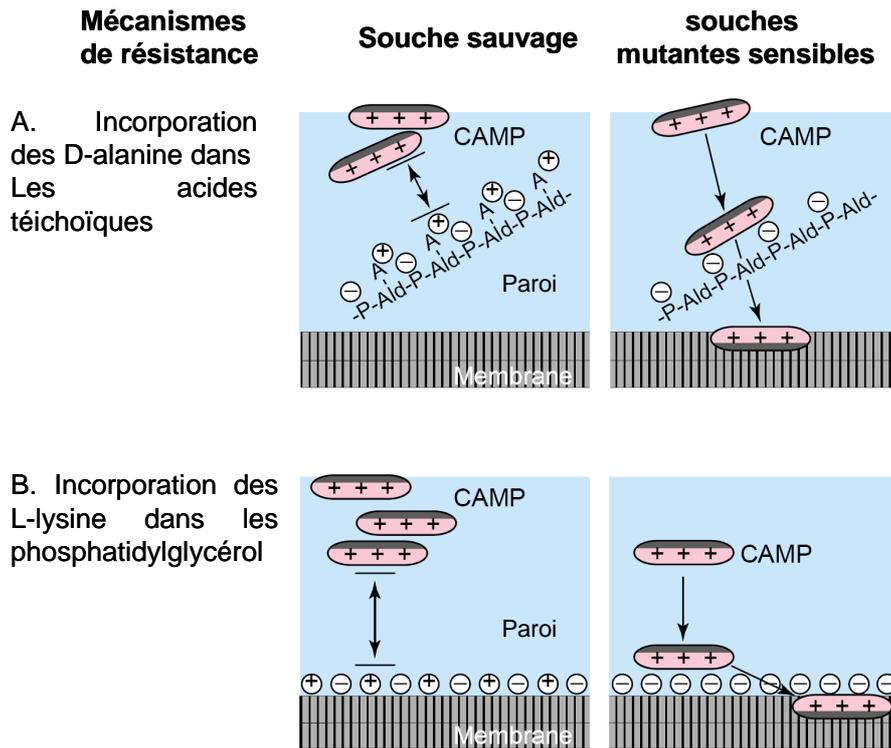


Figure 17 : Mécanisme proposé de résistance aux CAMP chez *S. aureus*.

Phénomènes intervenant dans une bactérie sauvage résistante aux CAMP (partie de gauche) et dans une bactérie mutante sensible aux CAMP (partie de droite). Les parties hydrophobe et chargée positivement sont respectivement indiquées en gris et en rose. Les molécules anioniques (A. acides téichoïques et B. phosphatidylglycérol) sont substituées avec des résidus chargés positivement, provoquant la répulsion des CAMP chez les bactéries sauvages. Les mutants ne présentant pas de D-alanine dans les TA (mutant *dlt*) (A.), ou de L-lysine dans leurs phosphatidylglycérol (B.) accumulent des molécules nocives. La paroi est représentée en bleu et la membrane cytoplasmique en gris. Ald-P : alditolphosphate.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches bactériennes, plasmides, oligonucléotides et conditions de culture

L'étude est réalisée principalement avec la souche *E. faecalis* JH2-2 (217) issue de l'isolat clinique *E. faecalis* JH2 (218) suite à l'action d'un mutagène chimique. Les caractéristiques des différentes souches bactériennes et des principaux mutants d'*E. faecalis* JH2-2 étudiés au cours de ce travail sont décrites dans le Tableau 2. La souche JH2-2 présente, en comparaison à la souche séquencée d'*E. faecalis* V583 (1), une meilleure aptitude à la transformation et une sensibilité à l'érythromycine, permettant l'utilisation d'une gamme d'outils moléculaires plus importante, cette souche est de plus dépourvue de plasmides.

La souche *E. coli* DH5 α est utilisée lors des étapes de clonage dans le vecteur d'expression pQE-30 (Qiagen). La souche *E. coli* M15 est utilisée pour la surproduction de protéine de fusion avec le système QIAexpress (Qiagen).

Lors d'expériences d' α -complémentation, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside (X-Gal) et l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) sont additionnés au milieu gélosé à des concentrations de 50 μ g/ml et 1 mM, respectivement.

Les milieux gélosés sont obtenus par l'ajout de 15 g/l de bactoagar dans les milieux liquides.

Les souches bactériennes sont conservées par congélation à -80 °C après addition dans le milieu de culture de glycérol à une concentration finale de 15 % (v/v).

L'ensemble des plasmides utilisés dans le cadre de cette étude est récapitulé dans le Tableau 3 et les différentes amorces et leur utilisation sont référencées dans le Tableau 4.

La croissance des différentes souches étudiées au cours de ce travail a été estimée par turbidimétrie par la mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) à l'aide du Biophotometer (Eppendorf) de suspensions bactériennes, obtenues en ensemençant à 1 %, 10 ml du milieu de culture adéquat à l'aide de cultures prises en phase stationnaires de croissance.

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude.

Souches bactériennes	Génotype et plasmides	Source ou référence
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
DH5 α (pQE31)	pQE31	Souche du laboratoire
M15	<i>recA⁺ uvr⁺ F⁺ mtl gal ara lac</i>	Qiagen
M15(pREP4)	pREP4	Qiagen
M15(pREP4 ; pQE31-EF1843)	pREP4 ; pQE31+EF1843	Cette étude
top10F'	<i>F'[lacIq Tn10 (Tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 <i>recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
top10F'(pMAD)	pMAD transformé dans la souche top10F'	(219)
top10F'(pMAD+ Δ EF1843)	pMAD+ Δ EF1843 transformé dans la souche top10F'	Cette étude
top10F'(pMAD+ Δ EF0783)	pMAD+ Δ EF0783 transformé dans la souche top10F'	Cette étude
top10F'(pUCB300)	pUCB300 transformé dans la souche top10F'	(220)
top10F'(pUCB300-EF2224)	pUCB300-EF2224 transformé dans la souche top10F'	Cette étude
top10F'(pUCB300-EF3054)	pUCB300-EF3054 transformé dans la souche top10F'	Cette étude
<i>E. faecalis</i>		
JH2-2	Fus ^R Rif ^R , souche dépourvue de plasmide	(218)
Δ EF2224	mutant insertionnel du gène EF2224 dans la souche JH2-2	Cette étude
Δ EF3054	mutant insertionnel du gène EF3054 dans la souche JH2-2	Cette étude
Δ EF1843	mutant de délétion du gène EF1843 dans la souche JH2-2	Cette étude
Δ EF0783	mutant de délétion du gène EF0783 dans la souche JH2-2	Cette étude
Δ EF1843- Δ EF0783	mutant de délétion des gènes Δ EF1843- Δ EF0783 dans la souche JH2-2	Cette étude
Δ sigV	mutant ponctuel du gène Δ sigV dans la souche JH2-2	(221)

Tableau 3 : Plasmides utilisés au cours de cette étude.

Plasmides	Description	Source ou référence
pUCB300		(220)
pUCB300-EF2224	pUCB300 + fragment interne du gène EF2224	Cette étude
pUCB300-EF3054	pUCB300 + fragment interne du gène EF3054	Cette étude
pQE31		Qiagen
pQE31+EF1843	pQE31 + ORF du gène EF1843 sans peptide signal	Cette étude
pMAD		(219)
pMAD+pgdA	pMAD + gène EF1843 avec parties amont et aval	Cette étude
pMAD+ Δ pgdA	pMAD + gène EF1843 délété	Cette étude
pMAD+EF0783	pMAD + gène EF0783 avec parties amont et aval	Cette étude
pMAD+ Δ EF0783	pMAD + gène EF0783 délété	Cette étude

Tableau 4 : Amorces utilisées au cours de ce travail.

Nom	Séquence (5'-3') ^a	Sites de restriction	Gène ou plasmide identifié	Commentaire
Pgd17	AAGTATAACGTCCACGCAACT		EF1843	Criblage de la présence des gènes dans des souche environnementales
Pgd9	CTTTAGTGCTGCAGTTGCTCTA			
LH50	TGAATCAGACAGCAAATAGCAAG		EF0783	
LH52	GCGCTTCAACTGCCAATGAC			
LH66	TATGCACGTCGTAGTCAACG		EF0590	
LH67	TTTCCTTACTGCGATCCCAG			Clonage du gène EF1843 dans le plasmide pQE31
Pgd19	CAACATTGACTGCAGACCAGAAAT	PstI	EF1843	
LH 20	ACAAGTAAAAAGGATCCTACTACGC	BamHI		
Pgd10	CAATTTAGAGGAATTCTAAAACTTC	EcoRI		
Pgd15	CTACTACAGTCGACAGAAATGC	SalI	EF1843	
Pgd14	GAATTTTATAGTCGACTGTCTGCG	SalI		Délétion du gène EF1843
Pgd18	GTATGGTGCGATGCCTTCTTGAT	SphI		
LH 21	TGTA AACCATGGCCAGTG	NcoI	EF1843	
LH 22	TACACTTATGGATCCGGCTCG	BamHI		
LH37	CAAACGAATTC AAGAGACTGACG	EcoRI		
LH38	CGCAACAAGTCGACAATAAGA	SalI	EF0783	Délétion du gène EF0783
LH39	AGTCAAGTCGACAAAAAATACG	SalI		
LH40	AAGCCGGGATCCCCTTGAGGG	BamHI		
LH41	TCGACCAGATTTAACTGTCCG		EF0783	
LH42	TTCCAGAAAAAGCACCCGC			
PU	GTA AACGACGGCCAGT		pUCB300	Vérification de la présence d'insert dans le plasmide pUCB300
PR	CAGGAAACAGCTATGAC			
EF2224A	AGATAAAGAGCTCGGTTTCG	SacI	EF2224	Clonage de EF2224 dans le pUCB300
EF2224B	CCTTTATATCTAGATGCACTC	XbaI		
LH11	TTAAGTGAAGAGCGAGGACC		EF2224	Vérification de l'interruption du gène EF2224
LH12	AGATTTGTTCCGTAAGCAGG			
EF3054A	ATGGCGCTCTAGACTGGTT	XbaI	EF3054	Clonage de EF3054 dans le pUCB300
EF3054B	TTTCTCTAAGCTTCCAATCTG	HindIII		
LH7	AAGTAGGGCTCTTTTTGTAGC		EF3054	Vérification de l'interruption du gène EF3054
LH8	CACTTCCAATAGGTGATTCC			
LH54	GCGATACCCAGGAGGTCATA		EF1843	Pour RT PCR Sybr® Green
LH55	ACCATCGCATTCCAGTCAAT			
LH56	ACCTTCGTGAAAAAGGGACA		EF0783	
LH57	GTTGCGCACTTTTAGCGTTT			
LH58	GTCGGCCAATTATGATTGATG		EF2678	
LH59	GCAATTCAGTTGTGCAACAT			EF3180 (sigV)
LH60	CGAAAGAAGATGCCTTGAT			
LH61	AAGAACCACGCTCAAAATC			
PgdA-1	CAACACTAAAGAAATACAAGCGGAAA			Amorces pour RT PCR TaqMan®
PgdA-2	ACTGTAGTAGGCTGTCTGTCTAAC		EF1843	
PgdA-Probe	FAM- CGCATCTCCAACCATCGCATTCCA-TAMRA			Sonde pour RT PCR TaqMan®

^a Les bases soulignées correspondent aux sites de restriction. FAM, 6-carboxyfluorescein ; TAMRA, 6-carboxy-*N,N,N,N*-tetramethylrhodamine.

II. Méthodes d'analyses physiologiques

II. 1. Tests de sensibilité au lysozyme

Après des essais préliminaires, nous avons retenu pour différencier les niveaux de sensibilité au lysozyme de mutants dérivant de la souche d'*E. faecalis* JH2-2 les conditions suivantes : les tests de sensibilité ont été effectués sur 3 ml de milieu Mueller Hinton agar (pH 7,4), contenant différentes concentrations de lysozyme (0, 5, 20, 40 et 60 mg/ml) et du tellurite de potassium à 0,8 µg/ml, disposé dans une plaque de culture compartimentée 5x5. Pour chaque souche, 10 µl d'une suspension bactérienne contenant 10⁶ cellules/ml ont été déposés sur les différents milieux. Les zones de croissance ont été observées après 48 h d'incubation à 37 °C. La différence de couleur observée entre la première colonne et les suivantes est due à la turbidité causée par la présence de lysozyme. Le tellurite de potassium a été ajouté afin d'accroître le contraste entre les colonies et le milieu. Les mêmes tests ont été conduits sur des milieux de cultures dépourvus de tellurite de potassium.

II. 2. Criblage d'une banque de mutants aléatoires d'*E. faecalis* vis-à-vis de la sensibilité au lysozyme

La banque de mutants insertionnels de la souche JH2-2 d'*E. faecalis* utilisée dans cette étude est celle décrite par Le Breton *et al.* (222). Brièvement, des fragments d'ADN chromosomiques de 0,2 à 1,5 kb générés par une digestion partielle par l'endonucléase *AluI* ont été clonés dans le plasmide pORI19 (dérivé de pWV01 Ori⁺ RepA⁺) dans la souche "helper" RepA⁺ d'*E. coli* EC101 (223) afin d'obtenir une banque d'environ 37200 plasmides recombinants. Un mélange de ces plasmides a ensuite été transformé dans une souche d'*E. faecalis* ayant préalablement reçu le vecteur pVE6007 (plasmide pG⁺host3 dérivé Ori⁺ RepA^{TS} du pWV01) (224). Les clones ont été incubés à 30 °C en milieu GM17 contenant de l'érythromycine et du chloramphénicol (la protéine thermosensible RepA^{TS} est active à 30 °C, permettant la réplication des plasmides recombinants pG⁺host3 et pORI19). Les cellules ont ensuite été transférées dans du milieu GM17 contenant de l'érythromycine et incubées à 42 °C afin d'inactiver la protéine RepA^{TS} et favorisant ainsi la perte du pG⁺host3 et l'intégration des plasmides pORI19 recombinants. 9 600 mutants intégratifs d'*E. faecalis* ont été repiqués sur microplaques 96 puits dans 200 µl de milieu GM17 contenant de l'érythromycine et cultivés à 37 °C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance.

La recherche de mutants affectés dans la capacité à résister à l'action du lysozyme a été faite en ensemençant, à l'aide des cultures précédentes, des boîtes de Petri contenant du milieu MH supplémenté de lysozyme à 20 mg/ml et en cultivant les mutants 16 h à 37 °C. La recherche de clones ayant perdu la capacité de se développer en présence de lysozyme a été effectuée visuellement.

II. 3. Survie en macrophages de souris

Les expériences de survie en macrophages ont été réalisées par l'équipe de M. Sanguinetti de l'Institut de Microbiologie, de l'Université Catholique du Sacré Cœur, à Rome.

La survie d'*E. faecalis* JH2-2 et des différents mutants en macrophages de péritoine de souris est estimée en utilisant un modèle d'infection *in vivo-in vitro* (37). Les différentes souches d'*E. faecalis* sont cultivées en aérobiose à 37 °C en milieu BHI pendant 16 h tandis qu'*E. coli* DH5 α (utilisée comme contrôle négatif) est cultivée en bouillon LB. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation et resuspendues dans un tampon phosphate pour injection. Des souris mâles de type BALB/c âgées de 10 semaines (Harlan Italy S.r.l., San Pietro al Natisone, Udine, Italy) sont infectées avec 10^7 à 10^8 cellules par injection intra-péritonéale. Après 6 h d'incubation, les macrophages sont collectés par lavage du péritoine, centrifugés, et repris dans un milieu « Dulbecco's modified Eagle's » (HEPES 10 mM, glutamine 2 mM, sérum foetal bovin 10 % et acides aminés non essentiels) supplémenté avec de la vancomycine (10 μ g/ml) et de la gentamicine (150 μ g/ml) afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. Les suspensions cellulaires sont réparties en boîtes de culture et incubées à 37 °C en présence de 5 % de CO₂ pendant 2 h. Puis, les macrophages sont lavés, et lysés par ajout d'un détergent. Après dilution en bouillon BHI, les lysats sontensemencés sur milieu BHI solide (agar) pour la quantification des bactéries intra-cellulaires viables. Cette procédure est réalisée 8, 24, 48 et 72 h après l'infection.

II. 4. Tests d'immobilisation en milieu semi-liquide

Les tests d'immobilisation ont été réalisés dans du milieu GM17 contenant 0,04 % d'agar (225, 226). Deux types d'ensemencement ont été réalisés, soit en surface, par dépôt d'une goutte de culture de nuit à la surface du milieu, soit en masse par ensemencement de 100 μ L d'une dilution 10^{-6} d'une culture de nuit. Les observations ont été effectuées à intervalles réguliers pendant 72 H.

II. 5. Tests de sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode de diffusion en gélose Mueller-Hinton avec des disques d'antibiotiques (Biorad).

Ces tests consistent à déposer à la surface d'une gélose Mueller-Hinton des disques de papier buvard imprégnés des différents antibiotiques testés. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose et détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance par rapport au disque. Avant de déposer les disques, on ensemence uniformément la surface de la gélose avec le micro-organisme à étudier. L'inoculum doit être dense (opacité équivalente à 0,5 sur l'échelle de Mac Farland). Après une incubation de 24 à 48 heures à 37 °C, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition dont le diamètre permet d'estimer et de comparer les concentrations minimales d'inhibition. Une batterie de 13 antibiotiques a été généralement utilisée : l'amoxicilline, l'ampicilline, la céfalotine, le chloramphénicol, l'érythromycine, la kanamycine, l'oxacilline, la pénicilline, la spiramycine, la streptomycine, les sulfamides, la tétracycline, et les triméthoprime-sulfamides

III. Méthodes de génétique et de biologie moléculaire

III. 1. Extraction des acides nucléiques

III. 1. 1. Extraction d'ADN plasmidique

Les préparations d'ADN plasmidiques à partir de souches d'*E. coli* ont été effectuées à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les préparations d'ADN plasmidiques à partir de souches d'*E. faecalis* ont été effectuées selon le même protocole modifié consistant à resuspendre le culot cellulaire dans la solution A1 contenant du lysozyme à 10 mg/ml, puis à effectuer une incubation de 90 min à 37 °C. De plus, en cas d'absence de lyse bactérienne après addition du tampon A2, 10 à 20 µl de SDS 20 % ont été ajoutés à la suspension bactérienne jusqu'à l'obtention d'une solution translucide. La suite du protocole est effectuée selon les recommandations du fournisseur.

III. 1. 2. Extraction d'ADN chromosomique

4 ml de culture à $DO_{600}=1$ sont centrifugés, resuspendus dans 500 µl de solution A1 (voir ci-dessus) additionnés de 10 mg/ml de lysozyme, puis placés au moins 10 min à 37 °C.

Après addition de 100 µl de SDS 20 %, le mélange est à nouveau placé 10 min à 37 °C. Le lysat brut est ensuite purifié par deux extractions successives dans un volume de phénol saturé par du tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM) (10-1, vol/vol) suivies d'une extraction au phénol/chloroforme (vol/vol), puis d'un lavage dans un volume de chloroforme. Les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol. Le mélange est centrifugé (10 min à 13000 rpm) et le culot d'ADN est séché, puis resuspendu dans 100 à 150 µl d'eau ultra pure.

Le degré de pureté de l'ADN est estimé par la mesure de la densité optique à 260 nm (maximum d'absorption de l'ADN) rapportée à celle mesurée à 280 nm (maximum d'absorption des protéines). Ce rapport doit être supérieur ou égal à 1,7 et inférieure à 2 (227). Si tel est le cas, la concentration de l'ADN peut être alors évaluée puisqu'une densité optique de 1 à 260 nm correspond à 50 µg d'ADN par ml.

III. 1. 3. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux de cultures d'*E. faecalis* ont été isolés dans différentes conditions de croissance à l'aide du kit « RNeasy Midi Kit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur, à l'exception des modifications suivantes : les cellules d'une culture de 100 ml sont récupérées par centrifugation (5 min à 4000 ×g) et lysées à l'aide de billes de verre (diamètre de 0,1 à 0,25 mm) en vortexant deux fois 1 min.

La quantité d'ARN est normalisée et l'absence de dégradation est vérifiée grâce à la station d'électrophorèse automatique Experion suivant les recommandations du fournisseur (Bio-Rad). L'absence de contamination par les ADN est contrôlée par PCR.

III. 2. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions d'amplification d'ADN par PCR sont réalisées à l'aide du thermocycleur Mastercycler Personal (Eppendorf). Les amplifications sont majoritairement effectuées en utilisant la *Taq* ADN-polymérase du Mastermix Eppendorf (2,5 X) alors que celles concernant de long fragments d'ADN (> 5 kb) ou nécessitant une haute fidélité de l'activité polymérase sont réalisées avec le TripleMaster PCR System Eppendorf selon les recommandations du fournisseur.

Le programme d'amplification utilisé est adapté à chaque PCR en fonction de la température d'appariement des oligonucléotides déterminée par le fournisseur (Operon) ainsi

que de la taille des fragments à amplifier. Celui-ci débute par une étape de dénaturation puis se déroule généralement sur 30 cycles.

Les produits PCR sont purifiés, lorsque cela est nécessaire, à l'aide du kit « QIAquick PCR Purification Kit » (Qiagen).

Pour les réactions de « PCR sur colonies », l'ADN matrice est remplacé par 1 µl d'un lysat cellulaire obtenu après rupture aux billes de verre d'une colonie dans 50 µl d'eau.

III. 3. Réaction de PCR Quantitative en temps réel

III. 3. 1. PCR quantitative en temps réel à partir de matrices issues de cultures bactériennes

Les oligonucléotides spécifiques ont été définis en utilisant le logiciel primer3 (disponible sur le site http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) selon les critères suivants :

Taille du fragment PCR : 99-101 pb

Taille de l'amorce : 19 à 21 nucléotides

Tm des amorces : 59 à 61 °C

Les ARN extraits sont traités à la DNase à l'aide du kit « DNA-free » (Ambion, Austin, TX, USA). 2 µg d'ARN sont placés 3 min à 70 °C puis 10 min à 4 °C. Après ajout de 2 µl de tampon DNase 10 X, 2 µl de DNase et 0,2 µl d'inhibiteur RNAsine (Amersham Biosciences), le mélange est incubé 1 h à 37 °C. Puis 10 µl d'inactivateur sont ajoutés, le mélange est laissé 2 min à température ambiante, centrifugé 1 min à 10000 rpm puis le surnageant est récupéré. L'ADNc total est synthétisé à partir de 2 µg d'ARN ainsi traité en utilisant l'enzyme transcriptase inverse du kit « Omniscript RT » suivant le protocole indiqué par le fournisseur (Qiagen) et des amorces hexamériques aléatoires (concentration finale 1 µM) (Amersham Biosciences). 5 µl d'une dilution au 1/100^{ème} d'ADNc sont utilisés comme matrice pour la PCR avec les oligonucléotides appropriés (concentration finale 1 µM) et le mélange « quantiTect SYBR Green PCR » (Qiagen). La fluorescence est étalonnée à partir d'un fluorochrome passif (fluoresceine) inclus dans chaque réaction. Afin de détecter une éventuelle contamination des préparations d'ARN par de l'ADN génomique résiduel, des réactions sont réalisées dans les mêmes conditions mais sans l'enzyme transcriptase inverse. La quantification des ARN 23S est réalisée pour standardiser les mesures. L'amplification, la

détection et l'analyse en temps réel sont répétées 2 à 3 fois et sur plusieurs échantillons d'ARN différents à l'aide du système « BioRad iCycler iQ » (Biorad).

La valeur utilisée pour comparer l'expression d'un gène chez les diverses souches et les différentes conditions testées est le nombre de cycles PCR nécessaire pour atteindre le seuil fixé de détection de fluorescence ($Ct = \text{threshold cycle}$ ou cycle seuil). Afin de relier ces données à l'abondance d'un ARNm, les valeurs de Ct obtenues chez les souches mutantes stressées ou non sont comparées avec celles de la souche sauvage ou des conditions témoins, et converties en « nombre de fois » où le gène est induit ou réprimé. La différence de « n fois » est calculée grâce à la formule suivante : $(n = (E_{23S}^{Ct_{23S}(WT)} / E_X^{Ct_X(WT)}) / (E_{23S}^{Ct_{23S}(\text{mutant})} / E_X^{Ct_X(\text{mutant})}))$, où E_{23S} et E_X représentent l'efficacité de la PCR (facteur par lequel le nombre de copies du gène correspondant [ARNr 23S ou gène X à analyser] augmente à chaque cycle et Ct le cycle seuil correspondant déterminé dans les conditions témoins ou dans celles testées). Les valeurs pour chaque gène analysé sont comparées à celles obtenues pour le gène *npr* (codant le gène de la NADH peroxydase) et/ou pour le gène *gyrA* (codant la sous-unité A de l'ADN gyrase) par analyses statistiques réalisées en utilisant le test de Student.

III. 3. 2. PCR quantitative en temps réel à partir de matrices issues de bactéries isolées de macrophages

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cultures en phase exponentielle de croissance à l'aide du kit RNeasy Protect Mini kit (Qiagen) après avoir resuspendu les cellules dans la solution RNeasy Lysis Buffer, comme précédemment décrit (228). L'expression du gène EF1843 a été quantitativement évaluée par RT-PCR en temps réel sur un thermocycleur iCycler iQ system (Bio-Rad) en utilisant le gène *rpoB* en tant que gène de référence (229). Pour chaque gène un couple d'amorce et une sonde TaqMan® (Tableau 4) ont été dessinés par le logiciel Beacon Designer 2 (version 2.06) (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA). Les amorces et la sonde utilisées pour le gène *rpoB* ont été décrites précédemment (229). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume de 50 µl contenant les réactifs suivants : 25 µl de mix de réaction Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript (Invitrogen), 1,5 U de mix ThermoScript Plus/Platinum *Taq* (Invitrogen), chaque amorce et la sonde Taqman® sont ajoutées à la concentration de 0,5 µM, 5 µl d'échantillon d'ARN, le volume est complété par de l'eau distillée. Les échantillons sont d'abord incubés 45 min à 52 °C pour la RT puis 5 min 94 °C pour inactiver la transcriptase inverse ThermoScript Plus

et pour activer la *Taq* polymérase Platinum, ces étapes sont suivies par 50 cycles consistant en 15 s à 94 °C et 1 min à 59 °C. Les mesures de fluorescence sont collectées pendant la phase d'hybridation/élongation et analysées avec le logiciel iCycler iQ®. Chaque réaction a été effectuée en quadruplicate et l'efficacité des amorces a été déterminée pour chaque gène. Le niveau d'expression relatif des gènes cibles de chaque échantillon a été calculé par la comparaison des C_t (230).

III. 4. Digestion par les endonucléases de restriction, déphosphorylations et ligatures

Les endonucléases de restriction sont fournies par Amersham Biosciences et Roche Applied Sciences et sont utilisées à raison de 1 à 2 Unités d'enzyme pour 1 à 2 µg d'ADN à digérer, dans un volume final de 20 µL. Les conditions d'utilisation de ces enzymes (tampon et température d'incubation) sont celles préconisées par les fournisseurs.

Pour limiter la recircularisation des vecteurs au cours des étapes de clonage, les vecteurs digérés par une seule enzyme de restriction sont déphosphorylés en employant la phosphatase alcaline de crevette ou SAP (pour *shrimp alkaline phosphatase*) (Roche Applied Sciences) selon les recommandations du fournisseur.

La réaction de ligature est effectuée en présence de 100 ng d'ADN plasmidique éventuellement déphosphorylé et de quatre fois plus de fragments à insérer. La quantification de l'ADN est effectuée sur gel d'agarose par comparaison à des quantités connues de marqueurs de poids moléculaire. Par la suite, les fragments et les plasmides sont mis en présence de 2 µl du tampon de ligature, de 1 µl de ligase provenant du bactériophage T4 et d'eau distillée stérile pour un volume total de 20 µl. La réaction est effectuée durant 4 heures à 16 °C ou bien 16 h à 4 °C. Finalement, 1 µl de cette réaction est utilisé pour transformer la souche bactérienne voulue.

III. 5. Séquençage de l'ADN

Les réactions de séquençage sont effectuées suivant une méthode dérivée de celle décrite par Sanger *et al.* (231) à l'aide du kit « CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing-Quick Start Kit » (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) selon les instructions du fournisseur. L'analyse des fragments synthétisés est effectuée à l'aide d'un séquenceur automatique CEQ 8000 (Beckman Coulter) au Centre Hospitalier Régional de Caen. Les

séquences obtenues sont analysées grâce au logiciel Ceq Sequencing (Ceq8000, Genetic Analysis System, Beckman Coulter).

III. 6. Préparation et transformation des cellules électrocompétentes d'*E. coli* et d'*E. faecalis*

Les expériences de transformation des cellules sont réalisées par électroporation selon les méthodes décrites par Dower *et al.* (232) pour *E. coli* et par Holo et Nes (233) pour *E. faecalis*.

Brièvement, les cellules électrocompétentes d'*E. coli* sont obtenues en inoculant 1 l de bouillon LB à 1 % à l'aide d'une culture saturée, puis en incubant sous forte agitation à 37 °C jusqu'à obtention d'une densité optique à 600 nm comprise entre 0,5 et 1 (environ 3 h 30 min d'incubation). La suspension bactérienne obtenue est alors refroidie 15 min sur glace, puis centrifugée 15 min à 4000 ×g. Les cellules sont lavées par un litre, puis par 0,5 l d'eau ultra-pure froide stérile, et enfin par 20 ml d'une solution de glycérol 10 %. Elles sont ensuite resuspendues dans 2,5 ml de glycérol 10 %, et réparties en fractions de 40 µl avant d'être stockées à -80 °C.

La préparation des cellules électrocompétentes d'*E. faecalis* est réalisée comme suit : 100 ml de bouillon GM17 contenant 0,2 M de saccharose et 2 % de glycine sont inoculés avec 10 ml d'une culture de nuit d'*E. faecalis*. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont récupérées par centrifugation à 6000 ×g 10 min à 4 °C. Elles sont lavées deux fois par 100 ml d'une solution stérile froide de saccharose 0,5 M, glycérol 10 %, puis resuspendues dans 500 µl de cette même solution. Ces bactéries sont aliquotées par fractions de 100 µl avant d'être stockées à -80 °C.

La transformation proprement dite est réalisée à l'aide d'un appareil Gene Pulser (Bio-Rad). Pour ce faire, 1 µl de la solution d'ADN est mélangé à une fraction de cellules électrocompétentes (40 µl pour *E. coli* ; 100 µl pour *E. faecalis*). Le mélange est maintenu 5 min sur glace dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm avant de réaliser le choc électrique. Les paramètres de ce choc sont :

- pour *E. coli* : tension de 2,5 kV, capacité de 25 µF, résistance de 200 Ω
- pour *E. faecalis* : tension de 2,5 kV, capacité de 25 µF, résistance de 400 Ω.

Immédiatement après le choc électrique, les cellules d'*E. coli* sont reprises dans 1 ml de milieu LB puis mises en culture d'expression pendant au moins 30 min à 37 °C ; tandis que

les cellules d'*E. faecalis* sont reprises dans 1 ml de milieu GM17 supplémenté en saccharose 0,5 M, MgCl₂ 20 mM, CaCl₂ 2 mM, puis incubées 1 h 30 à 30 °C ou à 37 °C. Les cellules transformées sont ensuite étalées sur les milieux gélosés appropriés.

III. 7. Mutagenèse chez *E. faecalis*

III. 7. 1. Mutagenèse dirigée par simple recombinaison homologue

Nous avons effectué une mutagenèse dirigée des gènes EF2224 et EF3054 par simple crossing-over à l'aide du plasmide pUCB300 (220). Ce plasmide est répliatif chez *E. coli* et intégratif chez *E. faecalis*. Nous avons tout d'abord amplifié par PCR un fragment interne de chacun des gènes, puis après digestion, ceux-ci ont été clonés dans les sites de restriction correspondant du vecteur pUCB300. Les plasmides recombinants ont servi à transformer les cellules compétentes de la souche JH2-2. Les mutants ont été sélectionnés en présence d'érythromycine pendant 48 h puis l'insertion du plasmide au sein de chaque gène a été vérifiée par PCR. Afin de maintenir l'intégration du plasmide, les cultures de ces souches ont été effectuées en présence d'antibiotique.

III. 7. 2. Mutagenèse dirigée par double recombinaison homologue

Les expériences de mutagenèse par double crossing-over ont été réalisées en employant le plasmide pMAD (219). Ce plasmide présente l'avantage d'avoir une répliation thermosensible chez les bactéries à Gram positif et de posséder un gène codant une β -galactosidase sous la dépendance d'un promoteur constitutif permettant une sélection histochimique des transformants. Les constructions correspondant aux parties amont et aval (environ 900 pb chacune) de chaque gène délété de la majeure partie de sa séquence codante ont été clonées dans le vecteur pMAD comme le montre la Figure 18.

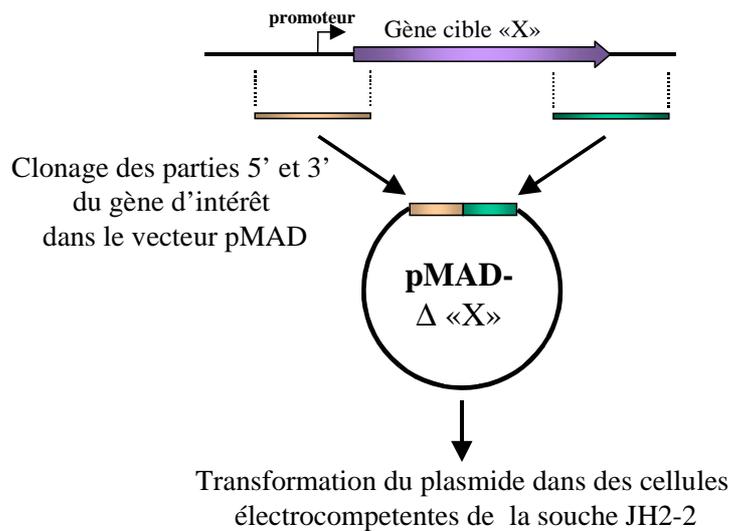


Figure 18 : Schéma de la construction de mutants à l'aide du plasmide pMAD.

Les plasmides recombinants (pMAD «X») ont été utilisés pour transformer des cellules électrocompétentes de la souche JH2-2 d'*E. faecalis*. Par sélection histochimique nous avons pu isoler quelques clones mutants dont les gènes délétés ont été substitués aux copies sauvages sur le chromosome par un événement de double recombinaison homologue (219). Une fois le mutant Δ EF1843 obtenu la procédure a été reconduite pour déléter le gène EF0783 dans cette même souche afin d'obtenir le double mutant Δ EF1843/ Δ EF0783. La confirmation de la délétion des gènes ciblés chez les différents mutants construits a été effectuée par PCR en utilisant des amorces spécifiques de chaque gène.

IV. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV. 1. Extraction des protéines totales

Un culot cellulaire issu de 200 ml de culture d'*E. faecalis* à $DO_{600} = 0,5$ est lavé deux fois avec 20 ml de tampon de lavage (50 mM Tris-HCl (pH 7,5) ; 1 mM EDTA ; 1 mM β -mercaptoéthanol; 0,14 mM PMSF; 0,01 % Chloramphénicol), puis repris dans 500 μ l de ce même tampon. La lyse cellulaire est réalisée en agitant vigoureusement (2 x 5 min au vortex) en présence de 500 mg de billes de verre. Après centrifugation du mélange (10 min à 16000 g, 4 °C), le surnageant est prélevé et 4 volumes d'acétone contenant 10 % de TCA lui sont

ajoutés. Ce mélange est alors vortexé et centrifugé (3 min à 16000 g, 4 °C), le culot est ensuite lavé et centrifugé (3 min à 16000 g, 4 °C) successivement dans 1,75 ml de méthanol contenant 1,75 ml d'acétate puis dans 1,75 ml d'acétone 80 %. Le culot résultant est alors séché et repris par un mélange phénol pH 7,9/tampon SDS (30% Saccharose ; 2 % SDS ; 0,1 M Tris-HCl; β -mercaptoethanol). Après incubation 5 min à température ambiante et centrifugation, les protéines sont extraites par transfert de la phase phénolique dans un nouveau tube Eppendorf. Ce tube est complété avec du méthanol contenant 0,1 M d'acétate et mis à incuber 16 h à -20 °C puis centrifugé (3 min à 16000 g, 4 °C). Le culot est lavé une fois avec du méthanol 100 % et une fois avec de l'acétone 80 %. Durant chaque étape de lavage, le mélange est vortexé et centrifugé comme précédemment. Enfin, le culot est séché puis repris dans 200 μ l de tampon de réhydratation (5 M Urée ; 2 M Thiourée ; 2 % CHAPS ; 2 % SB 3-10 [caprylyl sulfobetaine] ; 20 mM DTT; 5 mM TCEP; 2 % IPG buffer).

IV. 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines des extraits bruts et purifiés sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Cette électrophorèse a été réalisée dans des gels de dimensions 12×8 cm dans une cuve "mini-Protean IV" (Biorad, Hercules, California, USA). La concentration en acrylamide est de 4 % pour le gel de concentration et de 12 % pour le gel de séparation (Tableau 5 et Tableau 6). L'électrophorèse s'effectue dans un tampon composé de Tris (25 mM), de SDS (34,7 mM) et de glycine (192 mM). La migration est réalisée à 80 V pendant 2 heures. L'échantillon est obtenu en mélangeant 20 μ l de la solution de protéines et 5 μ l de tampon Laemmli 5 X (Tris-HCl 10 mM ; Glycérol 3 % ; SDS 6 % ; β -mercaptoéthanol 2,4 mM ; bleu de bromophénol 0,8 % ; pH 6,8) (234).

Tableau 5 : Composition des gels de séparation SDS-PAGE 12 %.

Acrylamide 30 % (0,65 % bis) (Duracryl)	12 %
Tris base	250 mM
Eau ultra-pure	QSP 1 L
SDS	3,5 mM
APS	1,1 mM
TEMED	60 μ M

Tableau 6 : Composition des gels de concentration SDS-PAGE 4 %.

Acrylamide 30 % (0,65 % bis) (Duracryl)	4 %
Tris base	375 mM
Eau ultra-pure	QSP 1 L
SDS	3,5 mM
APS	2,2 mM
TEMED	120 μ M

IV. 3. Electrophorèse bidimensionnelle

Les protéines sont séparées selon une première migration (1^{ère} dimension) correspondant à une isoélectrofocalisation au cours de laquelle chaque protéine migre en fonction de son point isoélectrique (pI), puis une deuxième migration (2^{ème} dimension) correspondant à une électrophorèse SDS-PAGE séparant les peptides en fonction de leur masse moléculaire.

L'isoélectrofocalisation est réalisée en bandes de gradient de pH immobilisé (ou *strips*) « Immobiline DryStrip » (Amersham Biosciences) (longueur 18 cm ; gradient de pH 4-7) en utilisant le système « Protean IEF Cell » (Bio-Rad Laboratories) et en suivant les recommandations du fournisseur.

La 2^{ème} dimension est réalisée en gel (Duracryl 14 % ; Tris-Base 250 mM ; SDS 0,1 %) (26 cm \times 24 cm \times 6 mm) en tampon de migration à l'aide de l'appareillage « Millopor Investigator 2D Electrophoresis System » (Millipore). La migration se fait sous 1 W pendant 24 h.

IV. 4. Révélation par coloration au bleu de Coomassie

Les gels d'électrophorèse sont incubés pendant 1 h dans un bain colorant à 0,25 % (m/v) de bleu de Coomassie R250 préparé dans une solution [éthanol 50 % (v/v) ; acide acétique 7 % (v/v)]. Les gels sont ensuite décolorés par plusieurs bains successifs dans une solution [éthanol 40 % (v/v) ; acide acétique 7 % (v/v)].

IV. 5. Révélation par coloration au bleu Colloïdal

Le gel est immergé dans différents bains successifs : 3 \times 30 min dans une solution contenant 30 % (v/v) d'éthanol et 2 % (v/v) d'acide phosphorique; 3 \times 20 min dans une solution d'acide phosphorique 2 % ; puis 30 min dans une solution d'équilibration contenant 18 % d'éthanol, 2 % d'acide phosphorique et 15 % (m/v) de sulfate d'ammonium. La

coloration est ensuite effectuée pendant au moins 24 h dans une solution contenant 18 % d'éthanol, 2 % d'acide phosphorique, 15 % de sulfate d'ammonium et 0,2 g/l de Bleu Brillant G250 (235).

IV. 6. Spectrométrie de masse

Les spots protéiques d'intérêt sont excisés du gel et rincés 2 fois dans de l'eau ultra pure, puis déshydratés 10 min dans de l'acétonitrile (Sigma, St Louis, MO, USA,). Les échantillons sont séchés 30 min sous vide et réhydratés pendant 1 h avec 2 µl de NH₄HCO₃ 50 mM contenant 1 µg de trypsine. 20 µl de bicarbonate d'ammonium sont ensuite ajoutés et la digestion est poursuivie pendant 16 h. Après centrifugation 5 min à 3000 rpm, le surnageant est récupéré, et les morceaux de gel sont placés successivement dans 20 µl de bicarbonate d'ammonium/acétonitrile 20 mM (1:1), puis 2 fois dans 20 µl d'acide formique/acétonitrile (1:1), et dans 20 µl d'acétonitrile. Les échantillons sont centrifugés entre chaque étape, et les surnageants sont récupérés et réunis, séchés et resuspendus dans 10 µl d'acide formique à 0,1%. Les peptides sont analysés par un spectromètre de masse intégrant une source électrospray (ESI) avec une trappe d'ions (LCQ DECA XP, Thermo Electron Corporation, www.thermo.com), couplé avec une HPLC (Surveyor LC, Thermo). Les peptides sont séparés par HPLC sur une colonne capillaire C8 (HyPurity C8, 150 x 0,5 mm, Thermo), comme décrit par Sauvageot *et al.* (236). Les spectres MS/MS sont comparés à la fragmentation théorique de la base de données de la séquence du génome de la souche V583 d'*E. faecalis* (1), disponible sur le site Internet du TIGR (www.tigr.org), avec le logiciel TurboSEQUENT.

IV. 7. Microscopie électronique

Les observations en microscopie électronique à balayage ont été réalisées au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie de l'Université de Caen. Pour ces observations, les cellules d'*E. faecalis* ont été fixées par le mélange glutaraldéhyde/tétraoxyde d'osmium dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 6,8 pendant 16 h à 4 °C. Après plusieurs lavages dans ce même tampon, les cellules sont remises en suspension et sont déposées sur des plaques d'aluminium. La suspension cellulaire est ensuite déshydratée en réalisant des bains successifs d'alcool/acétone puis séchée au CO₂ par la méthode du point critique décrite par Anderson (237). Après métallisation à l'or, les échantillons sont observés en microscopie électronique à balayage à canon à émission de champ sous une tension de 5 kV.

IV. 8. Surproduction et purification de la protéine EF1843 par le système QIAexpress.

Le système QIAexpress (QIAGEN) permet d'induire la surproduction d'une protéine d'intérêt. Le gène codant la protéine d'intérêt est cloné dans le vecteur d'expression pQE31 de façon à créer une protéine recombinante présentant une extension de 6 histidines (His₆-tag) à son extrémité NH₂-terminale. La transcription du gène recombinant est placée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur fort du phage T5 et d'un double opérateur *lacO*. Ainsi, en l'absence de l'inducteur IPTG, le répresseur LacI, produit de manière constitutive dans la souche d'expression *E. coli* M15 (pREP4) (Tableau 2), va réprimer l'expression de l'ORF (open reading frame pour cadre ouvert de lecture) en se fixant aux régions opératrices. L'introduction d'IPTG dans la culture lève la répression et permet la surproduction de la protéine recombinante.

EF1843 est surproduite et purifiée en tant que protéine hybride fusionnée en partie N-terminale à une extension de six résidus histidine (His₆-tag). Tout d'abord, le gène EF1843 délété de son peptide signal est amplifié par PCR en utilisant le couple d'amorce LH20/pgd19 (Tableau 4) puis cloné dans le vecteur d'expression pQE31 (QIAGEN) (Tableau 3). La protéine est surproduite dans *E. coli* M15(pREP4) contenant la construction pQE31-EF1843. Cette souche est cultivée dans 200 ml de milieu LB supplémenté avec 100 µg/ml d'ampicilline et 50 µg/ml de kanamycine jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5. La synthèse de la protéine EF1843 est induite pendant 2 h à 37 °C par ajout de 1 mM d'IPTG. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation (10 min à 8000 ×g), puis rincées avec 20 ml de tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; Na₂SO₄ 50 mM ; Glycérol 15 %), centrifugées à nouveau, reprises dans 5 ml de tampon A et finalement lysées par passage dans le système « One Shot Cell Disrupter » (ConstantSystem, Northants, UK, www.constantsystem.com) à 2,15 kBar. Après centrifugation du lysat cellulaire à 13000 ×g pendant 30 min à 4 °C, la fraction soluble est récupérée. Une chromatographie d'affinité, de type IMAC (pour immobilized metal affinity chromatography), est ensuite réalisée : la fixation de la protéine recombinante est effectuée dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml de résine Ni⁺-NTA (résine nickel-acide nitroacétique agarose) (Qiagen), préalablement équilibrée en tampon A et en incubant 1 h à 4 °C sous agitation douce sur plateau oscillant (50 rev/min). La résine a ensuite été déposée dans une seringue de 2 ml pourvue d'un filtre de laine de verre, et des lavages successifs sont réalisés avec 10 ml de tampon A, puis 10 ml de tampon B (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; Na₂SO₄ 50 mM ; Glycérol 15 % ; Imidazole 30 mM). La protéine de fusion est finalement éluée par 2,5 ml de tampon C (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; Na₂SO₄ 50 mM ; Glycérol 15% ; Imidazole

300 mM). L'éluat est ensuite déposé sur une colonne de séphadex « PD-10 Desalting column » (Amersham Biosciences) et la protéine est finalement collectée par fractions de 500 µl après application de 3,5 ml de tampon D (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; DTT 2 mM ; Glycérol 15 %) sur la colonne. La concentration en protéine est estimée par spectrophotométrie à l'aide de l'appareil Biophotometer (Eppendorf), puis par dosage selon la méthode de Bradford (238) et les fractions les plus concentrées sont rassemblées et stockées à -80 °C.

IV. 9. Analyse de la structure du PG

La structure du PG d'*E. faecalis* a été analysée par RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) et par spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) comme décrit précédemment pour *L. lactis* (239).

IV. 9. 1. Extraction du PG

500 ml de milieu M17 glucose sontensemencés à 2 % (v/v) à partir de culture de nuit, après incubation à 37 °C les cellules sont collectées par centrifugation (10 min 5000 rpm à 4 °C) durant la phase exponentielle ($DO_{600} = 0,5$) ou durant la phase stationnaire ($DO_{600} = 2$). Les culots cellulaires sont resuspendus dans un volume de 40 ml d'eau MilliQ stérile froide puis portés à ébullition pendant 10 min. Après centrifugation (10 min 5000 rpm à 4 °C) les culots sont resuspendus dans 0,5 ml d'eau MilliQ. Après ajout de 0,5 ml de SDS 10 % préchauffé à 60 °C, le mélange est porté à ébullition pendant 25 min. La solution est ensuite centrifugée 10 min à 20000 g à température ambiante (afin de prévenir une précipitation du SDS) et le culot est repris dans 1 ml de SDS 4 % préchauffé à 60 °C puis porté à ébullition durant 15 min avant centrifugation 10 min à 20000 g à température ambiante. La solution ainsi obtenue est lavée (centrifugation 10 min 20000 g à température ambiante puis reprise du culot dans 1,5 ml d'eau MilliQ préchauffée à 60 °C) jusqu'à élimination du SDS (au moins 7 fois). A la suite du dernier lavage, le culot est resuspendu dans 800 µl de Tris-HCl 50 mM pH 6,5 auxquels sont ajoutés 200 µl de pronase à 10 mg/ml puis incubé 90 min à 60 °C. Après un lavage du culot à l'eau MilliQ, celui-ci est repris dans 1 ml de tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,8 auxquels sont ajoutés 20 µl de trypsine (10 mg/ml) et 5 µl d'azide de sodium 10 %. Le tout est incubé sous agitation, 16 h à 37 °C. Le culot est lavé avec 1,5 ml d'eau ultra pure puis centrifugé 10 min à 20000 g à température ambiante. 500 µl d'acide

hydrofluoridrique sont déposés sur le culot puis le tout est incubé 5 min dans un bain à ultrasons avant une incubation de 16 h à 4 °C. Après centrifugation 10 min, 20000 g à température ambiante le culot est lavé 2 fois avec 1,5 ml de Tris-HCl 250 mM pH 6,8 et 4 fois avec 1,5 ml d'eau MilliQ afin d'obtenir un pH proche de 5. Le culot est finalement repris dans 500 µl d'eau MilliQ puis lyophilisé.

IV. 9. 2. Digestion du PG par la mutanolysine

Le PG lyophilisé est repris dans de l'eau MilliQ afin d'obtenir une concentration d'environ 20 mg/ml puis traité avec une sonde à ultrasons (microsonde) 2 sec à 15 % de sa puissance maximale. 4 mg (200 µl) de PG sont utilisés pour la digestion. A ces 200 µl sont ajoutés 125 µl de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 5,5 ; 2,5 µl d'azide de Na 10 % ; 25 µl de mutanolysine 50000 U/ml et 147 µl d'eau MilliQ. Après incubation 19 h à 37 °C sous agitation, la digestion est arrêtée par chauffage à 100 °C pendant 3 min.

IV. 9. 3. Réduction des muuropeptides

Afin de séparer les muuropeptides par HPLC il est nécessaire de procéder à leur réduction. Pour cela, 400 µl de tampon borate de sodium 250 mM, pH 9 sont ajoutés à 400 µl de PG digéré, (le pH de ce mélange doit être de 9) puis le mélange est transféré dans un tube contenant 4 mg de borohydrure de sodium, cette étape provoque un dégagement gazeux (H₂ et B₂) pendant 20 min. Le pH de la solution est ensuite abaissé jusqu'à pH 4 par ajout d'acide orthophosphorique 20 % (afin d'éliminer l'excès de borohydrure) puis filtrée sur membrane PVDF 0,45 µm. 50 µl de cette préparation sont par la suite injectés en HPLC.

IV. 9. 4. Séparation HPLC et analyse MALDI-TOF

Le PG digéré et réduit est séparé par RP-HPLC par l'utilisation d'une colonne Hypersil ODS (C18, 250 × 4,6 mm; 5 µm ; ThermoHypersil-Keystone) incubée à 50 °C comme décrit par Courtin *et al.* (239). Les muuropeptides sont élués pendant 5 min avec 10 mM de tampon phosphate d'ammonium pH 5,6 (tampon A) puis pendant 270 min avec un gradient linéaire de méthanol (0-30 %) dans du tampon A avec un débit de 0,5 ml/min. De l'azide de sodium est ajouté (180 µl/l de tampon A) pour éviter une dérive de la ligne de base à 202 nm. Pour chaque minute d'élution une fraction est collectée et 1 µl des fractions incluant les principaux pics sont analysés par MALDI-TOF avec un spectromètre de masse

Voyager DE STR (Applied Biosystems, Framingham, USA) avec une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique.

V. Méthodes d'analyses bioinformatiques

Les séquences d'ADN ont été analysées à l'aide du programme VectorNTI (Invitrogen, Carlsland, CA, USA).

La séquence du génome d'*E. faecalis* V583 (1) est accessible sur le site du TIGR (*The Institute for Genomic Research*, www.tigr.org).

Les comparaisons et les alignements des séquences peptidiques ont été réalisés grâce aux logiciels disponibles en ligne sur les sites du NCBI (National Center for Biotechnology Information ; www.ncbi.nlm.nih.gov) et de ExPasSy (Expert Protein Analysis System ; www.expasy.ch).

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Analyse du sécrétome et des protéines de surface d'*E. faecalis*

I. 1. Contexte de l'étude

Les protéines de surface des bactéries sont des molécules clés constituant l'interface entre la cellule et l'environnement. Certaines, d'entre elles correspondant à des facteurs de virulence, ont été précédemment décrites chez *E. faecalis*. Afin de mettre en évidence de nouveaux facteurs de virulence, une des thématiques de recherche de notre laboratoire vise à caractériser les protéines sécrétées et de surface chez *E. faecalis*.

Pour cela, une étude a été conduite, en marge de ce travail de thèse, afin d'identifier, par une approche protéomique globale, les protéines sécrétées les plus abondantes et celles associées à la surface d'*E. faecalis*. Ces protéines ont été soit extraites de cultures de la souche JH2-2 puis séparées par gel d'électrophorèse soit directement extraites par trypsinolyse *in vivo*. Elles sont ensuite analysées par spectrométrie de masse intégrant une source électrospray (ESI) avec une trappe d'ions. Des fonctions putatives ont été attribuées par homologie avec la séquence annotée du génome de la souche *E. faecalis* V583. Un total de 8 protéines sécrétées incluant des autolysines et des lipoprotéines ont été identifiées dans le surnageant de culture. 39 protéines de surface ont été identifiées à la suite de l'électrophorèse bidimensionnelle et de la trypsinolyse *in vivo* parmi lesquelles 2 sont communes avec les protéines sécrétées. En résumé, nous avons identifié 45 protéines et l'analyse de leurs séquences révèle que 36 (80 %) présentent des motifs caractéristiques (peptide signal ou segment transmembranaire) conformes à une prédiction de localisation extracellulaire. Ces résultats sont présentés dans l'Annexe 1 sous la forme d'une publication soumise dans *Research in Microbiology*.

En continuité de ce travail, une étude visant à mettre en évidence des gènes ayant des niveaux d'expression variants entre la souche d'*E. faecalis* JH2-2 (modèle d'étude de notre laboratoire) et les isolats cliniques V583 (dont le génome est séquencé) et MMH594 (Tableau 2) a été réalisée. L'identification de gènes exprimés de manière plus importante chez les isolats cliniques tendrait à les considérer comme des facteurs de virulence potentiels.

La comparaison du niveau d'expression des gènes entre ces différentes souches a été effectuée grâce à des membranes (macroarrays ; Collaboration avec P. Serror, INRA de Jouy-en-Josas) sur lesquelles ont été fixés les amplicons correspondant à 255 gènes (dont 45 codant des protéines de surface ou sécrétées). Ces macroarrays ont servi pour des

expériences d'hybridation différentielle avec les ADN complémentaires (ADNc) dérivés des ARN totaux de chacune des 3 souches. Les résultats de ces expériences d'hybridation différentielle ont permis de mettre en évidence l'expression de 23 gènes. Parmi ces 23 gènes, cinq (21,7%) sont exprimés à des niveaux comparables chez les trois souches, 7 (30,4%) sont plus fortement exprimés chez la souche de référence JH2-2, et un total de 11 gènes (47,8%) sont surexprimés chez les isolats cliniques V583 et MMH594.

Dans ce travail de thèse, nous avons vérifié les niveaux d'expression de ces gènes par amplification par PCR en temps réel. Ce travail a permis de retenir deux gènes d'intérêt qui ont ensuite été interrompus dans la souche JH2-2 par mutagenèse insertionnelle. Finalement une analyse phénotypique de ces mutants a été effectuée.

I. 2. PCR quantitative en temps réel

Afin de confirmer les résultats d'hybridation différentielle, le niveau d'expression des 23 gènes a été analysé par PCR quantitative en temps réel en utilisant les ADNc dérivés des ARNm des trois souches à comparer. Les résultats obtenus montrent que 5 gènes sont exprimés de manière plus importante chez les isolats cliniques MMH594 et V583 par rapport à la souche JH2-2 (Tableau 7).

Tableau 7 : Analyse par PCR en temps réel des gènes identifiés consécutivement à l'hybridation différentielle.

Quantification relative par la méthode des $\Delta\Delta CT$.

Gène	Souche	CT*	SD*	$\Delta\Delta CT$	SD $\Delta\Delta CT$	RQ	RQ min	RQ max
<i>ef0082</i> (Major facilitator family transproter)	V583	23,02	0,13	- 4,08	0,143	+ 16,9	+ 15,3	+ 18,7
	MMH594	25,31	0,10	- 1,09	0,112	+ 2,1	+ 2,0	+ 2,3
<i>ef1097</i> (Hypothetical protein)	V583	25,86	0,11	- 4,39	0,348	+ 21	+ 16,5	+ 26,7
	MMH594	25,16	0,08	- 4,39	0,341	+ 21	+ 16,5	+ 26,5
<i>ef1685</i> (Hemolysine III)	V583	20,97	0,19	- 8,87	0,344	+ 467,9	+ 368,6	+ 593,9
	MMH594	18,93	0,12	- 10,91	0,308	+ 1924,1	+ 2382,1	+ 1554,2
<i>ef2224</i> (Cell wall surface anchor family protein)	V583	25,74	0,09	- 5,77	0,130	+ 54,6	+ 49,9	+ 59,7
	MMH594	25,68	0,06	- 5,1	0,116	+ 34,3	+ 31,6	+ 37,2
<i>ef3054</i> (Lipoprotein putative)	V583	25,03	0,16	- 2,88	0,260	+ 7,4	+ 6,1	+ 8,8
	MMH594	25,14	0,31	- 2,15	0,371	+ 4,4	+ 3,4	+ 5,7

* Expériences effectuées en triplicat. CT=cycle seuil ; SD : écart type ; RQ=quantité relative ; $\Delta\Delta CT$ =variation du CT entre souche testée et souche de référence (JH2-2) prenant en compte les variations observées au niveau du contrôle de standardisation (ARNr 23 S).

La quantité relative (RQ) de transcrits chez les souches virulentes par rapport à la souche de référence JH2-2 varie en fonction des gènes considérés de + 2,1 à + 1924,1 fois. Ainsi, les gènes EF1685, EF3054, EF2224, EF1097 et EF0082 ont des niveaux d'expression plus élevés dans les souches cliniques que dans la souche de référence JH2-2.

Le gène EF0082 code une protéine identifiée comme étant un transporteur membranaire. Une équipe de notre laboratoire a montré que ce gène est sous la dépendance d'un régulateur transcriptionnel nommé Ers (enterococcal regulator of survival) (240). Ce travail se poursuit par l'étude de la fonction et de la régulation de ce gène.

Le seul homologue connu de EF1097 est la protéine SA-M57 (241). Cette protéine, dont le gène a été identifié sur un plasmide extrait de *Streptococcus pyogenes*, correspond à une bactériocine de la famille des streptococcines.

Le gène EF1685 code une protéine impliquée dans des phénomènes d'hémolyse déjà bien caractérisés chez *E. faecalis* (242, 243).

A ce jour, les gènes EF2224 et EF3054 n'ont pas d'homologues dont la fonction est caractérisée. Ainsi, parmi les 5 gènes plus exprimés dans les souches cliniques, nous avons retenu les gènes EF2224 et EF3054 pour des investigations plus approfondies.

I. 3. Analyse de l'organisation structurale des gènes EF2224, et EF3054

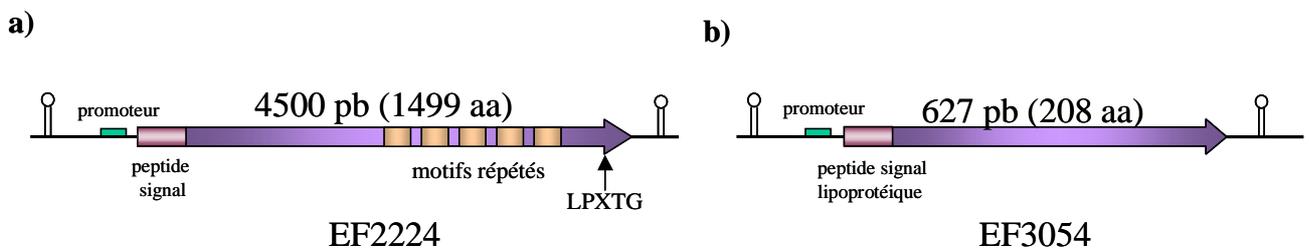


Figure 19 : Organisation structurale des régions chromosomiques des gènes (a) EF2224 et (b) EF3054.

⦿ : terminateurs rho-indépendants.

Le gène EF2224 est bordé par 2 séquences inversées répétées, susceptibles de former des structures secondaires pouvant fonctionner comme des terminateurs rho-indépendants (Figure 19). Ces observations suggèrent fortement une expression monocistronique du gène EF1843.

L'analyse de la séquence promotrice du gène EF2224 révèle la présence d'une séquence promotrice potentielle (TTGAGA (N₁₇) TAAAAG) pouvant être reliée à la

séquence consensus reconnue par le facteur σ^{70} (TTGACA (N₁₆₋₁₈) TATAAT) ainsi qu'un site potentiel de fixation des ribosomes (AGGAGA).

La séquence codante de EF2224 est de 4500 pb et le poids moléculaire prédit de la protéine correspondante est de 164 kDa. L'analyse de la séquence de la protéine EF2224 (logiciel SignalP : www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) révèle la présence d'un peptide signal N-terminal suggérant une localisation extra-cellulaire de la protéine. De plus, la présence d'un motif LPXTG dans la partie C-terminale de la protéine permet d'affiner la prédiction de la localisation de cette protéine car ce motif est caractéristique de la liaison covalente d'une protéine au PG. EF2224 présente également dans sa seconde moitié 5 éléments répétés d'environ 130 acides aminés. Ces éléments sont retrouvés dans 3 des 5 plus grandes protéines de *Bacillus cereus* où ils peuvent être répétés plus de 30 fois au sein de la même protéine. A notre connaissance, ces répétitions n'ont pas de fonction connue bien que pour d'autres protéines, ce type de répétitions permet d'établir des liaisons faibles (non-covalentes) avec des éléments de la paroi (129).

Le gène EF3054 est aussi bordé par deux terminateurs rho-indépendant potentiels (Figure 19) suggérant une expression monocistronique de ce gène. L'analyse de la séquence promotrice du gène EF3054 révèle la présence d'une séquence promotrice potentielle (ATGATT (N₁₆) TATAAT) en aval de laquelle se retrouve un site de liaison aux ribosomes (AGGAAA). La séquence codante de EF3054 est de 627 pb et le poids moléculaire prédit de la protéine correspondante est de 23 kDa. L'analyse de la séquence primaire en acides aminés du gène EF3054 montre la présence d'un peptide signal de sécrétion lipoprotéique indiquant une liaison covalente putative de la protéine EF3054 mature aux lipides membranaires. Toutefois, aucune homologie de séquence avec des protéines de fonction connue n'a été trouvée dans les banques de données.

I. 4. Analyse physiologique des mutants Δ EF2224 et Δ EF3054

Afin d'étudier le rôle des gènes EF2224 et EF3054, nous avons construit dans la souche d'*E. faecalis* JH2-2, les deux mutants correspondant à chacun de ces gènes. Ces mutants ont été nommés Δ EF2224 et Δ EF3054 (voir Matériels et Méthodes). La stabilité de l'intégration du plasmide recombinant a été testée. Pour cela, nous avons effectué en parallèle, pour chaque mutant, des cultures en présence et en absence d'antibiotique. La perte du plasmide recombinant est estimée en dénombrant, après 24 h de croissance pour chaque culture, la

quantité de bactéries résistantes et sensibles à l'érythromycine. Les résultats de ces dénombrements étant comparables dans chacun des cas, nous pouvons conclure que même en absence d'antibiotique, le plasmide reste intégré durant au moins 24 h de culture. Cela nous permet d'effectuer des tests physiologiques en absence d'antibiotique.

L'analyse de la croissance du mutant $\Delta EF2224$ n'a pas permis de mettre en évidence de différence majeure de temps de latence, de taux de croissance exponentiel ni de DO finale par rapport à la souche sauvage.

Par contre l'analyse de la croissance du mutant $\Delta EF3054$ a révélé une augmentation du temps de latence et une diminution du taux de croissance exponentiel (Figure 20). Les analyses en microscopie photonique et électronique à balayage n'ont pas révélé de différences de morphologie cellulaire entre les souches $\Delta EF2224$ et $\Delta EF3054$ et JH2-2.

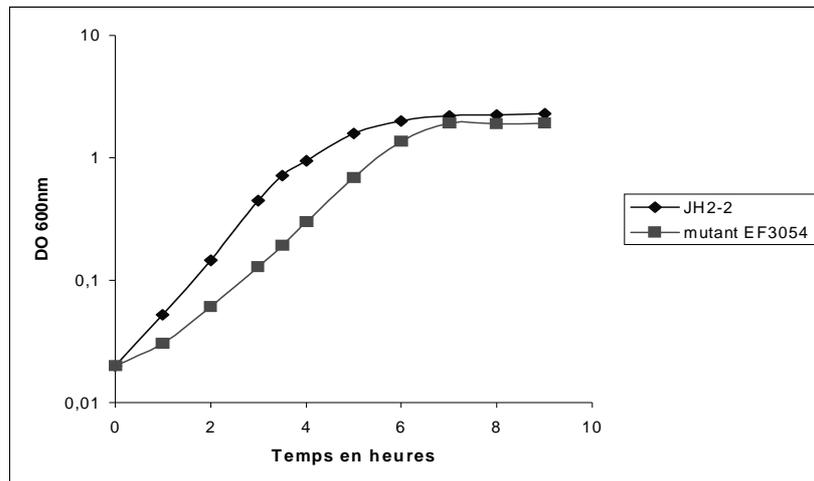


Figure 20 : Cinétiques de croissance de la souche JH2-2 et du mutant EF3054 en milieu GM17.

Par la suite, nous avons testé la capacité des différentes souches à résister à 7 stress physico-chimiques. Nous avons effectué ces expériences en cultivant les différentes souches dans du milieu GM17 dans lequel a été ajouté différents agents stressants : H_2O_2 1,5 mM, TBOOH 5 mM, SDS 0,005 %, sels biliaries 0,05 %, NaCl 5 %, éthanol 5 % ou HCl (pH_{final} 5). Les courbes de croissance obtenues dans ces différentes conditions n'ont pas montré de sensibilité particulière d'un des mutants à ces agents stressants.

Les phénomènes d'adhésion ayant une part importante durant le processus infectieux nous avons vérifié si l'absence de ces gènes modifiait les capacités d'*E. faecalis* à rester

immobilisé dans un milieu semi-liquide (225). Les résultats obtenus n'ont pas montré de différence de comportement entre les différentes souches.

La capacité de résister à l'action des antibiotiques ayant une part importante dans la pathogénicité d'*E. faecalis*, nous avons analysé la sensibilité des mutants Δ EF2224, Δ EF3054 et de la souche sauvage JH2-2 vis-à-vis de 13 antibiotiques classiquement utilisés lors de diagnostics vétérinaires pour l'identification des bactéries à Gram positif (voir Matériels et Méthodes) . Des résultats comparables ont été obtenus avec chacune de ces souches. De la même manière, l'analyse de l'assimilation des hydrates de carbone grâce à une galerie API 50 CH n'a pas révélé de différences métaboliques significatives entre les mutants Δ EF2224 et Δ EF3054 et la souche sauvage JH2-2.

I. 5. Conclusion

Notre travail s'inscrit dans la continuité d'un travail initié préalablement au sein de notre laboratoire, dont l'objectif était d'identifier des gènes de virulence impliqués dans les phénomènes d'adhésion et/ou de pathogénicité chez *E. faecalis*. Dans un premier temps, nous avons confirmé par des expériences de PCR en temps réel des résultats obtenus par une approche globale effectuée à l'aide de macroarrays. Cela a permis de retenir 2 gènes dont les niveaux d'expression sont plus élevés pour les isolats cliniques d'*E. faecalis* V583 et MMH594, que pour la souche de référence JH2-2. Ces gènes, EF2224 et EF3054, constituant des candidats potentiels contribuant à la virulence d'*E. faecalis*, ont été interrompus dans la souche JH2-2. Les différents tests physiologiques effectués sur ces mutants (suivis de croissances, immobilisation en milieu semi-liquide, résistance à différents stress physico-chimiques...) ont montré peu ou pas de différences en comparaison avec la souche parentale. Ces résultats indiquent que dans les conditions testées, l'absence de ces gènes n'influence pas (ou peu) la capacité d'*E. faecalis* à croître et à résister aux stress.

Il est à noter que pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu effectuer la mutagenèse insertionnelle des gènes EF2224 et EF3054 dans les souches où ils ont été caractérisés comme étant le plus fortement exprimés (V583 et MMH594). Ainsi, peut-on penser que l'absence de différences phénotypiques importantes entre les mutants Δ EF2224 et Δ EF3054 et la souche sauvage serait due à la faible expression de ces gènes dans la souche JH2-2. Des résultats plus marqués auraient probablement pu être obtenus si ces gènes avaient été interrompus dans les souches V583 et/ou MMH594.

Les facteurs de virulence n'étant, par définition, pas indispensables à la survie d'une bactérie (38), seules des expériences d'infection *in vivo* permettraient de caractériser si l'absence des gènes EF2224 et EF3054 diminue le potentiel pathogène d'*E. faecalis* et donc de déterminer si ces gènes constituent réellement des facteurs de virulence. Ces observations, ainsi que l'absence de différences de phénotypes importantes entre les mutants Δ EF2224 et Δ EF3054 et la souche sauvage, nous ont incité à orienter la suite de notre travail vers une approche plus ciblée, dans la recherche de facteurs de virulence chez *E. faecalis*.

Chapitre II : Recherche par approche ciblée des déterminants génétiques responsables de la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*

II. 1. Contexte de l'étude

Dans le cadre de l'investigation des facteurs à associer à la virulence d'*E. faecalis*, il y a lieu de noter l'extraordinaire capacité de cette bactérie à résister à l'action du lysozyme. Des travaux effectués au sein de notre laboratoire, ont montré qu'un mutant affecté dans un facteur sigma à fonction extracytoplasmique (extra cytoplasmique function, ECF) nommé SigV, présentait une sensibilité au lysozyme (221). Parmi les membres potentiels du régulon de *sigV*, figure le gène EF1843 dont un homologue (*pgdA*) est décrit comme directement impliqué dans la résistance au lysozyme chez *S. pneumoniae* (198). Ainsi, avons-nous mis en place une approche ciblée visant à élucider les causes de cette grande résistance au lysozyme chez *E. faecalis*.

II. 2. Identification de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lysozyme

L'analyse *in silico* de la séquence nucléotidique du génome de la souche V583 d'*E. faecalis* a permis d'identifier trois gènes, EF0783, EF1843 et EF0590, potentiellement impliqués dans des mécanismes de résistance au lysozyme.

II. 2. 1. Caractérisation du gène EF0783

E. faecalis a préalablement été décrit comme étant capable de *O*-acétyler son PG (142, 185). Il a été montré que cette modification inhibait l'action du lysozyme de manière proportionnelle chez différentes bactéries (194, 244-246). L'enzyme responsable de cette modification chez *S. aureus* a été identifiée, caractérisée et nommée OatA : c'est une *O*-acétyltransférase qui ajoute un groupement acétyle au niveau du groupement C6-OH du résidu NAM du PG (193). La recherche d'un homologue de cette protéine dans la séquence annotée du génome de la souche d'*E. faecalis* V583 (1) a montré que la protéine EF0783 était la seule comportant des homologies de séquences significatives avec la protéine OatA de *S. aureus* (193). La protéine EF0783 (625 acides aminés) partage 33 % d'identité (55 % de similarité) avec OatA de *S. aureus*. La protéine EF0783 possède 7 segments

transmembranaires putatifs, répartis tout au long de sa séquence, ce qui suggère fortement son association à la membrane (Figure 21).

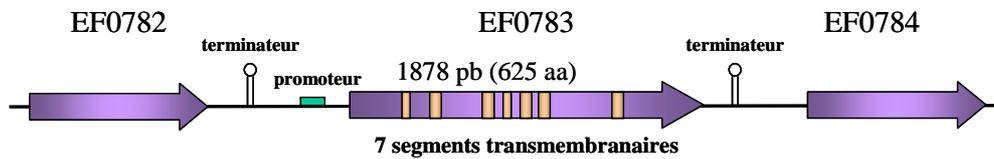


Figure 21 : Représentation schématique de l'organisation génétique du gène EF0783.

L'analyse de la séquence du gène EF0783 révèle la présence d'une séquence promotrice potentielle (TTGCCA (N₁₇) TATTAT) suivie d'un site potentiel de fixation des ribosomes (AGGAAA). Ce gène est bordé par 2 séquences inversées répétées, dont la structure secondaire en épingle à cheveux peut fonctionner comme un terminateur rho-indépendant. Cette organisation suggère fortement une expression monocistronique du gène EF0783 (Figure 21).

II. 2. 2. Caractérisation du gène EF1843

Comme nous l'avons relevé en introduction de ce chapitre, le gène EF1843 code une protéine potentielle de 301 acides aminés qui partage 35 % d'identité (53 % de similarité) sur 204 acides aminés avec la protéine PgdA de *S. pneumoniae* (198). PgdA tout comme EF1843 et d'autres PG *N*-acétylglucosamine déacétylases précédemment identifiées chez *L. monocytogenes* (200) et *L. lactis* (247) sont des membres de la famille 4 des carbohydate estérases comme définie par la base de données CAZY (www.cazy.org/fam/acc_CE.html). Ils partagent les mêmes résidus catalytiques et les mêmes acides aminés liant des ions métalliques (Figure 22) (248, 249).

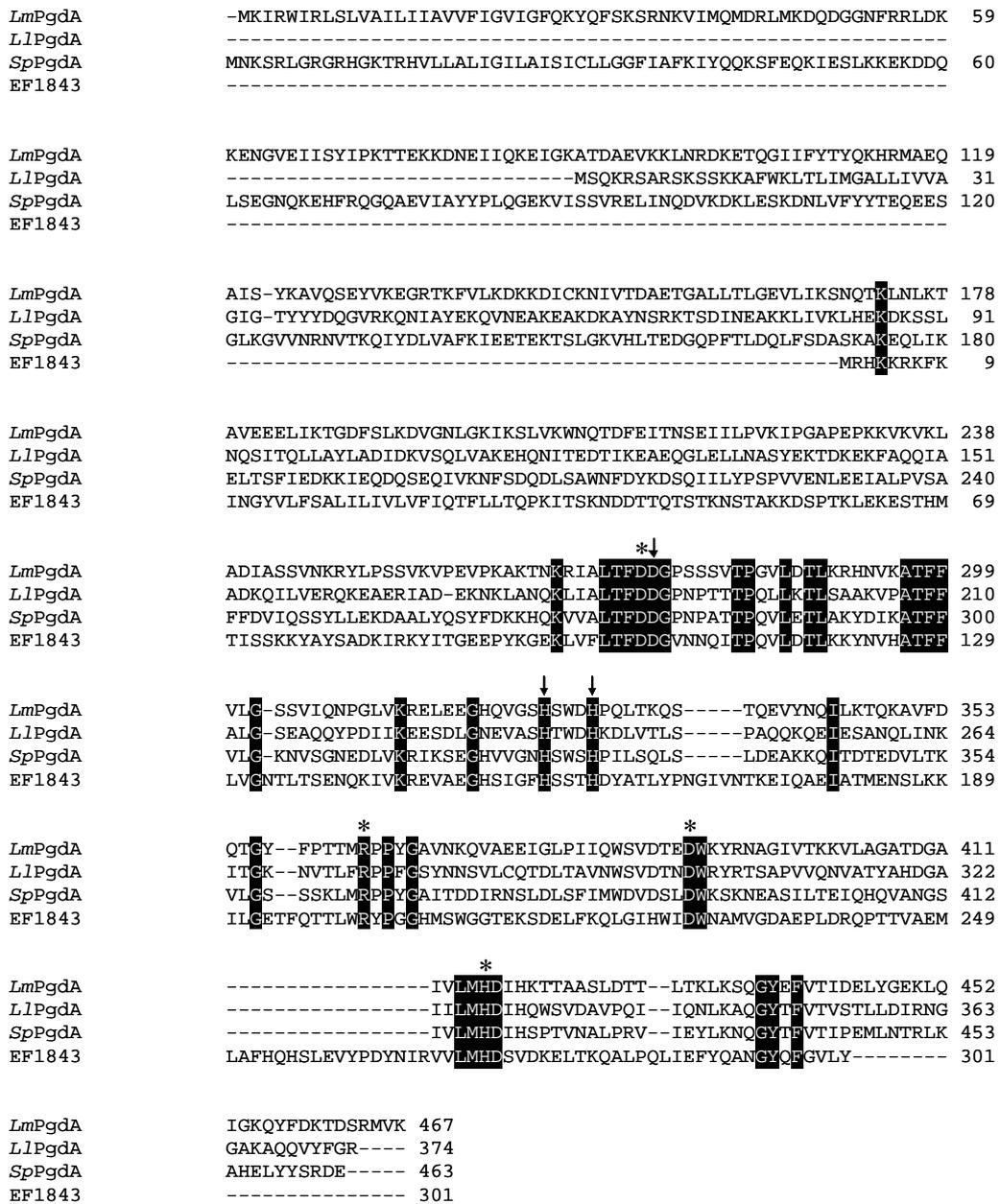


Figure 22 : Alignement de séquences de 3 N-acétylglucosamine déacétylases de *L. monocytogenes* (*LmPgdA*), *L. lactis* (*LlPgdA*) et de *S. pneumoniae* (*SpPgdA*) avec la protéine EF1843.

Les séquences ont été alignées de manière à respecter les résidus du site catalytique. Les manipulations de séquence ont été effectuées à l'aide du logiciel CLUSTALW (<http://align.genome.jp>). Les régions en noir indiquent les résidus identiques pour les 4 protéines. Les flèches et les étoiles indiquent respectivement les résidus catalytiques conservés et les acides aminés liés à des ions métalliques caractérisés pour *SpPgdA*. La numérotation des acides aminés est donné sur la droite pour chaque gène.

La protéine EF1843 d'*E. faecalis* est potentiellement sécrétée car elle possède un peptide signal N-terminal classique chez les bactéries à Gram positif (Figure 23) (118). Cependant, aucun site de clivage de signal peptidases connues n'a été révélé suggérant que cette protéine reste ancrée à la membrane cytoplasmique par son domaine N-terminal.

L'analyse de la séquence promotrice du gène EF1843 révèle la présence d'une séquence promotrice correspondant à celle du facteur sigma ECF SigV d'*E. faecalis* (221). La séquence d'un site potentiel de fixation des ribosomes (AAGAGG) est aussi présente. Ce gène est bordé en amont par un gène transcrit de manière divergente et en aval du codon stop par un potentiel terminateur rho-indépendant, suggérant fortement une expression monocistronique de celui-ci (Figure 23).

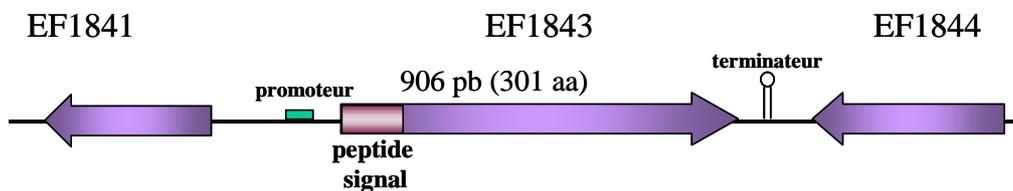


Figure 23 : Représentation schématique de l'organisation génétique du gène EF1843.

II. 2. 3. Caractérisation du gène EF0590

Le gène EF0590 est un deuxième homologue de la protéine PgdA de *S. pneumoniae*. Ce gène est localisé sur une portion du chromosome qualifiée d'îlot de pathogénicité chez *E. faecalis* (en raison de la prédominance des facteurs de virulence présents dans cette région (250)). La protéine EF0590 (516 acides aminés) partage, sur 487 acides aminés, 27 % d'identité (49 % de similarité) avec la protéine PgdA de *S. pneumoniae*. L'analyse de sa séquence protéique montre la présence d'un segment hydrophobe potentiellement transmembranaire en partie N-terminale. Cette protéine semble également dépourvue de peptide signal (Figure 24).

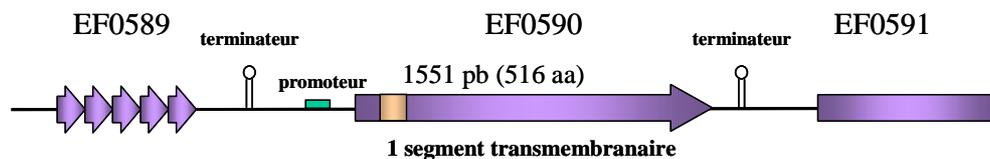


Figure 24 : Représentation schématique de l'organisation génétique du gène EF0590.

L'analyse de la séquence du gène EF0590 révèle la présence d'une séquence promotrice potentielle (TTGTAA (N₁₆) TATTTT) ainsi qu'un site de fixation des ribosomes (AGGAAG). Ce gène est bordé par 2 terminateurs rho-indépendant potentiels, suggérant fortement une expression monocistronique (Figure 24).

L'analyse *in silico* de la séquence du génome de la souche d'*E. faecalis* V583 n'a pas permis d'identifier d'homologues des gènes *aac(2')-Ia*, *pacA*, *ivy* et *sic* respectivement impliqués dans la résistance au lysozyme chez *Providencia stuartii* (251), *Neisseria sp.* (191), *E. coli* (252) et *S. pyogenes* (210).

II. 3. Recherche d'un lien entre résistance au lysozyme et présence des gènes EF1843, EF0783 et EF0590

Des études précédentes ont montré que toutes les souches d'*E. faecalis* n'ont pas la même capacité à résister au lysozyme (253). En effet, bien que la plupart des souches soient très résistantes au lysozyme (concentration supérieure à 5 mg/ml), les quantités maximales de lysozyme tolérées sont variables pour chacune d'elles (142).

Afin d'établir un lien entre la présence des gènes EF1843, EF0783 et EF0590 et la résistance au lysozyme, nous avons évalué la capacité de résister au lysozyme de 146 souches environnementales d'*E. faecalis* puis nous avons comparé ces résultats avec la présence ou non des gènes EF0783, EF1843 et EF0590 au sein de ces souches. La détection de ces gènes est réalisée par PCR avec une matrice correspondant aux ADN génomiques et à l'aide de couple d'amorces spécifiques pour chacun des gènes (Tableau 4). L'estimation de la capacité à résister au lysozyme a été réalisée par observation de la croissance sur milieu gélosé (Mueller-Hinton) en présence de bleu de bromocrésol. Dans ces conditions, quatre concentrations différentes de lysozyme (5, 10, 15 et 20 mg/ml) ont été testées. Après 24 h

d'incubation à 37 °C la "concentration minimale inhibitrice" (CMI) de chaque isolat a été déterminée en fonction de la présence d'une zone d'acidification (révélée par un changement de couleur du milieu) traduisant une croissance bactérienne (Figure 25).

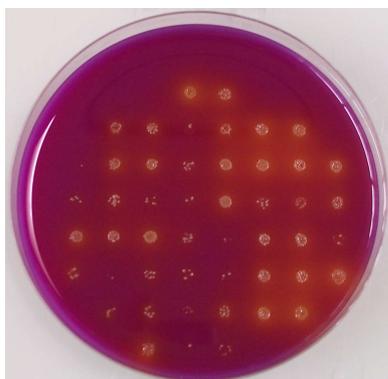


Figure 25 : Exemple du test de sensibilité au lysozyme effectué sur des souches d'*E. faecalis* d'origine environnementale.

Milieu Mueller-Hinton agar, bleu de Bromocrésol, lysozyme 10 mg/ml.

Toutes les souches testées ont présenté une croissance en présence de 5 mg/ml de lysozyme, concordant avec le caractère résistant d'*E. faecalis* vis-à-vis du lysozyme. Pour discriminer les souches entre elles, nous avons fixé le niveau de sensibilité à 15 mg/ml de lysozyme et nous avons pu ainsi les classer en deux catégories : résistantes (CMI>15 mg/ml) et sensibles (CMI<15 mg/ml).

Tableau 8 : Corrélation entre résistance au lysozyme et détection par PCR du gène EF1843.

	Résistant	Sensible
Présence de EF1843	47,5% (57)	52,5% (63)
Absence de EF1843	23% (6)	77% (20)

Résultats obtenus sur 146 souches environnementales d'*E. faecalis*.

Les nombres entre parenthèses correspondent aux nombres de souches dans chaque catégorie.

La combinaison des résultats obtenus par l'analyse phénotypique et par PCR montre que les souches ne possédant pas le gène EF1843 sont statistiquement plus sensibles au lysozyme que les autres (analyse statistique réalisée à l'aide du test de Fisher exact, $p=0.02$) (Tableau 8).

La détection par PCR de EF0783 révèle que ce gène est présent dans les 146 souches testées.

Le gène EF0590 est présent dans 36 des 146 souches testées. L'analyse statistique des résultats obtenus n'a permis d'établir aucun lien entre la présence de ce gène et la résistance au

lysozyme (données non présentées). Ce gène étant de plus absent de la souche d'*E. faecalis* JH2-2, utilisée comme référence tout au long de cette étude (vérification effectuée par PCR), il n'a donc pas été retenu pour la suite de ce travail.

II. 4. Construction des mutants Δ EF1843, Δ EF0783 et du double mutant Δ EF1843/ Δ EF0783

Afin d'étudier les changements phénotypiques potentiellement induits par l'inactivation des gènes EF1843 et EF0783, nous avons procédé à la délétion de ces gènes par des événements de double crossing-over. Pour cela, nous avons utilisé une méthode basée sur la répllication conditionnelle du vecteur pMAD comme décrit dans le Matériels et Méthodes. Une fois le mutant Δ EF1843 obtenu, la procédure a été reconduite pour déléter le gène EF0783 dans cette même souche afin d'obtenir le double mutant Δ EF1843/ Δ EF0783. L'inactivation des gènes EF0783 et EF1843 n'altère pas le taux de croissance ni la morphologie des souches (microscopie photonique).

II. 5. Analyse de la sensibilité au lysozyme

La croissance de la souche JH2-2 et des mutants Δ EF1843, Δ EF0783 et Δ EF0783- Δ EF1843 a été mesurée sur différents milieux liquides (GM17, BHI, TSB), en absence ou en présence de concentrations de lysozyme allant jusqu'à 50 mg/ml. Ces expériences n'ont pas montré d'inhibition de croissance pour la souche sauvage ni pour les différents mutants. Par la suite, des tests de sensibilité au lysozyme ont été effectués sur milieu solide. Pour chacune des souches, 3 μ l de suspension bactérienne contenant 10^6 cellules/ml ont été déposés sur du milieu Mueller-Hinton agar contenant différentes concentrations de lysozyme (0, 10, 20, 40 et 60 mg/ml). La sensibilité au lysozyme du mutant *sigV* a été également analysée afin de comparer son phénotype de sensibilité à celui des autres souches testées.

En présence de 10 mg/ml de lysozyme, aucune différence significative de croissance n'est observée entre les 4 souches JH2-2, Δ EF1843, Δ EF0783 et Δ EF0783- Δ EF1843 bien que la croissance du mutant *sigV* soit inhibée. Les mutants Δ EF0783 et Δ EF0783/ Δ EF1843 montrent une intensité réduite des zones de croissance en présence de 20 mg/ml de lysozyme. Aucune croissance n'est observée pour ces mutants en présence de 40 mg/ml de lysozyme alors que pour la souche sauvage et le mutant EF1843 la croissance n'est inhibée qu'en présence de 60 mg/ml de lysozyme (Figure 26). Lors de ces expériences, le pH des milieux

utilisés correspond à des valeurs physiologiques (autour de pH 7) compatibles avec la gamme de pH d'activité du lysozyme (pH 6 à 9).

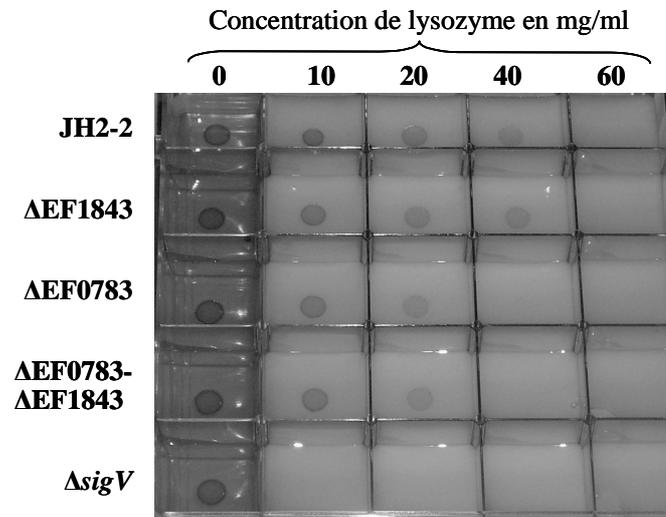


Figure 26 : Sensibilité au lysozyme de la souche JH2-2 et des mutants Δ EF1843, Δ EF0783, Δ EF0783- Δ EF1843 et Δ sigV.

La sensibilité au lysozyme a été testée sur du milieu Mueller Hinton agar contenant du tellurite de potassium à 0,8 μ g/ml (afin d'augmenter le contraste entre les colonies et le milieu) et du lysozyme aux concentrations indiquées.

II. 6. Effet de la mutation des gènes EF1843 et EF0783 sur la survie d'*E. faecalis* dans les macrophages péritonéaux de souris

E. faecalis est capable de persister durant une longue période dans des macrophages péritonéaux de souris. Ceci a été montré grâce à un modèle infectieux murin consistant à injecter des bactéries par voie intra-péritonéale puis à récupérer les macrophages intra-péritonéaux à différents intervalles de temps (37) afin d'y dénombrer la survie intra-cellulaire des bactéries.

Comme les cellules phagocytaires produisent de grandes quantités de lysozyme durant la phagocytose (254), nous avons comparé la survie intra-cellulaire des mutants Δ EF1843, Δ EF0783 et Δ EF0783/ Δ EF1843 et de la souche sauvage dans des macrophages de souris infectées (Figure 27). Dans ces expériences la souche DH5- α a été utilisée comme contrôle négatif puisque qu'elle est caractérisée comme étant sensible à l'action bactéricide des macrophages (37).

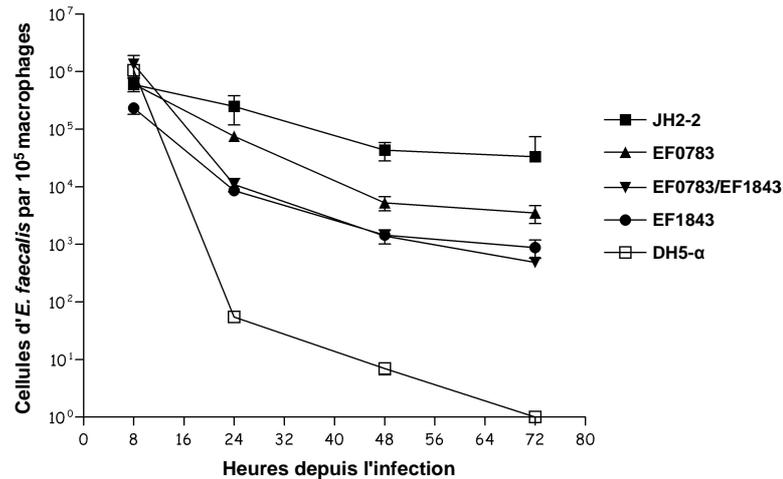


Figure 27 : Evolution de la survie intra-cellulaire de souches d'*E. faecalis* et d'*E. coli* dans des macrophages intra-péritonéaux de souris.

Les données correspondent au nombre de cellules viables par 10^5 macrophages. La déviation standard a été déterminée grâce à trois expériences indépendantes. La souche non pathogène d'*E. coli* DH 5α a été utilisée en tant que contrôle négatif. Ces expériences ont été réalisées grâce à une collaboration avec l'Institut de Microbiologie de l'Université Catholique du Sacré Cœur à Rome (Dr. M. Sanguinetti).

Peu de différences sont observables au niveau du nombre de bactéries dénombrées 8 h après l'infection. Ceci suggère que l'aptitude des différentes souches à infecter les macrophages est comparable. Cependant, nous observons que la souche sauvage d'*E. faecalis* JH2-2 possède une capacité de survie intra-cellulaire supérieure aux trois souches Δ EF1843, Δ EF0783 et Δ EF0783/ Δ EF1843 aux points 24, 48 et 72 h après l'infection ($P < 0,05$). A la fin de ces expériences, la survie de la souche parentale JH2-2 est de 1 à 2 unités logarithmiques supérieures à celle des souches mutantes. Comme escompté, la souche non pathogène d'*E. coli* DH-5α a été efficacement tuée par les macrophages.

II. 7. Analyse de la composition des muropeptides du PG d'*E. faecalis*

Afin d'étudier la fonction de EF0783 et EF1843, nous avons déterminé les profils muropeptidiques du PG des mutants Δ EF0783, Δ EF1843 et Δ EF0783- Δ EF1843 puis nous les avons comparé à celui obtenu avec la souche parentale JH2-2. Après digestion du PG par la mutanolysine et la réduction par du borohydrure de sodium des muropeptides obtenus, le PG des différentes souches a été analysé par RP-HPLC et spectrométrie de masse selon la procédure décrite par Courtin *et al.* (239). Pour chaque souche, le PG a été extrait à partir de cultures en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire (DO_{600} de 0,5 et 2). Les

profils d'élution des muropeptides extraits dans les deux cas sont identiques chez chacune des souches (résultats non présentés). La masse de 29 muropeptides présents dans la souche sauvage a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Tableau 9 et Figure 28). En tenant compte des structures du PG d'*E. faecalis* précédemment décrites (255, 256) (Figure 29), nous avons pu déduire le nombre de résidus alanine présents dans la partie C-terminale de la chaîne latérale et dans le pont peptidique de chaque muropeptide. Nos résultats montrent que 9 muropeptides (identifiés par des astérisques sur la Figure 28) de la souche sauvage présentent une masse supérieure de 42 Da à celle de 9 muropeptides majoritaires. Le poids moléculaire d'un groupement acétyl étant identique à cette augmentation de masse, ces résultats suggèrent une modification par acétylation de 9 muropeptides majoritaires. Une analyse en spectrométrie MALDI-PSD (Post Source Decay) du muropeptide acétylé n°11 indique que cette acétylation est située sur le résidu NAM (données non présentées). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes (184) qui montrent que ces acétylations prennent place sur l'atome d'oxygène de la fonction alcool du carbone 6 du NAM et constituent donc des *O*-acétylations (résultats non présentés) (Figure 29).

Les profils muropeptidiques des mutants Δ EF0783 et Δ EF0783- Δ EF1843 montrent l'absence des 9 pics correspondant aux muropeptides *O*-acétylés (pics 7, 11, 15, 18, 19, 24, 25, 27, 29 du Tableau 9 et de la Figure 28) présents dans le PG de la souche JH2-2. Ces résultats confirment notre hypothèse basée sur les homologies de séquence indiquant que le gène EF0783 d'*E. faecalis* code une PG *O*-acétyl transférase.

Au contraire, nous n'observons pas chez la souche JH2-2 de pic dont la masse serait celle d'un autre pic dépourvu d'un groupement acétyl qui correspondrait à une modification par dé-*N*-acétylation. De plus, aucune différence apparente n'a été observée entre le profil muropeptidique du mutant Δ EF1843 et celui de la souche sauvage. Le profil muropeptidique du double mutant Δ EF0783- Δ EF1843 est similaire à celui du mutant Δ EF0783.

Tableau 9 : Masse moléculaire des muuropeptides de la souche d'*E. faecalis* JH2-2.

	No. des pics ^a	Structure		Masse Moléculaire (Da)		
		R ^b	N ^c	Acétylation ^d	Observée ^e	Calculée ^f
Monomère	1	0	0		825.2968	825.3967
	2	0	2		967.4002	967.4709
	3	0	2		967.4280	967.4709
	4	0	1		896.3611	896.4338
	5	0	2		968.4374	968.4550
	6	0	2		967.3656	967.4709
	7*	0	2	2+Ac ou 6+Ac	1,009.4857	1,009.4815
	8	0	3		1,038.5143	1,038.5081
	9	0	3		1,038.5505	1,038.5081
	10	0	4		1,109.6104	1,109.5452
	11*	0	4	10+Ac	1,151.6369	1,151.5557
Dimère	12	1	2		1,846.0257	1,845.8942
	13	1	4		1,987.9778	1,987.9685
	14	1	4		1,988.1494	1,987.9685
	15*	1	4	13+Ac	2,029.9014	2,029.9790
	16	1	5		2,059.1125	2,059.0056
	17	1	6		2,130.1473	2,130.0427
	18*	1	4	14+Ac	2,030.1084	2,029.9790
	19*	1	6	17+Ac	2,172.1323	2,172.0533
Trimère	20	2	6		3,008.8402	3,008.4613
	21	2	6		3,008.3134	3,008.4613
	22	2	7		3,079.3933	3,079.4984
	23	2	8		3,150.3171	3,150.5355
	24*	2	6	21+Ac ou 20+Ac	3,050.3260	3,050.4718
	25*	2	8	23 +Ac	3,192.6598	3,192.5461
Tétramère	26	3	10		4,170.8157	4,171.0283
	27*	3	10	26+Ac	4,212.8034	4,213.0389
Pentamère	28	4	12		5,190.8824	5,191.5211
	29*	4	12	28+Ac	5,233.1140	5,233.5317

^a Numéros se référant à la Figure 28 ; les astérisques indiquent les muuropeptides acétylés.

^b R est le nombre de structures oligomériques (voir Figure 29).

^c N est le nombre total d'alanines en positions a, b et c (voir Figure 29) correspondant à la formule :

$$N = a + (b \times R) + c.$$

^d X+Ac, le contenu du pic correspond à celui du pic X comportant un groupement acétyl supplémentaire.

^e Masse observée des muuropeptides réduits.

^f Masse calculée des muuropeptides réduits, quand toutes les iGlu sont amidées en iGln, excepté pour le monomère 5 dont la masse indique la présence d'une iGlu.

A la suite de l'observation de la diminution de la survie des mutants Δ EF0783, Δ EF1843 et Δ EF0783- Δ EF1843 dans des macrophages murins, nous avons entrepris la comparaison de la structure du PG de la souche sauvage cultivée dans un milieu riche (BHI) et dans des conditions d'infection. Etant donné que l'analyse de la structure du PG est une technique nécessitant de grandes quantités de cellules il n'est pas expérimentalement envisageable de réaliser cette étude dans des conditions réelles d'infection. Toutefois, pour palier à cela, nous avons cultivé les cellules dans un milieu acide (pH 5), pauvre en magnésium et en nutriments (milieu MgM : magnésium minimum) conçu pour mimer l'environnement intra-phagosome et induire l'expression des gènes de virulence (257). Le milieu MgM ne permettant pas la croissance d'*E. faecalis*, les échantillons de PG extraits en condition MgM ont été préparés à partir de cellules cultivées en milieu BHI jusqu'à la phase stationnaire puis lavées deux fois avec du milieu MgM avant d'être reprises dans un volume de MgM égal à celui de la culture initiale en BHI. Les cellules ont ensuite été incubées 4 h à 37 °C sous agitation avant d'être collectées et de procéder à l'extraction du PG. Le PG issu de cellules cultivées en BHI et en MgM a été analysé en RP-HPLC.

Sous ces conditions, les profils muropéptidiques obtenus en milieu BHI et en milieu MgM se sont révélés similaires aux chromatogrammes obtenus en milieu GM17 (résultats non présentés).

Les mêmes expériences ont également été conduites sur le PG issu du mutant *sigV* et aucune différence significative n'a pu être observée entre son PG et celui de la souche sauvage.

II. 8. Purification de la protéine EF1843

Du fait de la présence de nombreux segments hydrophobes prédits dans la protéine EF0783, nous n'avons pas entrepris sa surexpression.

Pour étudier la fonction de la protéine EF1843, nous avons entrepris la surexpression et la purification de celle-ci chez *E. coli*. La protéine EF1843 a été surexprimée grâce au vecteur d'expression pQE31 (Qiagen). Ce plasmide permet le clonage d'un gène sous la dépendance d'un promoteur inductible à l'IPTG et permet l'ajout en 5' de ce gène d'une séquence de purification codant six résidus histidine (His₆-tag). Ces résidus permettent à la protéine recombinante d'acquérir une affinité pour les métaux divalents tels que le Ni⁺⁺ facilitant ainsi, sa purification par chromatographie d'affinité. Afin de prévenir les problèmes rencontrés lors de l'expression de séquences protéiques hydrophobes, nous avons cloné dans le vecteur

pQE31, le cadre ouvert de lecture de la protéine EF1843 dépourvu de son peptide signal. Ce vecteur nous a permis la surexpression et la purification de la protéine EF1843 (Figure 30).

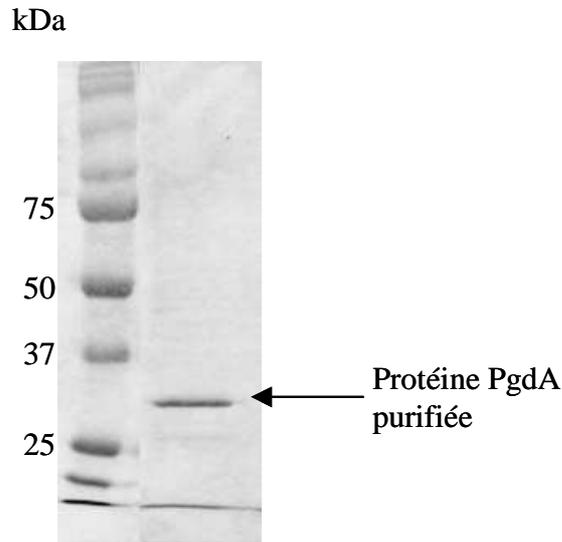


Figure 30 : Analyse en SDS-PAGE de l'extrait protéique obtenu après surexpression de la protéine EF1843 et purification par chromatographie d'affinité.

II. 9. Analyse de l'expression de EF1843 et de son incidence sur la structure du PG

Les différents résultats obtenus pour le gène EF1843 soulèvent la question de savoir s'il est exprimé dans la souche JH2-2 et quel est son effet potentiel sur la structure du PG.

Pour répondre à cela, nous avons comparé les niveaux d'expression de EF1843 dans différents milieux de culture avec ceux relevés dans des souches issues de macrophages péritonéaux de souris. Les résultats obtenus montrent que EF1843 est exprimé faiblement mais qu'il est $15,1 \pm 0,08$ fois plus exprimé dans des cellules cultivées en milieu BHI que dans des cellules issues de macrophages.

De plus, afin d'établir si la protéine EF1843 a une fonction de PG dé-*N*-acétylase, nous l'avons incubée sous sa forme purifiée avec du PG dans les conditions permettant la dé-*N*-acétylation comme décrit pour l'action de PgdA de *S. pneumoniae* (2 μ g d'enzyme ont été incubés avec 0,5 mg de PG de la souche JH2-2 d'*E. faecalis* dans un tampon CoCl₂ 100 μ M, Bis Tris 50 mM à pH 7 pendant 4 h à 37 °C (249). A la suite de cette incubation, l'analyse RP-HPLC n'a pas montré de modification significative de la structure du PG (résultats non présentés).

II. 10. Discussion et conclusion

La recherche par analyse *in silico* de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lysozyme chez *E. faecalis* a permis d'identifier 3 gènes candidats : EF1843, EF0783 et EF0590.

La combinaison des résultats obtenus par l'analyse phénotypique et par PCR montrent que la répartition du gène EF1843 peut avoir une incidence sur la résistance au lysozyme. Cependant, la corrélation entre la présence du gène EF1843 et le phénotype de résistance au lysozyme reste faible. Bien que la présence du gène EF1843 semble avoir un lien avec la résistance au lysozyme, sa présence ne détermine pas, à elle seule, la capacité à résister au lysozyme.

La détection de EF0783 dans les 146 souches testées ne permet pas de conclure à l'implication ou non de ce gène dans la résistance au lysozyme. Bien que sa présence semble indépendante de la résistance au lysozyme, nous ne pouvons pas exclure le fait qu'une variation d'expression de ce gène puisse être à l'origine des variations de sensibilité observées. Seule l'analyse phénotypique d'une souche dépourvue de ce gène permettrait dans cette situation de conclure ou non à l'implication du gène EF0783 dans la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*.

La présence de EF0590 n'étant pas corrélée à la capacité de résister au lysozyme, on peut en conclure que ce gène n'est probablement pas impliqué dans ce phénomène. Ce gène n'a pas été d'avantage étudié.

L'analyse des muropeptides isolés de la souche sauvage d'*E. faecalis* a révélé la présence de différents pics montrant une masse supérieure de 42 Da à celle des muropeptides classiquement décrits (Tableau 9 et Figure 28). Cela suggère fortement la présence d'un groupement acétyle additionnel dans les composés formant ces pics. Le PG du mutant Δ EF0783 ne possède pas ces pics, cela indique que le gène EF0783 est impliqué dans la *O*-acétylation du PG comme précédemment décrit pour son homologue : le gène *oatA* de *S. aureus* (193). Cette acétylation intervient au niveau du groupement C6-OH du résidu NAM, comme nous l'avons démontré par analyse en MALDI-PSD et en accord avec des études précédentes (184, 246, 258). Toutes ces données indiquent que EF0783 code une *O*-acétyltransférase NAM-spécifique et nous proposons de renommer ce gène : *oatA*.

L'alignement de la protéine codée par EF1843 avec trois *N*-acétylglucosamine déacétylases (Figure 22) montre que les résidus catalytiques et les résidus interagissant avec des ions métalliques, conservés chez les membres de la famille 4 des carbohydre estérases

(248, 249), sont présents chez toutes ces protéines. En dépit de ces homologies et bien que EF1843 soit 15 fois plus exprimé en milieu BHI qu'au sein de macrophages péritonéaux de souris, aucun muropeptide dé-*N*-acétylé n'a été identifié et aucune différence majeure n'a été observée entre les profils de muropeptides de la souche parentale d'*E. faecalis* et ceux du mutant Δ EF1843 cultivé en BHI, GM17 ou en milieu MgM. De plus, aucune activité dé-*N*-acétylase n'a été identifiée après l'analyse HPLC de PG purifié soumis à l'action de la protéine recombinante EF1843. Ces données suggèrent que EF1843 n'a pas d'activité PG dé-*N*-acétylase. Ceci est en accord avec la littérature puisque à notre connaissance, aucun PG dé-*N*-acétylé n'a été identifié lors de précédentes analyses de la structure du PG de souches d'*E. faecalis*.

On peut concevoir que la *O*-acétylation des NAM joue un rôle dans le contrôle de l'activité des autolysines chez les entérocoques. Il a été montré qu'*E. faecalis* produit différents types d'autolysines qui hydrolysent préférentiellement soit du PG *O*-acétylé soit du PG non-*O*-acétylé (142). Vollmer *et al.* (198) ont émis l'hypothèse que la dé-*N*-acétylation pouvait aussi être impliquée dans la régulation des autolysines. Toutefois, aucune différence de morphologie, de taux de croissance exponentiel ou d'autolyse de culture en phase stationnaire n'a été observée entre les mutants Δ EF0783, Δ EF1843 et Δ EF0783- Δ EF1843 et la souche sauvage (résultats non présentés). Ceci indique que ces gènes n'ont apparemment pas un rôle clé dans la régulation des processus autolytiques chez *E. faecalis*.

Chez de nombreuses bactéries, la résistance au lysozyme a été montrée comme étant directement proportionnelle aux niveaux des *O*-acétylation et dé-*N*-acétylation du PG. Les analyses phénotypiques du mutant Δ EF1843 n'ont pas montré de diminution de la résistance au lysozyme. Seul les mutants Δ EF0783 et Δ EF0783- Δ EF1843 présentent une sensibilité au lysozyme exogène (Figure 26). Il faut toutefois noter que la sensibilité au lysozyme des souches non *O*-acétylées reste relative puisque leur croissance est seulement faiblement inhibée en présence de 20 mg/ml de lysozyme. En comparaison, la croissance du mutant *oatA* de *S. aureus* est affectée à 0,8 mg/ml lors d'un test de diffusion en agar, alors que la souche parentale résiste à des concentrations de lysozyme allant jusqu'à 50 mg/ml en milieu liquide (193, 216). D'autre part, de nombreuses bactéries sont très sensibles au lysozyme ; par exemple *L. monocytogenes* ou *S. pneumoniae* montrent respectivement une sensibilité au lysozyme à des concentrations de 10 μ g/ml et 80 μ g/ml (198, 200).

Nous pouvons observer que les trois mutants Δ EF1843, Δ EF0783 et Δ EF0783- Δ EF1843 présentent une résistance plus élevée au lysozyme que le mutant *sigV*. Cela montre que les gènes EF1843 et EF0783 ne sont pas à eux seuls les causes de cette sensibilité.

De manière générale, ces données montrent que EF0783 est impliqué dans la résistance au lysozyme mais suggèrent aussi que la *O*-acétylation et la dé-*N*-acétylation ne sont pas les déterminants majeurs de la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*.

Dans ce travail, nous avons démontré que les gènes EF1843 et EF0783 sont impliqués dans la survie intra-macrophage d'*E. faecalis*. Ce qui suggère que les gènes EF0783 et EF1843 font partie des mécanismes de virulence d'*E. faecalis*. En comparaison avec des études précédentes (259) et avec la cinétique de survie obtenue avec la souche d'*E. coli*, nous pouvons toutefois penser que l'implication de ces facteurs dans la survie intra-macrophage d'*E. faecalis* reste modérée. En effet, la quantité de cellules viables à l'intérieur des macrophages reste tout de même élevée après 72 h d'incubation. Il est possible d'émettre l'hypothèse que la sensibilité du mutant Δ EF0783 dans les macrophages péritonéaux de souris est due à la diminution de sa capacité à résister au lysozyme. Toutefois, cette hypothèse n'explique pas le phénotype observé pour le mutant Δ EF1843. Comme les fractions de PG dégradé sont des motifs moléculaires reconnus par le système immunitaire inné, la modification de la structure du PG pourrait conférer à *E. faecalis*, la capacité d'échapper à ce système de défense comme cela a été montré récemment pour la dé-*N*-acétylation du PG chez *L. monocytogenes* (200). Ainsi, les phénotypes des mutants Δ EF1843, Δ EF0783 et Δ EF0783/ Δ EF1843 pourraient être expliqués par la diminution de la capacité à échapper au système de défense immunitaire.

Comme le PG est un des facteurs moléculaires associé aux pathogènes (pathogen-associated molecular pattern) reconnu par le système immunitaire inné, la *O*-acétylation pourrait conférer à *E. faecalis* la capacité de s'évader de ce système de défense comme cela a été récemment montré pour la dé-*N*-acétylation du PG chez *L. monocytogenes* (200).

Même si le gène EF1843 est moins exprimé au sein de macrophages péritonéaux, ce niveau d'expression semble toutefois suffisant pour conférer un avantage de survie à *E. faecalis* sous des conditions d'infections.

Contrairement au lysozyme, dont le poids moléculaire est de 14 kDa, il est bien établi qu'une faible quantité (moins de 50 μ g/ml) de mutanolysine (une muramidase de 23 kDa de *Streptomyces globisporus* dont l'action n'est pas affectée par la *O*-acétylation du PG) entraîne

généralement une lyse des entérocoques. Cette observation contribue à rejeter l'hypothèse que la faible activité du lysozyme soit due à un encombrement stérique qui l'empêcherait d'accéder à son substrat. Ceci suggère que la résistance au lysozyme serait liée à un phénomène d'inhibition spécifique de l'activité du lysozyme. Plusieurs études ont mis en évidence que le lysozyme possède un mode d'action bactéricide indépendant de son activité enzymatique. Ce mécanisme d'inactivation non enzymatique a été attribué à une déstabilisation de la membrane cytoplasmique due aux propriétés cationiques du lysozyme. Cette propriété semble causer une fuite de matériel cellulaire et/ou induire des phénomènes d'autolyse (163). Cette découverte pourrait expliquer pourquoi l'absence d'une enzyme de modification comme EF0783 a un effet si modéré sur la capacité de résister au lysozyme chez *E. faecalis*.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette bactérie possède des mécanismes autres que la modification du PG, qui inhiberait le mode d'action non enzymatique et/ou non lytique du lysozyme. De tels mécanismes peuvent impliquer des inhibiteurs protéiques sécrétés du lysozyme comme par exemple, les protéines Ivy et Sic décrites respectivement chez *E. coli* (252) et *S. pyogenes* (210). S'ils existent, de tels gènes restent encore à identifier puisque nous n'avons pas trouvé d'homologues à ces gènes dans le génome de la souches d'*E. faecalis* V583.

Une autre possibilité pour expliquer la résistance au lysozyme d'*E. faecalis* est la possible contribution de la réticulation du PG ou encore les WTA qui sont reliés au PG par une liaison phosphoester au niveau de la position C6 du NAM (le même site où intervient la *O*-acétylation) comme récemment montré chez *S. aureus* (216).

Finalement, nous pouvons ajouter que les protéines EF0783 et EF1843 ne sont pas responsables de la sensibilité au lysozyme observée chez le mutant *sigV* précédemment décrit par Benachour *et al.* (221). Il semble de plus, que la protéine EF1843 ne possède pas d'activité dé-*N*-acétylase du PG contrairement à son homologue PgdA de *S. pneumoniae* (198). De manière générale ces résultats montrent que la résistance au lysozyme chez *E. faecalis* constitue un modèle original où la *O*-acétyltransférase du PG EF0783 joue un rôle mais n'est pas le déterminant majeur de la résistance au lysozyme.

Les résultats présentés dans cette partie, ont fait l'objet d'une publication référencée en Annexe 2.

Chapitre III : Recherche par approche globale de déterminants génétiques responsables de la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*

III. 1. Mutagenèse aléatoire chez *E. faecalis* JH2-2

Le mutant *oatA* conservant une forte capacité à résister au lysozyme, nous en avons conclu qu'il devait exister chez *E. faecalis*, d'autres mécanismes inconnus qui en sont la cause. Afin d'identifier ces facteurs, nous nous sommes tourné vers une approche globale consistant à cribler, en présence de lysozyme, une banque de mutants aléatoires de la souche *E. faecalis* JH2-2. L'objectif de cette expérience est de trouver des clones ayant perdu la capacité de croître en présence de lysozyme puis d'identifier le ou les gène(s) interrompus dans ces souches. La banque de mutants choisie qui a été préalablement construite au sein de notre laboratoire (222), est basée sur le système intégratif développé chez *L. lactis* par Law *et al.* (223), sur l'utilisation du vecteur de clonage à répllication conditionnelle pORI19 et du plasmide *helper* pG⁺host₃ (222). Cette banque est simple d'utilisation et nécessite un nombre limité de manipulations pour accéder au génotype d'un mutant d'intérêt. La validité de la banque a été confirmée lors de précédentes études et différents cribles ont permis, la mise en évidence de mutants incapables de fermenter le maltose (260), déficients en tyrosine décarboxylase (261) ou encore sensibles à différents stress physicochimiques (222).

L'objectif de cette étude étant d'identifier les déterminants majeurs intervenant dans la résistance au lysozyme, nous avons choisi d'utiliser une concentration de lysozyme que l'on peut qualifier d'intermédiaire (20 mg/ml). Cette concentration est supérieure aux concentrations inhibant le mutant *sigV* d'*E. faecalis* (<10 mg/ml) et les souches sauvages de *L. lactis* (<3 mg/ml) (201) mais est inférieure aux concentrations permettant d'inhiber la croissance du mutant *oatA* (>40 mg/ml). Nous avons choisi cette concentration dans le but de sélectionner un nombre restreint de souches présentant des déficiences dans des facteurs spécifiques de la résistance au lysozyme. En effet, l'utilisation d'une concentration plus élevée en lysozyme aurait certainement inhibé la croissance de nombreuses souches ayant des déficiences physiologiques indirectement liées à la présence de lysozyme dans la culture. De plus, la concentration de lysozyme utilisée inhibant la croissance du mutant *sigV* nous pouvons nous attendre à identifier des souches déficientes dans ce gène lors de cette expérience.

La réalisation de ces expériences n'a pas permis d'isoler de clones sensibles au lysozyme parmi les 9600 clones testés. Le mutant *sigV*, déposé en tant que témoins négatifs n'a pas montré de croissance lors de cette expérience.

III. 2. Recherche des membres du régulon *sigV* par étude protéomique

Afin de poursuivre la recherche des facteurs responsables de la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*, nous avons pris comme point de départ, l'étude réalisée au sein de notre laboratoire par Benachour *et al.* (221). Lors de cette étude, il a été mis en évidence qu'une souche présentant une déficience du facteur sigma ECF SigV présentait une sensibilité au lysozyme accrue. Lors de cette étude, des membres potentiels du régulon *sigV* ont été identifiés (tel que le gène EF1843) mais cela n'a pas permis d'identifier de candidats potentiels expliquant la sensibilité au lysozyme du mutant *sigV*.

Pour identifier ces gènes, nous avons effectué des expériences d'électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons comparé les profils protéiques des souches JH2-2 et *sigV* en présence et en absence de 3 mg/ml de lysozyme (concentration maximale de lysozyme facilement utilisable en milieu GM17). Nous avons identifié 17 spots dont l'intensité varie en fonction des souches et/ou des conditions testées (Figure 31). Les 17 spots d'intérêt ont été prélevés puis analysés par spectrométrie de masse (Tableau 10). 13 protéines différentes ont été identifiées. La différence entre le nombre de spots caractérisés et le nombre de protéines est expliquée par 3 protéines présentes sous différents isoformes ou produits de dégradations sur les gels d'électrophorèse.

Notre étude ayant pour but d'identifier les gènes impliqués dans la résistance au lysozyme chez *E. faecalis*, les protéines potentiellement intéressantes sont : celles induite en présence de lysozyme et/ou celles réprimées chez le mutant *sigV* (potentiels membres du régulon *sigV*) . Parmi les 13 protéines identifiées, 5 ont des profils d'expression cohérents avec nos recherches :

- Fumarate réductase : quinol oxydase qui catalyse l'étape finale de respiration anaérobie en utilisant le fumarate comme accepteur final d'électron
- Facteur d'élongation Tu (EF-Tu) : sa fonction biologique est d'orienter de façon correcte l'aminoacyl-ARNt sur le site "A" du ribosome
- Séryl-ARNt synthétase 1 (SerS1) : une enzyme qui catalyse l'attachement de la sérine sur l'un des cinq ARNt spécifiques de cet acide aminé

- Catabolite control proteinA (CcpA) : régulateur transcriptionnel impliqué dans la répression catabolique

- Carbamate kinase (ArcC1) : catalyse la dernière réaction de la voie de dégradation de l'arginine (l'analyse de la séquence promotrice de ce gène indique qu'il serait régulé par CcpA (262) et pas par *sigV* (221)).

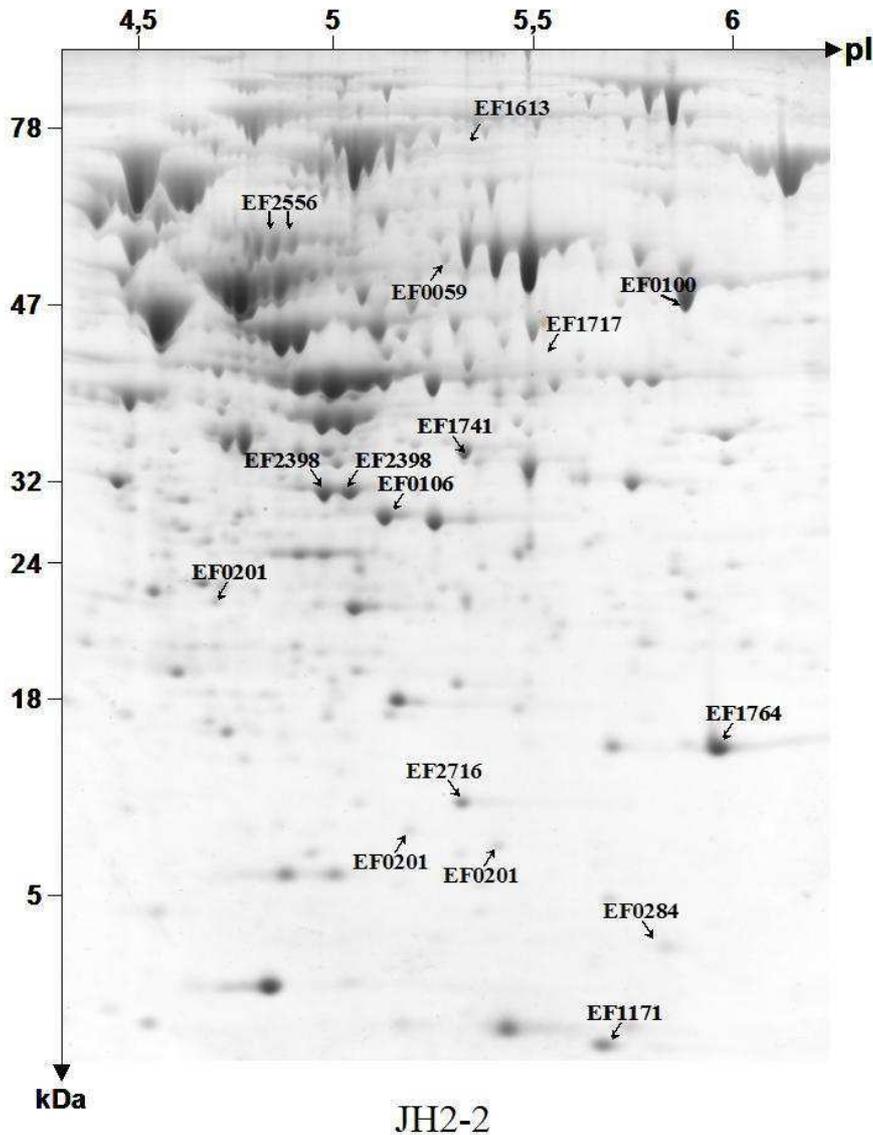


Figure 31 : Séparation par électrophorèse bi-dimensionnelle des protéines totales de la souche d'*Enterococcus faecalis* JH2-2.

Les protéines indiquées par une flèche sont induites ou réprimées par la mutation du gène *sigV* et/ou par la présence de lysozyme dans le milieu de culture comme indiqué dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Conditions d'expression et identification des protéines d'intérêt sélectionnées lors des expériences d'électrophorèses bidimensionnelles (Figure 31).

JH2-2 ^a		<i>sigV</i> ^a		Locus ^b	Nom ^b	Fonction ^b	pI obs ^c	MM obs (kDa) ^c	pI th ^d	MM th (kDa) ^d	Meilleur Score Sp ^e	Nbe de peptides ^f
GM17	GM17 + lysozyme	GM17	GM17 + lysozyme									
	x		x	EF2556		Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	4.90	55.0	5.04	53.8	2285	14
	x		x	EF2556		Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	4.85	55.0	5.04	53.8	2024	29
	x			EF0201*	Tuf	Translation elongation factor Tu	5.15	18.0	4.46	43.4	2576	5
	x			EF0201*	Tuf	Translation elongation factor Tu	5.40	17.0	4.46	43.4	2554	5
x	x			EF0100	SerS1	Seryl-t-RNA synthetase 1	5.90	49.0	6.16	47.9	1521	16
x	x			EF0106	ArcC1	Carbamate kinase	5.10	28.0	4.92	32.9	1534	8
x	x			EF1741	CcpA	Catabolite control proteinA	5.30	35.0	5.02	36.2	1210	17
x		x		EF0284	FabZ1	(3R)-hydroxymyristoyl-(acyl carrier protein) dehydratase	5.80	15.0	5.80	16.2	2060	5
x		x		EF1171	RpmE	Ribosomal protein L31	5.65	10.0	5.68	10.1	1276	4
x		x		EF1764	YfiA	Ribosomal subunit interface protein	5.90	21.0	5.92	21.2	1816	9
		x	x	EF1613	PflB	Formate acetyltransferase	5.35	85.0	5.17	84.6	1625	13
		x	x	EF1717	PyraA	Carbamoyl-phosphate synthase small subunit	5.55	42.0	5.75	39.5	1702	3
		x	x	EF2716	RplJ	Ribosomal protein L10	5.30	19.0	5.09	17.6	1911	11
	x	x	x	EF0059	GlmU	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	5.25	49.0	5.12	49.5	1299	9
x		x	x	EF2398	RpsB	Ribosomal protein S2	4.90	30.0	4.71	29.5	1600	13
x		x	x	EF2398	RpsB	Ribosomal protein S2	5.05	30.0	4.71	29.5	1159	5
x				EF0201*	Tuf	Translation elongation factor Tu	4.60	23.0	4.46	43.4	1810	4

^a La présence d'une croix dans cette colonne signifie que la protéine est exprimée dans les conditions indiquées.

^b Les loci, noms communs et fonctions des protéines sont ceux donnés par le site www.tigr.org.

^c obs : point isoélectrique (pI) et masse moléculaire (MM) observés sur le gel d'électrophorèse bi-dimensionnel.

^d th : point isoélectrique et masse moléculaire théoriques d'après le site www.tigr.org.

^e Sp : score Sequest ; un score Sp supérieur à 800 est considéré comme significatif.

^f Le nombre minimum de peptides séquencés pour valider l'identification de la protéine est de 2.

* Produits de dégradation de la protéine EF0201.

III. 3. Recherche des membres du régulon *sigV* par approche transcriptomique

Benachour *et al.* ont montré précédemment que l'expression du gène *sigV* est induite par un choc thermique (221). Pour se placer dans des conditions où le gène *sigV* est exprimé, nous avons fait subir à des cultures en phase exponentielle de croissance, un choc thermique à 50 °C pendant 10 min avant l'extraction des ARN utilisés pour les expériences de microarrays. Les échantillons ont été préparés à partir de trois extractions d'ARN indépendantes effectuées sur 3 cultures pour chacune des souches (JH2-2 et mutant *sigV*). Les ARN ont ensuite été regroupés afin d'obtenir un échantillon représentatif des ARN de chaque souche. Ces ARN sont utilisés pour la synthèse d'ADNc à l'aide d'une transcriptase inverse. A la suite de cela, les échantillons ont été envoyés à la société NimbleGenTM Systems Inc. pour hybrider des microarrays contenant des oligonucléotides représentatifs de tous les gènes du génome de la souche V583 d'*E. faecalis*.

Les facteurs sigma ECF sont des sous-unités de l'ARN polymérase ayant pour rôle d'activer la transcription des gènes cibles, ils sont reconnus comme des activateurs de transcription plutôt que comme des inhibiteurs de transcription. Ainsi, les membres potentiels du régulon *sigV* sont à rechercher dans les gènes moins exprimés dans le mutant *sigV* que dans la souche JH2-2. Arbitrairement, nous avons considéré comme membres potentiels du régulon *sigV* les 40 gènes les moins exprimés dans le mutant *sigV* par rapport à la souche JH2-2 (Tableau 12). De plus, nous avons reporté dans le Tableau 11 les facteurs d'induction obtenus pour divers gènes d'intérêts.

Tableau 11 : Facteurs d'inhibition de plusieurs gènes d'intérêt.

Conditions d'identification	Locus	Nom	Facteurs d'inhibition ^a
Gènes d'intérêt	EF3180	<i>sigV</i>	1,91
	EF0783	<i>oatA</i>	0,92
Gènes dont les protéines sont réprimées en absence de <i>sigV</i> (Electrophorèse 2D)	EF2556	Fumarate réductase	1,08
	EF0201	<i>Tuf</i>	0,66
	EF0100	<i>SerCI</i>	0,38
	EF1741	<i>ccpA</i>	0,59
	EF0106	<i>ArcCI</i>	0,52
Séquences promotrices similaires à celle de <i>sigV</i> (221)	EF0159		0,89
	EF1934		1,14
	EF0315		0,88
	EF1843		1,66

^a Correspond au rapport de : expression du gène dans la souche JH2-2/expression du gène dans le mutant *sigV*.

Tableau 12 : Liste des 40 gènes les moins exprimés dans le mutant *sigV* par rapport à la souche JH2-2.

Locus ^a	Nom ^a	Fonction ^a	Facteur d'inhibition ^b
EF0374		lipoprotein, putative	2,51
EF0415		hypothetical protein	2,37
EF0633	TryS-1	tyrosyl-tRNA synthetase	2,47
EF0773		hypothetical protein	2,39
EF0793		ABC transporter, ATP-binding protein	2,51
EF0798		hypothetical protein	2,69
EF0891		aspartate aminotransferase	2,35
EF0892		amino acid ABC transporter, ATP-binding protein	3,57
EF0893		amino acid ABC transporter, amino acid-binding/permease protein	2,64
EF0908		hypothetical protein	2,46
EF0913		transposase, putative	2,46
EF0928		glucose uptake protein	3,42
EF0929		amino acid permease family protein	2,43
EF1099		collagen adhesin protein	2,38
EF1118		amino acid ABC transporter, permease protein	2,61
EF1189		hypothetical protein	2,48
EF1220		spermidine/putrescine ABC transporter, ATP-binding protein	2,38
EF1246		hypothetical protein	2,37
EF1561	AroE	shikimate 5-dehydrogenase	2,59
EF1592		ABC transporter, ATP-binding/permease protein	3,67
EF1593		ABC transporter, ATP-binding/permease protein	3,22
EF1595		MutT/nudix family protein	3,52
EF1598	PhrB	deoxyribodipyrimidine photolyase	2,47
EF1606		glycosyl hydrolase, family 1	2,62
EF1995		hypothetical protein	2,46
EF2049		ABC transporter, permease protein, putative	2,31
EF2209		hypothetical protein	2,46
EF2503		hypothetical protein	2,41
EF2504		hypothetical protein	2,50
EF2771		hypothetical protein	2,68
EF2773		major facilitator family transporter	2,77
EF2986		ABC transporter, ATP-binding protein	2,41
EF3078		hypothetical protein	2,33
EF3184		hypothetical protein	2,32
EF3185		hypothetical protein	2,76
EF3186		hypothetical protein	3,62
EF3210		PTS system, IIA component, putative	3,22
EF3211		PTS system, IIB component	2,44
EF3212		PTS system, IIC component	2,64
EF3239		hypothetical protein	2,39

Les séries de gènes grisés ont une organisation génétique compatible avec une expression opéronique.

^a Locus, noms communs et fonctions des protéines sont ceux donnés par le site www.tigr.org.

^b Correspond au rapport de : expression du gène dans la souche JH2-2/expression du gène dans le mutant *sigV*.

III. 4. Conclusion

Nous avons utilisé 3 approches globales différentes pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la résistance au lysozyme d'*E. faecalis*.

La première, basée sur le criblage d'une banque de mutants insertionnels n'a pas permis l'identification de souches sensibles au lysozyme. Afin d'expliquer ce résultat, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, cette banque de mutants ayant été construite dans une souche sauvage d'*E. faecalis*, il est possible que l'activité de la protéine OatA, ait compensé la mutation d'autres facteurs intervenant dans la résistance au lysozyme. Toutefois, le mutant *sigV*, bien que sensible au lysozyme, présente un niveau de *O*-acétylation comparable à celui d'une souche sauvage. Il est donc peu probable que la présence de *O*-acétylation permette de masquer complètement un phénotype de sensibilité. Par contre, il est envisageable que les facteurs intervenant dans la résistance au lysozyme aient un caractère essentiel pour la cellule.

Le fait de ne pas avoir identifié de souche déficiente pour le gène *sigV*, peut être expliqué par la nature de la banque d'ADN utilisée pour réaliser la mutagenèse aléatoire. Cette banque est constituée d'une digestion partielle de l'ADN chromosomique de la souche d'*E. faecalis* JH2-2, dont les fragments ont une taille comprise entre 200 et 1500 pb (avec une moyenne de 420 pb). Cela implique que des gènes de taille réduite comme l'est *sigV* (498 pb) ont une probabilité plus faible d'être interrompus lors de la mutagenèse. Dans l'hypothèse où le(s) gène(s) intervenant dans la résistance au lysozyme sont de petites tailles, il est possible que ceux-ci n'aient pas non plus été interrompus lors de l'étape de mutagenèse.

Afin de palier au problème de la présence du gène *oatA*, il peut être envisagé d'effectuer une mutagenèse aléatoire dans une souche délétée de ce gène. Toutefois, cela ne réglerait pas les problèmes dus au fait que certains gènes sont essentiels et que ceux de petite taille peuvent passer au travers du crible. Alternativement, une approche basée sur la création d'une banque de surexpression transformée dans le mutant *sigV* permettrait certainement de cribler l'ensemble des gènes de la bactérie d'une manière plus exhaustive. Il faut toutefois noter que la surexpression de certains gènes peut se révéler toxique pour la cellule, comme cela a été montré pour OatA chez *L. lactis* (201).

La deuxième technique que nous avons utilisée, est basée sur la recherche par électrophorèse bidimensionnelle de membres du régulon *sigV* (potentiellement impliqués dans la sensibilité au lysozyme) et de protéines induites en présence de lysozyme. Nos expériences ont permis l'identification de 5 protéines dont l'expression varie en réponse à la

mutation de *sigV* et/ou la présence de lysozyme. A notre connaissance, aucun lien direct n'a été mis en évidence entre ces protéines et la résistance au lysozyme. Des homologues de ces protéines sont retrouvés dans de nombreuses espèces bactériennes sans que leur présence ne soit corrélée à la capacité de résister à l'action du lysozyme (données non présentées). Ainsi, bien que les variations d'expression de ces protéines semblent liées à des modifications physiologiques de la cellule en réponse au lysozyme et/ou à l'absence de *sigV*, elles ne semblent pas constituer de bon candidats pour expliquer la résistance au lysozyme d'*E. faecalis*. Par nature, l'analyse protéomique ne permet qu'une analyse partielle des protéines d'une bactérie. Ainsi, pour compléter la recherche des facteurs potentiellement impliqués dans la résistance au lysozyme chez *E. faecalis* nous avons mis en place des expériences d'analyse en microarrays. Cette technique constitue probablement le meilleur moyen d'identifier d'une manière globale, les cibles d'un régulateur transcriptionnel.

Les expériences de microarrays révèlent plusieurs gènes inhibés en présence de *sigV*. De manière générale, les facteurs d'inhibition des gènes du mutant *sigV* par rapport à ceux de la souche JH2-2 sont relativement faible (<3,7). Parmi ces gènes, 16 font partie de 6 structures potentiellement polycistroniques. Ceci suggère que les résultats obtenus ne sont pas simplement dus à un phénomène stochastique mais correspondent à une réalité biologique. Parmi ces 40 gènes, 3 ont une fonction clairement attribuée mais ne semblent pas directement liés avec la paroi et/ou la sensibilité au lysozyme.

Dans cette expérience, le facteur d'inhibition de *sigV* est de 1,91. Le mutant *sigV* est un mutant ponctuel il est donc normal d'observer l'expression de son transcrit. L'expression de ce gène étant autorégulée il est logique que l'inactivation du gène inhibe son expression.

Les facteurs d'inhibition d'EF0783 et d'EF1843 sont respectivement de 0,92 et de 1,66 et ceux des gènes possédant une séquence promotrice proche de celle de *sigV* (221) sont tous très proche de 1.

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'analyse HPLC de la structure du PG qui montrent que la sensibilité au lysozyme du mutant *sigV* n'est pas due à une déficience du PG en *O*-acétylation. De plus, EF1843 bien que n'influençant pas la structure du PG semble effectivement régulé par SigV. Les autres gènes ayant une séquence promotrice proche de celle de *sigV* ne sont pas inhibés dans le mutant *sigV*, ils ne semblent donc pas régulés par SigV. Sur la base de ces résultats, il est difficile affirmer que les gènes identifiés sont des membres du régulon *sigV* (et/ou des gènes impliqués dans la résistance au lysozyme).

Pour mieux cerner les membres du régulon *sigV* nous prévoyons de chercher dans les séquences promotrices des gènes identifiés, des séquences consensus potentiellement

reconnues par *sigV*. Pour cela, il est envisagé d'utiliser le logiciel iMoMi (interactive Motif Mining), développé par Pons *et al.* (263). Cela devrait permettre l'identification d'une séquence consensus commune aux gènes du régulon *sigV* et d'identifier les membres de celui-ci. De plus, afin d'obtenir des facteurs d'induction plus importants, d'autres analyses en microarrays vont être réalisées à partir de souches surexprimant le gène *sigV*. Une fois l'appartenance des gènes candidats au régulon *sigV* confirmée des expériences de mutagenèse pourront être mises en place pour caractériser les gènes responsables de la sensibilité au lysozyme du mutant *sigV*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Enterococcus faecalis, bactérie commensale du tractus intestinal est également un pathogène humain opportuniste responsable d'infections nosocomiales. Cette bactérie est capable de se maintenir dans de nombreuses niches écologiques où, grâce à ses facultés d'adaptation et de résistance importantes, elle peut faire face à des conditions de vie parfois hostiles. Elle est également capable de coloniser l'hôte et de survivre même à l'intérieur de cellules vouées à la défense immunitaire comme les macrophages. Essayer de comprendre cette transition de l'état de commensal à celui de pathogène avéré constitue la thématique de notre laboratoire qui vise à identifier les facteurs de virulence potentiels chez cette bactérie. Sachant que la plupart de ces facteurs font partie des protéines sécrétées ou de surface, nous avons retenu comme candidats potentiels les gènes EF2224 et EF3054 suite à une analyse transcriptomique par hybridation différentielle. Les premières analyses de ces gènes codant des protéines associées à l'enveloppe cellulaire ne montrent pas de liens évidents avec la virulence d'*E. faecalis*. Cette démarche constitue tout de même une bonne approche dans l'investigation des facteurs de virulence. En effet, deux études indépendantes, menées sur un grand nombre de souches (30 et 106) de différentes origines montrent que chez *E. faecalis*, les facteurs de virulence et les gènes de résistance aux antibiotiques sont retrouvés aussi bien dans des isolats cliniques que dans des souches d'origine alimentaire ou environnementale (264, 265). Ces résultats indiquent que le caractère opportuniste d'*E. faecalis* ne dépend pas uniquement de la présence des facteurs de virulence mais probablement aussi de la différence d'expression des gènes entre les souches.

L'approche, consistant à rechercher la fonction d'un gène inconnu en faisant subir différents stress à un mutant déficient dans ce gène, s'avère, dans bon nombre de cas, laborieuse et demande généralement la mise en place de moyens importants. Afin d'identifier et de caractériser ces gènes de façon plus ciblée, nous avons choisi d'étudier la manière dont cette bactérie échappe à une enzyme considérée comme l'une des plus importante et des plus répandues du système immunitaire, le lysozyme.

Cette enzyme s'attaque au peptidoglycane (PG), structure que l'on retrouve exclusivement et presque universellement chez les bactéries. Au cours de l'évolution, les pathogènes ont développé de nombreuses stratégies afin d'échapper au contrôle de leur hôte et, par conséquent, à l'action du lysozyme. En effet, il est reconnu depuis 1958 que les bactéries ont développé des stratégies ingénieuses comme la dé-*N*-acétylation (195) et/ou la *O*-acétylation (185, 186) du PG pour contrer l'activité hydrolytique du lysozyme.

L'intérêt d'étudier la résistance au lysozyme chez *E. faecalis* réside dans le fait que cette bactérie est presque insensible à son action puisqu'elle est capable de résister à des

concentrations saturantes de cette enzyme dans un milieu liquide. Pour expliquer cela, la première hypothèse émise est que la résistance au lysozyme d'*E. faecalis* est due à la dé-*N*-acétylation du PG par EF1843 et que la sensibilité du mutant *sigV* est due à la dérégulation de ce gène. L'ensemble de nos expériences a montré que malgré sa forte homologie avec des protéines de dé-*N*-acétylation du PG, EF1843 ne modifie pas cette structure et n'influe pas sur la capacité à résister au lysozyme. Ce gène semble malgré tout impliqué dans la virulence d'*E. faecalis* puisque sa mutation réduit la capacité d'*E. faecalis* à survivre à l'intérieur de macrophages intra-péritonéaux de souris. Les causes de ce phénomène ainsi que le rôle de ce gène dans la physiologie de la bactérie sont, à ce jour, inconnus. Bien que cette protéine ne semble pas dé-*N*-acétyler le PG, la forte homologie de séquence de EF1843 avec les membres de la famille 4 des carbohydrates estérases suggère qu'elle doit certainement dé-*N*-acétyler un polysaccharide tel que la chitine ou l'acétylexylane comme cela a été montré pour d'autres membres de cette famille (266). De plus, la présence d'un peptide signal de sécrétion indique que le substrat de cette enzyme doit avoir une localisation extracellulaire mais ceci reste encore à déterminer.

La deuxième hypothèse émise est que la résistance au lysozyme d'*E. faecalis* est due à la *O*-acétylation du PG par EF0783. Cette hypothèse, confirmée par nos expériences, a permis de nommer le gène EF0783 *oatA* pour *O*-acétyltransférase A.

Bien que nous ayons focalisé notre intérêt sur le rôle de la *O*-acétylation dans la résistance au lysozyme, cette modification semble également jouer un rôle important dans la physiologie cellulaire. En effet, chez *E. faecalis*, la *O*-acétylation est impliquée dans le contrôle de l'activité de plusieurs autolysines (142) et en particulier de l'autolysine A (AtlA, S. Mesnage, communication personnelle). Chez *L. lactis*, la surexpression de *oatA* provoque un arrêt de croissance probablement du aux conséquences d'une forte présence de groupements *O*-acétyles sur l'activité autolytique. La quantité de PG *O*-acétylé a aussi été caractérisée comme étant accrue par l'entrée en phase stationnaire et par le stade VBNC (142). Il semblerait que cette modification permette de stopper la croissance cellulaire en bloquant le métabolisme du PG. Aussi, il serait intéressant de vérifier si le mutant Δ EF0783 est capable de transiter vers un stade VBNC. Une autre étude montre aussi l'importance de la *O*-acétylation du PG dans la physiologie bactérienne puisqu'un mutant *oatA* de *S. pneumoniae* montre une sensibilité accrue à la pénicilline (190), caractéristique qu'il faudrait vérifier chez *E. faecalis*.

Le fait que le taux de *O*-acétylation varie dans le temps en fonction de la phase de croissance soulève la question de la répartition (homogène ou non) de cette modification à la

surface de la cellule. En effet, cette modification qui intervient dans la régulation de l'activité des autolysines pourrait jouer un rôle dans la formation du septum de division par la détermination des sites où l'autolyse est requise ou indésirable. Ceci est confirmé par l'observation que la mutation du gène *oatA* provoque la formation de longues chaînettes chez *L. lactis* (201). Ce phénomène n'a pas été mis en évidence pour le mutant Δ EF0783 d'*E. faecalis* ce qui suggère que rôle de la *O*-acétylation dans la régulation des autolysines n'est pas identique pour toutes les bactéries.

Etant donné les rôles multiples de la *O*-acétylation dans la physiologie bactérienne, il s'avère nécessaire, pour la cellule, de contrôler finement son expression. Récemment, l'identification de deux régulateurs chez *L. lactis* a permis de suggérer une cascade de régulation permettant, en réponse à un stress de l'enveloppe bactérienne, l'induction de *oatA*. Cette cascade, initiée par un stress pariétal, active le système à deux composantes CesSR. Cette activation induit l'expression du gène *spxB*, dont la protéine interagit avec l'ARN polymérase et conduit à l'expression de différents gènes dont fait partie *oatA* (201). Il n'existe pas d'équivalent du gène *spxB* chez *E. faecalis* mais un homologue du système à deux composantes CesSR a été identifié. Nommé HK-RR03, ce système est impliqué dans la réponse à la bacitracine, antibiotique agissant sur la paroi (267). Cette observation est cohérente avec la fonction de senseur de stress pariétal attribuée à son homologue et il serait donc intéressant de vérifier si RR03 régule EF0783.

Dans l'ensemble, les résultats présentés indiquent que la *O*-acétylation participe à la résistance au lysozyme mais n'en est pas le déterminant majeur chez *E. faecalis*. D'après une publication récente (179), l'explication de cette observation résiderait dans l'activité peptide cationique antimicrobienne (CAMP) du lysozyme. En effet, c'est la résultante des résistances conjuguées aux actions muramidases (conférées par *OatA*) et CAMP (due à la D-alanylation des acides téichoïques par les protéines codées par l'opéron *dlt*) qui est responsable de la résistance au lysozyme chez *S. aureus* (179). Cette découverte semble très prometteuse et permettrait d'expliquer la résistance au lysozyme observée chez le mutant Δ EF0783. En effet, il a été montré qu'*E. faecalis* modifie aussi ses acides téichoïques par D-alanylation grâce à l'opéron *dlt* et que le mutant *dltA* présente une sensibilité accrue aux CAMP (268). Ainsi, la D-alanylation des TA pourrait être le facteur responsable de la résistance au lysozyme du mutant Δ EF0783 d'*E. faecalis*. De plus, on peut imaginer que la D-alanylation des LTA est sous le contrôle de *sigV* et que par conséquent, la sensibilité au lysozyme du mutant *sigV* est due à l'absence de D-alanylation des TA. La raison pour laquelle cet opéron n'a pas été

identifié lors du criblage de la banque de mutants d'*E. faecalis* semble être due à la compensation de l'absence de ce gène par la présence des groupements *O*-acétyle, et l'on peut imaginer que la localisation membranaire des protéines codées par l'opéron *dlt* a empêché son identification par électrophorèse bidimensionnelle. Par contre, d'après notre analyse en microarrays, l'expression des gènes de l'opéron *dlt* n'est pas inhibée par l'absence de *sigV*.

Pour vérifier ces hypothèses, il est envisagé de construire différentes combinaisons de simples, doubles et triple mutants des gènes *sigV*, *oatA* et *dlt* et d'évaluer leur degré de sensibilité au lysozyme. Il est également prévu d'étudier le niveau de D-alanylation des TA du mutant *sigV* pour évaluer son rôle dans la régulation de l'opéron *dlt*.

Finalement, si l'existence de ces nombreux mécanismes (dé-*N*-acétylation, *O*-acétylation, *N*-glycolylation, D-alanylation, sécrétion d'inhibiteur protéique...) permettant de résister à l'action d'une seule enzyme du système de défense immunitaire, semble remarquable, cette complexité illustre bien le "dialogue" permanent existant entre les bactéries et leurs hôtes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, and C. M. Fraser.** 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**:2071-2074.
2. **Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Bälz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:31-34.
3. **Köhler, W.** 2007. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**:133-150.
4. **Lancefield, R. C.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**:571-595.
5. **Beargie, R., P. Lynd, E. Tucker, and J. Duhring.** 1975. Perinatal infection and vaginal flora. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **122**:31-33.
6. **Kurrie, E., S. Bhaduri, D. Krieger, W. Gaus, H. Heimpel, H. Pflieger, R. Arnold, and E. Vanek.** 1981. Risk factors for infections of the oropharynx and the respiratory tract in patients with acute leukemia. *J. Infect. Dis.* **144**:128-136.
7. **Deibel, R. H., and J. H. Silliker.** 1963. Food-poisoning potential of the enterococci. *J. Bacteriol.* **85**:827-832.
8. **Mundt, J. O.** 1986. Enterococci. p. 1063–1065. *In* P.H.A. Sneath *et al.* (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
9. **Flahaut, S., P. Boutibonnes, and Y. Auffray.** 1997. Enterococci in human environment. *Can. J. Microbiol.* **43**:699-708.
10. **Benno, Y., K. Suzuki, K. Suzuki, K. Narisawa, W. R. Bruce, and T. Mitsuoka.** 1986. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol.* **30**:521-532.
11. **Enzensberger, R., P. M. Shah, and H. Knothe.** 1985. Impact of oral ciprofloxacin on the faecal flora of healthy volunteers. *Infection* **13**:273-275.
12. **Noble, C. J.** 1978. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J. Clin. Pathol.* **31**:1182-1186.
13. **Wheeler, A. L., P. G. Hartel, D. G. Godfrey, J. L. Hill, and W. I. Segars.** 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* **31**:1286-1293.
14. **Foulquié Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**:1-24.
15. **López-Díaz, T. M., J. A. Santos, C. J. Gonzalez, B. Moreno, and M. L. Garcia.** 1995. Bacteriological quality of traditional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft* **50**:503–505.
16. **Thompson, T. L., and E. H. Marth.** 1986. Changes in Parmesan cheese during ripening: microflora-coliforms, enterococci, anaerobs, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft* **41**:201–204.
17. **Magnus, C. A., A. R. McCurdy, and W. M. Ingledew.** 1988. Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. *Can. Inst. Food Sci. Technol. j.* **21**:209–212.
18. **Franz, C. M. A. P., W. H. Holzappel, and M. E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**:1-24.
19. **Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, K. H. Schleifer, and W. H. Holzappel.** 2003. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:105-122.
20. **Wunderlich, P. F., L. Braun, I. Fumagalli, V. D'Apuzzo, F. Heim, M. Karly, R. Lodi, G. Politta, F. Vonbank, and L. Zeltner.** 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J. Int. Med. Res.* **17**:333-338.
21. **Bellomo, G., A. Mangiagle, L. Nicastro, and G. Frigerio.** 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Curr. Ther. Res., Clin. Exp.* **28**:927-936.
22. **Jett, B. D., M. M. Huycke, and M. S. Gilmore.** 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:462-478.
23. **Megran, D. W.** 1992. Enterococcal endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **15**:63-71.
24. **Jones, R. N., S. A. Marshall, M. A. Pfaller, W. W. Wilke, R. J. Hollis, M. E. Erwin, M. B. Edmond, and R. P. Wenzel.** 1997. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **29**:95-102.

25. **Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, and R. P. Gaynes.** 1999. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.* **27**:887-892.
26. **Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, R. P. Gaynes, and t. N. N. I. S. System.** 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**:510-515.
27. **Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales.** 2007. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, juin 2006 Résultats préliminaires, 12 janvier 2007.
28. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**:46-65.
29. **Porwancher, R., A. Sheth, S. Remphrey, E. Taylor, C. Hinkle, and M. Zervos.** 1997. Epidemiological study of hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: possible transmission by an electronic ear-probe thermometer. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **18**:771-773.
30. **Chenoweth, C., and D. Schaberg.** 1990. The epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **V9**:80-89.
31. **Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157-161.
32. **Uttley, A. H., C. H. Collins, J. Naidoo, and R. C. George.** 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1**:57-58.
33. **Willems, R. J., J. Top, M. van Santen, D. A. Robinson, T. M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann, and M. J. Bonten.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:821-828.
34. **Ang, J., E. Ezike, and B. Asmar.** 2004. Antibacterial resistance. *Indian. J. Pediatr.* **71**:229-239.
35. **Johnson, A. P.** 1994. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:1083-1089.
36. **Wells, C. L., R. P. Jechorek, and S. L. Erlandsen.** 1990. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J. Infect. Dis.* **162**:82-90.
37. **Gentry-Weeks, C. R., R. Karkhoff-Schweizer, A. Pikis, M. Estay, and J. M. Keith.** 1999. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **67**:2160-2165.
38. **Casadevall, A., and L. Pirofski.** 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* **184**:337-344.
39. **Kayaoglu, G., and D. Ørstavik.** 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **15**:308-320.
40. **Leo, M. M., M. C. Tafi, and P. Canepari.** 1998. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:333-339.
41. **Kau, A. L., S. M. Martin, W. Lyon, E. Hayes, M. G. Caparon, and S. J. Hultgren.** 2005. *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. *Infect. Immun.* **73**:2461-2468.
42. **Filloux, A., and I. Vallet.** 2003. Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med. Sci. (Paris)* **19**:77-83.
43. **Clewell, D. B.** 1993. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* **73**:9-12.
44. **Lowe, A. M., P. A. Lambert, and A. W. Smith.** 1995. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* **63**:703-706.
45. **Nallapareddy, S. R., X. Qin, G. M. Weinstock, M. Hook, and B. E. Murray.** 2000. *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* **68**:5218-5224.
46. **Shankar, V., A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl, and M. S. Gilmore.** 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* **67**:193-200.
47. **Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* **68**:2579-2586.
48. **Su, Y. A., M. C. Sulavik, P. He, K. K. Mäkinen, P. L. Mäkinen, S. Fiedler, R. Wirth, and D. B. Clewell.** 1991. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* **59**:415-420.
49. **Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall, and D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176**:7335-7344.
50. **Teng, F., K. D. Jacques-Palaz, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2002. Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infect. Immun.* **70**:2010-2015.

51. **Nannini, E. C., F. Teng, K. V. Singh, and B. E. Murray.** 2005. Decreased virulence of a *gls24* mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model. *Infect Immun* **73**:7772-7774.
52. **Teng, F., E. C. Nannini, and B. E. Murray.** 2005. Importance of *gls24* in virulence and stress response of *Enterococcus faecalis* and use of the Gls24 protein as a possible immunotherapy target. *J Infect Dis* **191**:472-480.
53. **Koch, A. L.** 2003. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:673-687.
54. **Delcour, J., T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, and P. Hols.** 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:159-184.
55. **Schleifer, K. H., and O. Kandler.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**:407-477.
56. **Nanninga, N.** 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:110-129.
57. **Bugg, T. D., and C. T. Walsh.** 1992. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat. Prod. Rep.* **9**:199-215.
58. **Matsushashi, M.** 1994. Utilization of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and cell division: membranes enzymes involved in the final steps of synthesis and the mechanism of their regulation. In: Ghuysen J.-M., and Hakenbeck R. (eds) *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam, pp 55-71.
59. **Rogers, H. J., H. R. Perkins, and J. B. Ward.** 1980. *Microbial cell walls and membranes*. Chapman & Hall., London.
60. **van Heijenoort, J.** 1994. Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit. In: Ghuysen J.-M., and Hakenbeck R. (eds) *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam, pp 39-54.
61. **van Heijenoort, J.** 1998. Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**:300-304.
62. **Ward, J. B.** 1984. Biosynthesis of peptidoglycan: points of attack by wall inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **25**:327-369.
63. **Bhavsar, A. P., and E. D. Brown.** 2006. Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: how spirals and spaces challenge paradigms. *Mol. Microbiol.* **60**:1077-1090.
64. **Höltje, J.-V.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:181-203.
65. **Scheffers, D.-J., and M. G. Pinho.** 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:585-607.
66. **Carballido-López, R.** 2006. Orchestrating bacterial cell morphogenesis. *Mol. Microbiol.* **60**:815-819.
67. **Jones, L. J. F., R. Carballido-López, and J. Errington.** 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**:913-922.
68. **van den Ent, F., L. A. Amos, and J. Lowe.** 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**:39-44.
69. **Carballido-López, R., and J. Errington.** 2003. A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell. Biol.* **13**:577-583.
70. **Daniel, R. A., and J. Errington.** 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**:767-776.
71. **Bi, E., and J. Lutkenhaus.** 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**:161-164.
72. **McCormick, J. R., E. P. Su, A. Driks, and R. Losick.** 1994. Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol. Microbiol.* **14**:243-254.
73. **Matias, V. R. F., and T. J. Beveridge.** 2005. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol. Microbiol.* **56**:240-251.
74. **Matias, V. R. F., and T. J. Beveridge.** 2006. Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**:1011-1021.
75. **Leps, B., H. Labischinski, and H. Bradaczek.** 1987. Conformational behavior of the polysaccharide backbone of murein. *Biopolymers* **26**:1391-1406.
76. **Meroueh, S. O., K. Z. Bencze, D. Heseck, M. Lee, J. F. Fisher, T. L. Stemmler, and S. Mobashery.** 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:4404-4409.
77. **Ellouz, F., A. Adam, R. Ciorbaru, and E. Lederer.** 1974. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**:1317-1325.

78. **Pabst, M. J., N. P. Cummings, T. Shiba, S. Kusumoto, and S. Kotani.** 1980. Lipophilic derivative of muramyl dipeptide is more active than muramyl dipeptide in priming macrophages to release superoxide anion. *Infect. Immun.* **29**:617-622.
79. **Krueger, J. M., J. R. Pappenheimer, and M. L. Karnovsky.** 1982. Sleep-promoting effects of muramyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:6102-6106.
80. **Martin, S. A., M. L. Karnovsky, J. M. Krueger, J. R. Pappenheimer, and K. Biemann.** 1984. Peptidoglycans as promoters of slow-wave sleep. I. Structure of the sleep-promoting factor isolated from human urine. *J. Biol. Chem.* **259**:12652-12658.
81. **Fleming, T. J., D. E. Wallsmith, and R. S. Rosenthal.** 1986. Arthropathic properties of gonococcal peptidoglycan fragments: implications for the pathogenesis of disseminated gonococcal disease. *Infect. Immun.* **52**:600-608.
82. **Rosenthal, R. S., W. Nogami, B. T. Cookson, W. E. Goldman, and W. J. Folkening.** 1987. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect. Immun.* **55**:2117-2120.
83. **Yoshida, H., K. Kinoshita, and M. Ashida.** 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **271**:13854-13860.
84. **Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara.** 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**:702-707.
85. **Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. M. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.-K. Taha, A. Labigne, U. Zathringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott.** 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-Negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**:1584-1587.
86. **Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti.** 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**:8869-8872.
87. **Girardin, S. E., L. H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I. G. Boneca, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, and D. Mengin-Lecreulx.** 2003. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* **278**:41702-41708.
88. **Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna, and G. Nunez.** 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* **278**:5509-5512.
89. **Boneca, I. G.** 2005. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:46-53.
90. **Neuhaus, F. C., and J. Baddiley.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:686-723.
91. **Owen, P., and M. R. J. Salton.** 1975. Isolation and characterization of a mannan from mesosomal membrane vesicles of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **406**:214-234.
92. **Sutcliffe, I. C., and N. Shaw.** 1991. Atypical lipoteichoic acids of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **173**:7065-7069.
93. **Ellwood, D. C., and D. W. Tempest.** 1969. Influence of growth environment on the cell wall anionic polymers in some Gram-positive bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **57**:xv.
94. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:174-229.
95. **Anderton, W. J., and S. G. Wilkinson.** 1985. Structural studies of a mannitol teichoic acid from the cell wall of bacterium N.C.T.C. 9742. *Biochem. J.* **226**:587-599.
96. **Ward, J. B.** 1981. Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **45**:211-243.
97. **Kiriukhin, M. Y., D. V. Debabov, D. L. Shinabarger, and F. C. Neuhaus.** 2001. Biosynthesis of the glycolipid anchor in lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: role of Ypfp, the diglycosyldiacylglycerol synthase. *J. Bacteriol.* **183**:3506-3514.
98. **Lazarevic, V., B. Soldo, N. Medico, H. Pooley, S. Bron, and D. Karamata.** 2005. *Bacillus subtilis* α -phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:39-45.
99. **Soldo, B., V. Lazarevic, P. Margot, and D. Karamata.** 1993. Sequencing and analysis of the divergon comprising *gtaB*, the structural gene of UDP-glucose pyrophosphorylase of *Bacillus subtilis* 168. *J. Gen. Microbiol.* **139**:3185-95.
100. **Emdur, L. I., and T. H. Chiu.** 1974. Turnover of phosphatidylglycerol in *Streptococcus sanguis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**:1137-1144.

101. **Glaser, L., and B. Lindsay.** 1974. The synthesis of lipoteichoic acid carrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**:1131-1136.
102. **Gründling, A., and O. Schneewind.** 2007. Genes required for glycolipid synthesis and lipoteichoic acid anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:2521-2530.
103. **Fischer, W.** 2000. Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res. Microbiol.* **151**:421-427.
104. **Bhavsar, A. P., L. K. Erdman, J. W. Schertzer, and E. D. Brown.** 2004. Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid. *J. Bacteriol.* **186**:7865-7873.
105. **Dubail, I., A. Bigot, V. Lazarevic, B. Soldo, D. Euphrasie, M. Dupuis, and A. Charbit.** 2006. Identification of an essential gene of *Listeria monocytogenes* involved in teichoic acid biogenesis. *J. Bacteriol.* **188**:6580-6591.
106. **D'Elia, M. A., K. E. Millar, T. J. Beveridge, and E. D. Brown.** 2006. Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**:8313-8316.
107. **D'Elia, M. A., M. P. Pereira, Y. S. Chung, W. Zhao, A. Chau, T. J. Kenney, M. C. Sulavik, T. A. Black, and E. D. Brown.** 2006. Lesions in teichoic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus* lead to a lethal gain of function in the otherwise dispensable pathway. *J. Bacteriol.* **188**:4183-4189.
108. **Hughes, A. H., I. C. Hancock, and J. Baddiley.** 1970. Teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem. J.* **132**:83-93.
109. **Lambert, P. A., I. C. Hancock, and J. Baddiley.** 1975. The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *Biochem. J.* **149**:519-524.
110. **Kemper, M. A., M. M. Urrutia, T. J. Beveridge, A. L. Koch, and R. J. Doyle.** 1993. Proton motive force may regulate cell wall-associated enzymes of *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **175**:5690-5696.
111. **Höltje, J. V., and A. Tomasz.** 1975. Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1690-1694.
112. **Schäffer, C., and P. Messner.** 2005. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology* **151**:643-651.
113. **Archibald, A. R.** 1976. Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: development of bacteriophage-binding properties as a result of the pulsed incorporation of teichoic acid. *J. Bacteriol.* **127**:956-960.
114. **Dunny, G. M., B. A. Leonard, and P. J. Hedberg.** 1995. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Bacteriol.* **177**:871-876.
115. **Henneke, P., S. Morath, S. Uematsu, S. Weichert, M. Pfitzenmaier, O. Takeuchi, A. Muller, C. Poyart, S. Akira, R. Berner, G. Teti, A. Geyer, T. Hartung, P. Trieu-Cuot, D. L. Kasper, and D. T. Golenbock.** 2005. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B *Streptococcus*. *J. Immunol.* **174**:6449-6455.
116. **Morath, S., S. von Aulock, and T. Hartung.** 2005. Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *J. Endotoxin. Res.* **11**:348-56.
117. **Tjalsma, H., H. Antelmann, J. D. H. Jongbloed, P. G. Braun, E. Darmon, R. Dorenbos, J.-Y. F. Dubois, H. Westers, G. Zanen, W. J. Quax, O. P. Kuipers, S. Bron, M. Hecker, and J. M. van Dijl.** 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:207-233.
118. **Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. H. Jongbloed, S. Bron, and J. M. van Dijl.** 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:515-547.
119. **Bolhuis, A., E. Koetje, J.-Y. Dubois, J. Vehmaanperä, G. Venema, S. Bron, and J. Maarten van Dijl.** 2000. Did the mitochondrial processing peptidase evolve from a eubacterial regulator of gene expression? *Mol. Biol. Evol.* **17**:198-201.
120. **Eichler, J., and W. Wickner.** 1997. Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30-kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:5574-5581.
121. **Jongbloed, J. D. H., H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron, U. Airaksinen, F. Pries, W. J. Quax, J. M. van Dijl, and P. G. Braun.** 2002. Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **277**:44068-44078.
122. **Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **57**:50-108.
123. **Tjalsma, H., G. Zanen, G. Venema, S. Bron, and J. M. van Dijl.** 1999. The potential active site of the lipoprotein-specific (type II) signal peptidase of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **274**:28191-28197.

124. **Desvaux, M., E. Dumas, I. Chafsey, and M. Hébraud.** 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**:1-15.
125. **Sutcliffe, I. C., and R. R. Russell.** 1995. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **177**:1123-1128.
126. **Dalbey, R. E., and M. Chen.** 2004. Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:37-53.
127. **Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind.** 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* **4**:1603-1605.
128. **Marraffini, L. A., A. C. DeDent, and O. Schneewind.** 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:192-221.
129. **Cossart, P., and R. Jonquières.** 2000. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5013-5015.
130. **Fernández-Tornero, C., R. López, E. García, G. Giménez-Gallego, and A. Romero.** 2001. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**:1020-1024.
131. **Kuroda, A., and J. Sekiguchi.** 1991. Molecular cloning and sequencing of a major *Bacillus subtilis* autolysin gene. *J. Bacteriol.* **173**:7304-7312.
132. **Waligora, A.-J., C. Hennequin, P. Mullany, P. Bourlioux, A. Collignon, and T. Karjalainen.** 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.* **69**:2144-2153.
133. **Steen, A., G. Buist, K. J. Leenhouts, M. E. Khattabi, F. Grijpstra, A. L. Zomer, G. Venema, O. P. Kuipers, and J. Kok.** 2003. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J. Biol. Chem.* **278**:23874-23881.
134. **Jonquières, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart.** 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **34**:902-914.
135. **Brinster, S., S. Furlan, and P. Serror.** 2007. C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **189**:1244-1253.
136. **Sára, M., and U. B. Sleytr.** 2000. S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**:859-868.
137. **Chen, X., J. Xu, J. Shuai, J. Chen, Z. Zhang, and W. Fang.** 2007. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **115**:307-312.
138. **Fujino, T., P. Béguin, and J. P. Aubert.** 1993. Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface. *J. Bacteriol.* **175**:1891-1899.
139. **Lupas, A., H. Engelhardt, J. Peters, U. Santarius, S. Volker, and W. Baumeister.** 1994. Domain structure of the *Acetogenium kivui* surface layer revealed by electron crystallography and sequence analysis. *J. Bacteriol.* **176**:1224-1233.
140. **Cerning, J.** 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **7**:113-130.
141. **Paoletti, L. C., and D. L. Kasper.** 2002. Conjugate vaccines against group B *Streptococcus* types IV and VII. *J. Infect. Dis.* **186**:123-126.
142. **Pfeffer, J. M., H. Strating, J. T. Weadge, and A. J. Clarke.** 2006. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* **188**:902-908.
143. **Smith, T. J., S. A. Blackman, and S. J. Foster.** 2000. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**:249-262.
144. **Koch, A. L., G. Kirchner, R. J. Doyle, and I. D. Burdett.** 1985. How does a *Bacillus* split its septum right down the middle? *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **136A**:91-98.
145. **Wang, J. E., M. K. Dahle, M. McDonald, S. J. Foster, A. O. Aasen, and C. Thiemermann.** 2003. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* **20**:402-414.
146. **Buist, G., G. Venema, and J. Kok.** 1998. Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J. Bacteriol.* **180**:5947-5953.
147. **Laschtschenko, P.** 1909. Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß. *Z. Hyg. Infekt. Krankheiten*:419-426.
148. **Bloomfield, A. L.** 1919. The fate of bacteria introduced in the upper air passages. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **12**:317-322.
149. **Fleming, A.** 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. B*:39:306-317.

150. **Fleming, A.** 1932. Lysozyme. Proc. Roy. Soc.:71-84.
151. **Canfield, R. E.** 1963. The amino acid sequence of egg white lysozyme. J. Biol. Chem. **238**:2698-2707.
152. **Jollès, J., J. Jauregui-Adell, I. Bernier, and P. Jollès.** 1963. La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule : étude détaillée. Biochim. Biophys. Acta **78**:668-689.
153. **Blake, C. C., D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma.** 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. Nature **206**:757-761.
154. **Walsh, M. A., T. R. Schneider, L. C. Sieker, Z. Dauter, V. S. Lamzin, and K. S. Wilson.** 1998. Refinement of triclinic hen egg-white lysozyme at atomic resolution. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **54**:522-546.
155. **Phillips, D. C.** 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. Sci. Am. **215**:78-90.
156. **Jollès, P.** 1996. From the discovery of lysozyme to the characterization of several lysozyme families. Experientia Suppl. **75**:3-5.
157. **Sava, G.** 1996. Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. Exs **75**:433-449.
158. **Karle, H., and N. E. Hansen.** 1974. Lysozyme and leukemia. Diagnostic, prognostic and pathogenic significance of lysozyme measurements. Ugeskr. Laeger. **136**:2451-2455.
159. **Vanderlinde, R. E.** 1981. Urinary enzyme measurements in the diagnosis of renal disorders. Ann. Clin. Lab. Sci. **11**:189-201.
160. **Jones, J. W., S. Su, M. B. Jones, B. T. Heniford, K. McIntyre, and D. K. Granger.** 1999. Serum lysozyme activity can differentiate infection from rejection in organ transplant recipients. J. Surg. Res. **84**:134-137.
161. **Le Moli, S., R. Paganelli, M. C. Sirianni, R. Nisini, I. Quinti, R. Seminara, R. D'Amelio, and F. Aiuti.** 1986. In vitro effects of lysozyme on some specific and non-specific functions of the immune system. Boll. Ist. Sieroter. Milan **65**:283-289.
162. **Bianchi, C.** 1982. Antigenic properties of hen egg white lysozyme (Fleming's lysozyme) and notes on its acute/sub-acute toxicity. Curr. Therap. Res. **31**:494-505.
163. **Masschalck, B., and C. W. Michiels.** 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. Crit. Rev. Microbiol. **29**:191-214.
164. **Proctor, V. A., and F. E. Cunningham.** 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. **26**:359-395.
165. **Masuda, T., N. Ide, and N. Kitabatake.** 2005. Structure-sweetness relationship in egg white lysozyme: role of lysine and arginine residues on the elicitation of lysozyme sweetness. Chem. Senses **30**:667-681.
166. **Jollès, P., and J. Jollès.** 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. Mol. Cell. Biochem. **63**:165-189.
167. **Liu, M., S. Zhang, Z. Liu, H. Li, and A. Xu.** 2006. Characterization, organization and expression of *AmphiLysC*, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. Gene **367**:110-117.
168. **Fastrez, J.** 1996. Phage lysozymes. Exs **75**:35-64.
169. **Höltje, J. V.** 1996. Bacterial lysozymes. Exs **75**:65-74.
170. **Beintema, J. J., and A. C. Terwisscha van Scheltinga.** 1996. Plant lysozymes. Exs **75**:75-86.
171. **Hultmark, D.** 1996. Insect lysozymes. Exs **75**:87-102.
172. **Vocadlo, D. J., G. J. Davies, R. Laine, and S. G. Withers.** 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds *via* a covalent intermediate. Nature **412**:835-838.
173. **Kuroki, R., L. H. Weaver, and B. W. Matthews.** 1993. A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 lysozyme. Science **262**:2030-2033.
174. **Kuroki, R., L. H. Weaver, and B. W. Matthews.** 1999. Structural basis of the conversion of T4 lysozyme into a transglycosidase by reengineering the active site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:8949-8954.
175. **Laible, N. J., and G. R. Germaine.** 1985. Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. Infect. Immun. **48**:720-728.
176. **Ibrahim, H. R., T. Matsuzaki, and T. Aoki.** 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. FEBS Lett. **506**:27-32.
177. **Masschalck, B., D. Deckers, and C. W. Michiels.** 2002. Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure. J. Food. Prot. **65**:1916-1923.
178. **Dommett, R., M. Zilbauer, J. T. George, and M. Bajaj-Elliott.** 2005. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. Mol. Immunol. **42**:903-912.

179. **Herbert, S., A. Bera, C. Nerz, D. Kraus, A. Peschel, C. Goerke, M. Meehl, A. Cheung, and F. Götz.** 2007. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathog* **3**:e102.
180. **Bonifer, C., U. Jägle, and M. C. Huber.** 1997. The chicken lysozyme locus as a paradigm for the complex developmental regulation of eukaryotic gene loci. *J. Biol. Chem.* **272**:26075-26078.
181. **Lefevre, P., S. Melnik, N. Wilson, A. D. Riggs, and C. Bonifer.** 2003. Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**:4386-4400.
182. **Short, M. L., J. Nickel, A. Schmitz, and R. Renkawitz.** 1996. Lysozyme gene expression and regulation. *Exs* **75**:243-257.
183. **Cross, M., and R. Renkawitz.** 1990. Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes. *Embo J.* **9**:1283-1288.
184. **Clarke, A. J., and C. Dupont.** 1992. *O*-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **38**:85-91.
185. **Abrams, A.** 1958. *O*-acetyl groups in the cell wall of *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **230**:949-959.
186. **Brumfitt, W., A. C. Wardlaw, and J. T. Park.** 1958. Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodieticus* and its association with an increased *O*-acetyl content of the cell wall. *Nature* **181**:1783-1784.
187. **Clarke, A. J., H. Strating, and N. T. Blackburn.** 2000. Pathways for the *O*-acetylation of bacterial cell wall polymers, p. 187–223. In R. J. Doyle (ed.), *Glycomicrobiology*. Plenum Publishing Co. Ltd., New York, N.Y.
188. **Dupont, C., and A. J. Clarke.** 1991. Dependence of lysozyme-catalysed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of *O*-acetylation. *Eur. J. Biochem.* **195**:763-769.
189. **Lehman, T. J., J. B. Allen, P. H. Plotz, and R. L. Wilder.** 1985. Bacterial cell wall composition, lysozyme resistance, and the induction of chronic arthritis in rats. *Rheumatol. Int.* **5**:163-167.
190. **Crisóstomo, M. I., W. Vollmer, A. S. Kharat, S. Inhülsen, F. Gehre, S. Buckenmaier, and A. Tomasz.** 2006. Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan *O*-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **61**:1497-1509.
191. **Dillard, J. P., and K. T. Hackett.** 2005. Mutations affecting peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **73**:5697-5705.
192. **Payie, K. G., P. N. Rather, and A. J. Clarke.** 1995. Contribution of gentamicin 2'-*N*-acetyltransferase to the *O* acetylation of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *J. Bacteriol.* **177**:4303-4310.
193. **Bera, A., S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, and F. Götz.** 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan *O*-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **55**:778-787.
194. **Dupont, C., and A. J. Clarke.** 1991. Evidence for N---O acetyl migration as the mechanism for *O* acetylation of peptidoglycan in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **173**:4318-4324.
195. **Araki, Y., S. Fukuoka, S. Oba, and E. Ito.** 1971. Enzymatic deacetylation of *N*-acetylglucosamine residues in peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**:751-758.
196. **Hayashi, H., Y. Araki, and E. Ito.** 1973. Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme. *J. Bacteriol.* **113**:592-598.
197. **Atrih, A., G. Bacher, G. Allmaier, M. P. Williamson, and S. J. Foster.** 1999. Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation. *J. Bacteriol.* **181**:3956-3966.
198. **Vollmer, W., and A. Tomasz.** 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**:20496-20501.
199. **Psylinakis, E., I. G. Boneca, K. Mavromatis, A. Deli, E. Hayhurst, S. J. Foster, K. M. Varum, and V. Bouriotis.** 2005. Peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* **280**:30856-30863.
200. **Boneca, I. G., O. Dussurget, D. Cabanes, M. A. Nahori, S. Sousa, M. Lecuit, E. Psylinakis, V. Bouriotis, J. P. Hugot, M. Giovannini, A. Coyle, J. Bertin, A. Namane, J. C. Rousselle, N. Cayet, M. C. Prévost, V. Balloy, M. Chignard, D. J. Philpott, P. Cossart, and S. E. Girardin.** 2007. A critical role for peptidoglycan *N*-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:997-1002.
201. **Veiga, P., C. Bulbarela-Sampieri, S. Furlan, A. Maisons, M.-P. Chapot-Chartier, M. Erkelenz, P. Mervelet, P. Noirot, D. Frees, O. P. Kuipers, J. Kok, A. Gruss, G. Buist, and S. Kulakauskas.** 2007.

- SpxB regulates *O*-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **282**:19342-19354.
202. **Fukushima, T., T. Kitajima, and J. Sekiguchi.** 2005. A polysaccharide deacetylase homologue, PdaA, in *Bacillus subtilis* acts as an *N*-acetylmuramic acid deacetylase in vitro. *J. Bacteriol.* **187**:1287-1292.
203. **Blair, D. E., and D. M. F. van Aalten.** 2004. Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with *N*-acetyl-glucosamine. *FEBS Lett.* **570**:13-19.
204. **Creagh, E. M., and L. A. J. O'Neill.** 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* **27**:352-357.
205. **Raymond, J. B., S. Mahapatra, D. C. Crick, and M. S. Pavelka, Jr.** 2005. Identification of the *namH* gene, encoding the hydroxylase responsible for the *N*-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **280**:326-333.
206. **Monchois, V., C. Abergel, J. Sturgis, S. Jeudy, and J.-M. Claverie.** 2001. *Escherichia coli* *ykfE* ORF gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme. *J. Biol. Chem.* **276**:18437-18441.
207. **Callewaert, L., B. Masschalck, D. Deckers, D. Nakimbugwe, M. Atanassova, B. Aertsen, and C. W. Michiels.** 2005. Purification of Ivy, a lysozyme inhibitor from *Escherichia coli*, and characterization of its specificity for various lysozymes. *Enzyme Microb. Tech.* **37**:205-211.
208. **Abergel, C., V. Monchois, D. Byrne, S. Chenivresse, F. Lembo, J. C. Lazzaroni, and J. M. Claverie.** 2007. Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:6394-6399.
209. **Åkesson, P., A. G. Sjöholm, and L. Björck.** 1996. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J. Biol. Chem.* **271**:1081-1088.
210. **Binks, M. J., B. A. Fernie-King, D. J. Seilly, P. J. Lachmann, and K. S. Sriprakash.** 2005. Attribution of the various inhibitory actions of the Streptococcal inhibitor of complement (SIC) to regions within the molecule. *J. Biol. Chem.* **280**:20120-20125.
211. **Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, A. Davies, and P. J. Lachmann.** 2002. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect. Immun.* **70**:4908-4916.
212. **Peschel, A.** 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**:179-186.
213. **Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung, and F. Götz.** 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **274**:8405-8410.
214. **Peschel, A., R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W. F. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K. P. M. van Kessel, and J. A. G. van Strijp.** 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* **193**:1067-1076.
215. **Bera, A., R. Biswas, S. Herbert, and F. Götz.** 2006. The presence of peptidoglycan *O*-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect. Immun.* **74**:4598-4604.
216. **Bera, A., R. Biswas, S. Herbert, E. Kulauzovic, C. Weidenmaier, A. Peschel, and F. Götz.** 2007. Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:280-283.
217. **Yagi, Y., and D. B. Clewell.** 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **143**:966-970.
218. **Jacob, A. E., and S. J. Hobbs.** 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* **117**:360-372.
219. **Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Débarbouillé.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6887-6891.
220. **Frère, J., M. Novel, and G. Novel.** 1993. Molecular analysis of the *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* CNRZ270 bidirectional theta replicating lactose plasmid pUCL22. *Mol. Microbiol.* **10**:1113-1124.
221. **Benachour, A., C. Muller, M. Dabrowski-Coton, Y. Le Breton, J.-C. Giard, A. Rincé, Y. Auffray, and A. Hartke.** 2005. The *Enterococcus faecalis* SigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. *J. Bacteriol.* **187**:1022-1035.
222. **Le Breton, Y., A. Mazé, A. Hartke, S. Lemarinié, Y. Auffray, and A. Rincé.** 2002. Isolation and characterization of bile salts-sensitive mutants of *Enterococcus faecalis*. *Curr. Microbiol.* **45**:434-439.
223. **Law, J., G. Buist, A. Haandrikman, J. Kok, G. Venema, and K. Leenhouts.** 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.* **177**:7011-7018.

224. **Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **174**:5633-5638.
225. **Lull, D., P. Veiga, J. Tremblay, and S. Kulakauskas.** 2005. Immobilization-based isolation of capsule-negative mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **151**:1911-1917.
226. **Mercier, C., E. Domakova, J. Tremblay, and S. Kulakauskas.** 2000. Effects of a muramidase on a mixed bacterial community. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**:47-52.
227. **Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
228. **Delogu, G., M. Sanguinetti, B. Posteraro, S. Rocca, S. Zanetti, and G. Fadda.** 2006. The *hbhA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically upregulated in the lungs but not in the spleens of aerogenically infected mice. *Infect. Immun.* **74**:3006-3011.
229. **Brinster, S., B. Posteraro, H. Bierne, A. Alberti, S. Makhzami, M. Sanguinetti, and P. Serror.** 2007. Enterococcal leucine-rich repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response. *Infect. Immun.* **75**:4463-4471.
230. **Meijerink, J., C. Mandigers, L. van de Locht, E. Tönissen, F. Goodsaid, and J. Raemaekers.** 2001. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J. Mol. Diagn.* **3**:55-61.
231. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
232. **Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145.
233. **Holo, H., and I. F. Nes.** 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3119-3123.
234. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
235. **Rabilloud, T., and S. Charmont.** 2000. Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*. Rabilloud, Eds. pp 109-126, Springer press, Berlin.
236. **Sauvageot, N., C. Muller, A. Hartke, Y. Auffray, and J. M. Laplace.** 2002. Characterisation of the diol dehydratase *pdu* operon of *Lactobacillus collinoides*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:69-74.
237. **Anderson, T. F.** 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans N. Y. Acad. Sci.* **13**:130-134.
238. **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.
239. **Courtin, P., G. Miranda, A. Guillot, F. Wessner, C. Mézange, E. Domakova, S. Kulakauskas, and M.-P. Chapot-Chartier.** 2006. Peptidoglycan structure analysis of *Lactococcus lactis* reveals the presence of an L,D-carboxypeptidase involved in peptidoglycan maturation. *J. Bacteriol.* **188**:5293-5298.
240. **Giard, J.-C., E. Riboulet, N. Verneuil, M. Sanguinetti, Y. Auffray, and A. Hartke.** 2006. Characterization of Ers, a PrfA-like regulator of *Enterococcus faecalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**:410-418.
241. **Heng, N. C. K., G. A. Burtenshaw, R. W. Jack, and J. R. Tagg.** 2004. Sequence analysis of pDN571, a plasmid encoding novel bacteriocin production in M-type 57 *Streptococcus pyogenes*. *Plasmid* **52**:225-229.
242. **Ike, Y., H. Hashimoto, and D. B. Clewell.** 1984. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect. Immun.* **45**:528-530.
243. **Manson, J. M., and M. S. Gilmore.** 2006. Pathogenomics of *Enterococcus faecalis*, p. 125-147. In D. U. D. Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker (ed.), *Pathogenomics*.
244. **Rosenthal, R. S., J. K. Blundell, and H. R. Perkins.** 1982. Strain-related differences in lysozyme sensitivity and extent of O-acetylation of gonococcal peptidoglycan. *Infect. Immun.* **37**:826-829.
245. **Rosenthal, R. S., W. J. Folkening, D. R. Miller, and S. C. Swim.** 1983. Resistance of O-acetylated gonococcal peptidoglycan to human peptidoglycan-degrading enzymes. *Infect. Immun.* **40**:903-911.
246. **Swim, S. C., M. A. Gfell, C. E. Wilde, 3rd, and R. S. Rosenthal.** 1983. Strain distribution in extents of lysozyme resistance and O-acetylation of gonococcal peptidoglycan determined by high-performance liquid chromatography. *Infect. Immun.* **42**:446-452.
247. **Meyrand, M., A. Boughammoura, P. Courtin, C. Mézange, A. Guillot, and M.-P. Chapot-Chartier.** 2007. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **153**:3275-3285.

248. **Blair, D. E., O. Hekmat, A. W. Schüttelkopf, B. Shrestha, K. Tokuyasu, S. G. Withers, and D. M. F. vanAalten.** 2006. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry* **45**:9416-9426.
249. **Blair, D. E., A. W. Schüttelkopf, J. I. MacRae, and D. M. F. van Aalten.** 2005. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:15429-15434.
250. **Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore.** 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**:746-750.
251. **Franklin, K., and A. J. Clarke.** 2001. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2238-2244.
252. **Deckers, D., B. Masschalck, A. Aertsen, L. Callewaert, C. G. M. V. Tiggelen, M. Atanassova, and C. W. Michiels.** 2004. Periplasmic lysozyme inhibitor contributes to lysozyme resistance in *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:1229-1237.
253. **Chesbro, W. R.** 1961. Lysozyme and the production of osmotic fragility in enterococci. *Can. J. Microbiol.* **7**:952-955.
254. **Keshav, S., P. Chung, G. Milon, and S. Gordon.** 1991. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J. Exp. Med.* **174**:1049-1058.
255. **Mainardi, J. L., D. Billot-Klein, A. Coutrot, R. Legrand, B. Schoot, and L. Gutmann.** 1998. Resistance to cefotaxime and peptidoglycan composition in *Enterococcus faecalis* are influenced by exogenous sodium chloride. *Microbiology* **144**:2679-2685.
256. **Bouhss, A., N. Josseume, A. Severin, K. Tabei, J.-E. Hugonnet, D. Shlaes, D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, and M. Arthur.** 2002. Synthesis of the L-Alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **277**:45935-45941.
257. **Adkins, J. N., H. M. Mottaz, A. D. Norbeck, J. K. Gustin, J. Rue, T. R. W. Clauss, S. O. Purvine, K. D. Rodland, F. Heffron, and R. D. Smith.** 2006. Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. *Mol. Cell. Proteomics* **5**:1450-1461.
258. **Payie, K. G., H. Strating, and A. J. Clarke.** 1996. The role of O-acetylation in the metabolism of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *Microb. Drug Resist.* **2**:135-140.
259. **Verneuil, N., M. Sanguinetti, Y. Le Breton, B. Posteraro, G. Fadda, Y. Auffray, A. Hartke, and J.-C. Giard.** 2004. Effects of the *Enterococcus faecalis hypR* gene encoding a new transcriptional regulator on oxidative stress response and intracellular survival within macrophages. *Infect. Immun.* **72**:4424-4431.
260. **Le Breton, Y., V. Pichereau, N. Sauvageot, Y. Auffray, and A. Rincé.** 2005. Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* **98**:806-813.
261. **Connil, N., Y. Le Breton, X. Dousset, Y. Auffray, A. Rincé, and H. Prévost.** 2002. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon Involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3537-3544.
262. **Barcelona-Andrés, B., A. Marina, and V. Rubio.** 2002. Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **184**:6289-6300.
263. **Pons, N., J. M. Batto, S. D. Ehrlich, and P. Renault.** 2008. Development of software facilities to characterize regulatory binding motifs and application to streptococcaceae. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**:67-73.
264. **Lepage, E., S. Brinster, C. Caron, C. Ducroix-Crepy, L. Rigottier-Gois, G. Dunny, C. Hennequet-Antier, and P. Serror.** 2006. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J. Bacteriol.* **188**:6858-6868.
265. **McBride, S. M., V. A. Fischetti, D. J. Leblanc, R. C. Moellering, Jr., and M. S. Gilmore.** 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE* **2**:e582.
266. **Caufrier, F., A. Martinou, C. Dupont, and V. Bouriotis.** 2003. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr. Res.* **338**:687-692.
267. **Hancock, L. E., and M. Perego.** 2004. Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* **186**:7951-7958.
268. **Fabretti, F., C. Theilacker, L. Baldassarri, Z. Kaczynski, A. Kropec, O. Holst, and J. Huebner.** 2006. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **74**:4164-4171.

ANNEXE 1

Identification of secreted and surface proteins from *Enterococcus faecalis*

Abdellah Benachour^{a*}, Thierry Morin^a, Laurent Hébert^a, Aurélie Budin-Verneuil^a, André Le Jeune^a, Yanick Auffray^a, Axel Hartke^a, Vianney Pichereau^a

^aLaboratoire de Microbiologie de l'Environnement USC INRA 2017, IFR 146, Université de Caen, Esplanade de la paix, 14032 Caen cedex, France .

Running title: *E. faecalis* secreted and surface proteins

Key words: *Enterococcus faecalis*, secretome, protein expression, protein secretion, virulence factors

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, USC INRA 2017, IFR146, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

Phone: (33) 2 31 56 66 18. Fax : (33) 2 31 56 53 11; Email : abdellah.benachour@unicaen.fr

List of Email of the authors:

abdellah.benachour@unicaen.fr “correspondence and reprints”; thierry.morin@adrianie.org;
laurenthebert2000@yahoo.fr; aurelie.verneuil@unicaen.fr; andre.lejeune@orange.fr;
yanick.auffray@unicaen.fr; axel.hartke@unicaen.fr; vianney.pichereau@unicaen.fr.

1 Abstract

2 Secreted and surface proteins of bacteria are key molecules that interface the cell with the
3 environment. Some of these proteins, corresponding to virulence factors, were already
4 described for *Enterococcus faecalis*, the predominant species involved in enterococcal
5 nosocomial infections. In a global proteomic approach, the identification of the most abundant
6 secreted and surface-associated proteins of *E. faecalis* was carried out. These proteins were
7 extracted from *E. faecalis* JH2-2 cultures and subsequently separated by gel electrophoresis, or
8 directly subjected to *in vivo* trypsinolysis. The proteins were then analysed by liquid
9 chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Putative
10 functions were assigned by homology to the translated genomic database of *E. faecalis*. A total
11 of 8 secreted proteins including autolysins and lipoproteins were identified in the supernatant
12 culture. 39 cell surface proteins were identified following 2D gel electrophoresis and *in vivo*
13 trypsinolysis among which 2 are common to the fully secreted ones. In all, we identified 45
14 proteins, and their sequences analysis revealed that 36 (80 %) harbour characteristic features
15 (signal peptide or transmembrane domains) consistent with a predicted extracellular
16 localization.
17

18 **1. Introduction**

19 Enterococci are ubiquitous bacteria and commensals of the normal intestinal flora in humans
20 and animals. They are highly versatile and well adapted for survival under harsh conditions.
21 Prior to identification of multiple-antibiotic resistant strains in the late 1970s, enterococci were
22 considered as relatively innocuous organisms [19]. They are part of the lactic acid bacteria
23 (LAB) of importance in foods. Indeed, enterococci constitute a major component of the
24 microflora of artisanal cheeses produced in Southern Europe and may also be used successfully
25 as probiotics [7].

26 Over the past two decades, enterococci have emerged as nosocomial pathogens occurring in
27 endocarditis, bacteremia and other infections in patients that have severe underlying disease or
28 that are immunocompromised [11, 12, 15, 19]. Among the 12 species of enterococci usually
29 described, *Enterococcus faecalis* is the most frequently detected in clinical isolates, ranging
30 from 80 to 90% of the cases [14, 19]. A specific cause for concern and contributing factor to
31 enterococci pathogenesis is their resistance to a wide variety of antimicrobial agents [12, 19].
32 The prevalence of enterococci in nosocomial and community acquired infections could be
33 explained by their natural and acquired resistances to numerous antibiotics [22] but also by the
34 presence of subtle virulence factors, mainly secreted and cell-wall associated proteins which
35 promote tissues colonization, confer a growth advantage or ensure a protection against innate
36 and acquired immune responses [7, 12, 19]. Such proteins were already described in *E.*
37 *faecalis*.

38 Aggregation substance (AS) is a pheromone-responsive, plasmid-encoded bacterial cell-wall
39 associated adhesine that facilitates plasmid exchange [5]. In addition to its adhesive function
40 during the bacterial conjugation process, AS mediates adhesion of *E. faecalis* to a variety of
41 eucaryotic cells *in vitro*, including intestinal epithelial cells [26], renal tubular cells [13],
42 human neutrophils [32] and macrophages [31]. Another putative colonization factor is the
43 enterococcal surface protein (Esp) that is chromosomally encoded and found in abundance
44 among bacteremia and endocarditis isolates of *E. faecalis* while it is rare in stool isolates from
45 healthy individuals [28]. Esp was described to contribute to the colonization and the
46 persistence of some *E. faecalis* strains during ascending urinary tract infection in an animal
47 model [29]. Ace (adhesine of collagen) belongs to the microbial surface component
48 recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) family, which is structurally and
49 functionally similar to the collagen-binding protein Cna of *Staphylococcus aureus* [25]. Ace
50 binds to collagen (types I and IV) but also to laminin and may play a role in the pathogenesis

51 of endocarditis [20]. The EfaA adhesin, identified with the use of an antiserum from a patient
52 with *E. faecalis* endocarditis shares high level homology with streptococcal adhesins [16].

53 Other virulence factors, such as cytolysin (Cyl) [6], the zinc metallo-endopeptidase
54 gelatinase (GelE) [33] or Enterolysin A [21] are also secreted by *E. faecalis*. They are involved
55 in the haemolytic and bactericidal activity, in the hydrolysis of gelatine, collagen, casein and
56 other bioactive peptides, in the modulation of the host immune response and in the growth
57 inhibition of several lactic acid bacteria.

58 Owing to the virulence factors localisation, we undertook a proteomic approach in order to
59 identify the most abundant secreted and surface proteins of the plasmid free *E. faecalis* JH2-2
60 strain. Taking advantage from the annotated sequence of *E. faecalis* V583 genome available at
61 The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>), we confidently identified by mass
62 spectrometry 8 secreted and 39 surface proteins among which 2 are common to the two groups.

63

64 **2. Materials and methods**

65 **2.1. Bacterial strain and growth conditions**

66 The *E. faecalis* JH2-2 strain [34] was used in this study. It corresponds to a plasmid free
67 strain used as our laboratory model strain. Cultures of *E. faecalis* JH2-2 were grown at 37 °C
68 without shaking in brain heart infusion (BHI) or solid medium.

69

70 **2.2. Collection and separation of protein components secreted in media**

71 Proteins secreted from *E. faecalis* JH2-2 strain were prepared as follows. Starting from plate
72 cultures, 10 ml BHI were inoculated to obtain an OD_{600nm} of 0.02 and the culture was carried
73 out until the cells reached mid-log phase (OD_{600nm} of 0.5). The cells were harvested by
74 centrifugation, washed with BHI and the culture from OD_{600nm} of 0.02 to 0.5 was repeated
75 once. From this second culture, 50 ml fresh BHI were inoculated (OD_{600nm} of 0.02), then the
76 cells were grown until they reached mid-log phase (OD_{600nm} of 0.5) and subsequently subjected
77 twice to centrifugation for 10 min at 3000 g. This procedure allows minimizing contaminations
78 with material released from lysed cells. The supernatant was rapidly filtered through a 0.22
79 µm-pore-size nitrocellulose membrane filter (Millipore) and incubated for 1 hour at 37 °C with
80 Benzonase (100 U/l, Merck). Then, trichloroacetic acid (TCA) was added at 7% final
81 concentration, mixed and placed on ice for 30 min. The precipitated proteins were harvested by
82 centrifugation at 10000 g for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 1 ml of acetone by
83 using an ultrasonic water bath, and the mixture was centrifuged. Acetone washing was repeated
84 twice to completely remove TCA from the precipitates, and air dried. The protein dried pellets

85 were solubilized in 100 µl of 4 % sodium dodecyl sulfate (SDS) with 5 min of boiling before
86 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis.

87

88 **2.3. Isolation of outer surface proteins**

89 The extraction of the outer surface proteins was carried out consecutively to the enzymatic
90 treatment of the cell wall with mutanolysin as described by Hughes *et al.* [10], using a slightly
91 modified protocol. 150 ml culture of *E. faecalis* JH2-2 mid-log phase growing cells were
92 harvested by centrifugation at 3000 g for 10 min, washed once in phosphate-buffered saline
93 (PBS) solution and centrifuged again in the same conditions. The pellet was then resuspended
94 in 10 ml of digestion buffer (20% sucrose in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM MgCl₂, protease
95 inhibitor cocktail [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM iodoacetic acid, 1 µM pepstatin
96 A, and 10 mM 1,10 phenanthroline], 90 U of benzonase (Merck), and 2500 U of mutanolysin
97 (Sigma)). Enzymatic digestion was performed during 2 hours at 37 °C. The majority of intact
98 protoplasts were removed by centrifugation at 7000 g for 15 min. The supernatant was then
99 subjected to ultracentrifugation at 25 000 rpm (Beckman J2-MW, rotor TiSW41) for 1 hour to
100 remove cell debris. Proteins from the supernatant were precipitated with 7% TCA as described
101 above, washed three fold with ice cold acetone and stored at -20 °C.

102

103 **2.4. In vivo trypsinolysis of surface proteins**

104 Cells from 24 h cultures of *E. faecalis* JH2-2 were harvested by centrifugation at 10000 g for
105 5 min, rinsed in ammonium bicarbonate (BICAM) 50 mM, pH 8, and resuspended in BICAM
106 (50 mM, pH 8) containing 0.5 M sucrose. 10 µg/ml trypsin (Promega) was added. After 2 h
107 incubation at 37 °C, cells were harvested by centrifugation at 12000 g for 5 min and the
108 supernatant was filter-sterilised (0.22 µm, Millipore), and incubated overnight at 37 °C to
109 allow complete trypsin digestion. The resulting peptides were trapped onto a C18 column
110 (Macherey-Nagel), eluted with aqueous methanol (80%, v/v), and solubilised in formic acid
111 (0.2% in water) prior to analysis by HPLC-ESI-MS/MS (see below).

112

113 **2.5. Two-dimensional gel electrophoresis**

114 The protein samples were analyzed by 2D SDS-PAGE using for the first migration
115 Immobilon drystrips pH 4-7 (Amersham) and for the second one, 12% polyacrylamide gels as
116 described by Giard *et al.* [8].

117

118 **2.6. Proteins identification by mass spectrometry**

119 Consecutively to the mono or 2D SDS-PAGE and Coomassie blue staining, the protein
120 containing regions (bands or spots) were excised and washed twice in ultra pure water, and
121 once in acetonitrile/BICAM 50 mM (1/1:v/v). Samples were stirred for 15 min and vacuum-
122 dried for 30 min. In-gel digestion of the excised protein bands or spots was carried out using
123 0.5 µg of trypsin (Promega). Samples were incubated overnight at 37 °C. The purification of
124 the digested peptides and their analysis by High Performance Liquid Chromatography-
125 electrospray ion trap spectrometry (using a surveyor LC coupled on line to a LCQ Deca XP,
126 Thermo) was carried out as previously described [27]. Recorded MS/MS spectra were
127 compared to the theoretical fragmentation of a trypsinolysed database deduced from of the *E.*
128 *faecalis* V583 coding sequences available at TIGR, using the Sequest algorithm incorporated in
129 the BioWorks software (version 2, Thermofinnigan).

130

131 **3. Results**

132 **3.1. Characterization of secreted proteins**

133 *E. faecalis* strains grow well in M17 supplemented with 0.5 % glucose (GM17) or in BHI
134 (brain heart infusion) liquid media. To identify secreted proteins, we chose to use BHI broth
135 which protein content does not interfere with the protein pattern of the *E. faecalis* samples
136 (data not shown). To minimize contamination by proteins released by lysed bacteria, cells were
137 maintained in exponential phase during 3 consecutive growths in BHI, and proteins were
138 finally recovered from the supernatant. Analysis of these extracts by SDS-PAGE revealed 9
139 Coomassie-blue stained bands (Fig. 1), which were excised, subjected to trypsin digestion and
140 analyzed by LC-ESI tandem mass spectrometry. This allowed the unambiguous identification
141 of 8 proteins that are listed in Table 1.

142 The gel bands identified correspond to the protein products of *EF0799*, *EF0252*, *EF3060*,
143 *EF0394*, *EF1264*, *EF2863*, *EF0071*, and *EF0443* genes as released by the TIGR annotation. It
144 is noteworthy that their sequence analysis gave results very consistent with their extracellular
145 localization. First, the use of signalP 3.0 algorithm (available from www.expasy.org) revealed
146 the presence of cleavage sites for signal peptidase for all of these proteins (Table 1). Second,
147 they all display extracellular predicted functions or contain domain(s) clearly related to the
148 extracellular compartment. Indeed, 3 of them would be involved in peptidoglycan maintenance
149 and degradation (i.e., *EF0252* is a N-acetyl muramoyl L-Ala amidase, *EF0799* is a 1,4 N-acetyl
150 muramoyl hydrolase and *EF2863* is an endo-β-N-acetyl glucosaminidase), *EF0071* is a
151 putative lipoprotein, *EF0443* contains a LysM domain (also present in *EF0799*) that is thought
152 to have a peptidoglycan binding function, *EF1264* is a putative sulfatase containing a MdoB

153 domain (phosphoglycerol transferase, alkaline phosphatase), and EF0394 and EF3060 are
154 known as major secreted antigens in *E. faecalis* (SalB and SalA, respectively).

155 It should also be noted that the observed molecular weights (Fig. 1) of several identified
156 proteins appeared higher than the theoretical ones. These differences are particularly
157 important for SalB, which was clearly identified in 3 bands. This suggests that these proteins
158 are subjected to post-translational modifications, most probably glycosylations. However, our
159 attempts to further characterize these modifications by mass spectrometry were unsuccessful.
160 By contrast, the observed MWs of EF1264 and EF0071 appeared lower than the theoretical
161 ones. Analysis of the sequenced peptides revealed that the observed bands are in fact the C-
162 terminal moiety of the EF1264 protein and the N-terminal part of EF0071, respectively.

163

164 **3.2. Characterization of cell surface-associated proteins**

165 The surface proteins of *E. faecalis* cells were analysed using two methods, which both aimed
166 at analyzing proteins contained in the cell wall. In the first one, we stripped cells from their cell
167 wall by using mutanolysin (protoplastisation), and proteins recovered from the resulting
168 supernatant were identified by LC-ESI tandem MS after 2D gel separation. In the second one,
169 live cells were peeled off from their surface proteins by trypsin digestion; the resulting peptides
170 were recovered by reversed phase C18 chromatography and directly analyzed by LC-ESI
171 tandem MS.

172

173 **3.2.1. Surface proteins identified after protoplastisation**

174 The proteins recovered in the supernatant after mutanolysin treatment of cells were separated
175 by 2D SDS-PAGE, and 21 regions (containing at least 1 Coomassie blue-stained protein spot)
176 were excised and subjected to in-gel trypsin digestion. In all, we unambiguously identified 28
177 different proteins (Fig. 2, Table 2). As expected, considering the protein extraction technique
178 used, sequence analysis revealed a clear extracellular localization for most of them (21 over 28,
179 Table 2). Indeed, using SignalP 3.0 and TatP 1.0 algorithms, we showed that 21 proteins
180 harboured a signal peptide in their N-terminal extremity. Among these proteins, 2 were already
181 identified in the medium (ie, EF0443 and the C-term moiety of EF1264). Moreover, the
182 predicted functions of these proteins are consistent with this localization. For example, EF2857
183 is involved in cell wall synthesis, EF0685 and EF1818 are related to proteolysis, EF2496 and
184 EF3256 would be pheromone precursors and EF0907, EF3041, EF3106 are pheromone/peptide
185 binding components of ABC transporters, and both EF0176 and EF0177 are annotated as basic
186 membrane proteins.

187 The sequences of the 7 remaining proteins, as well as their predicted functions, strongly
188 suggest an intracellular localization. This raises the question whether the presence of these
189 proteins in the extracellular compartment results from contamination from intracellular
190 proteins. It is noteworthy that direct analysis of a whole proteome, aiming at identifying the
191 most abundant intracellular proteins (e.g. the most probable intracellular contaminants),
192 revealed the predominance of proteins belonging to the translation apparatus (data not shown).
193 Thus, the absence of any ribosomal protein in this experiment suggests an actual extracellular
194 localization for the identified proteins. In addition, most of the predicted cytosolic proteins
195 have been already described as secreted or cell-surface associated proteins (see the discussion
196 section).

197

198 **3.2.2. *in vivo* trypsin peeling of surface proteins**

199 Cells grown in BHI were washed twice in BICAM and subjected to trypsin digestion. After
200 centrifugation, the peptides released in the medium were purified in C18 columns and the
201 eluted mixture was directly analysed by LC-ESI tandem MS. In preliminary experiments, the
202 trypsin treatment systematically led to cell lysis, as revealed by the predominance of peptides
203 assigned to proteins belonging to the translational apparatus (eg, ribosomal proteins, data not
204 shown). After several attempts, we finally could obtain different results by performing trypsin
205 digestion in BICAM containing 0.5 M sucrose, but only for stationary phase cells. The results
206 presented in Table 3 are predominantly consistent with the expected extracellular localization
207 of proteins. Indeed, 6 of the 17 proteins identified in these experiments were already shown in
208 the protoplastization experiments (i.e., EF2556, EF0907, EF3256, EF0177, EF0201 and
209 EF1964, Table 2), and their amino acid sequence analyses showed that (i) 10 displayed a clear
210 signal peptide in their N-terminus part, and (ii) in all, 13 displayed at least 1 transmembrane
211 helix (as predicted by TMpred algorithm) (Table 3).

212 As compared to the results of Table 2, we identified 3 additional binding proteins belonging
213 to ABC transporters (EF1221, EF1060, and EF0761), diverse components of membrane
214 transporters (EF0958, EF2592), 4 other proteins harbouring at least one putative
215 transmembrane region, and 2 which sequence analysis did not show any motif consistent with
216 an extracellular localization.

217

218 **4. Discussion**

219 Secreted and surface proteins are of special interest in a clinical context. Indeed, these
220 proteins should come in direct contact with host tissues and may mediate important pathogen-

221 host interactions, and antigenic variations of surface structures represent an important
222 mechanism by which pathogens can avoid host defences. As a consequence, “secretomics”
223 strategies have been carried out for numerous pathogenic bacteria in recent years [4, 30]. In
224 this context, our study could be considered as an important step towards a better understanding
225 of the pathogenicity of *E. faecalis*.

226 We designed the experiments to identify both proteins fully secreted (recovered in the culture
227 medium), and those remaining anchored to the cell envelope. In all we identified 45 proteins,
228 among which 8 in the culture medium and 28 associated to the cell surface among which 2 are
229 common to the secreted ones. 11 additional proteins were identified using an original in vivo
230 trypsinolysis technique. Most of the proteins identified displayed a clear signal peptide, which
231 is highly consistent with their extracellular localization.

232 The finding that several proteins expected to be cytoplasmic appear on the cell surface is at
233 first somewhat surprising, even more when one takes into consideration that they do not have
234 N-terminal signal peptide nor possess the canonical Gram-positive anchor motif LPxTG.
235 However, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EF1964), enolase
236 (EF1961), ornithine carbamoyltransferase (EF0105), and DnaK chaperone (EF1308) have
237 already been reported as secreted or associated to the cell envelope following outer surface
238 protein extraction from other bacteria. Indeed, GAPDH was described as a major surface
239 protein of group A streptococci with multiple binding activity [23] and as a transferrin-binding
240 protein associated to the cell wall of *S. aureus* and *S. epidermidis* [17]. The streptococcal
241 surface enolase acts as a strong plasminogen and plasmin binding protein [24] and therefore
242 seems to play a role in cell invasion by group A streptococci. In addition to GAPDH and
243 enolase, the ornithine carbamoyl-transferase and DnaK were found to be associated to the outer
244 surface proteins of *S. agalactiae* [10]. In the same work, it has also been shown that the use of
245 sera against ornithine carbamoyltransferase and phosphoglycerate kinase protect against
246 neonatal mice infection with *S. agalactiae*. On the other hand, it has been found that enolase of
247 *B. cereus* [9] and *B. subtilis* [1] and the elongation factor G of this latter organism were
248 recovered within the extracellular proteins. Thus, these proteins should not be viewed as a
249 consequence of a poor separation technique but rather, they may have a functional association
250 with the cell surface indicating most likely secondary functions as it has been already reported
251 for GAPDH and enolase.

252 It is noteworthy that 80 % (36/45) of the identified proteins harbour feature characteristics for
253 an extracellular localization. Several of these proteins were already shown to be involved in the
254 pathogenicity of *E. faecalis*. It is for example the case of gelatinase (EF1818; [33]), as well as

255 for the secreted antigens SalA and SalB [18]. However, other proteins could be involved in
256 enterococcal virulence.

257 The *EF0443* gene product shares a high level of identity with numerous proteins among
258 which the protein products of *Streptococcus mitis* *SMT0064*, *S. pneumoniae* *SP0107*,
259 *Lactobacillus plantarum* *lp2847*, and *S. agalactiae* *gbs2107* correspond to the best hits with
260 52.3%, 50.5%, 73.9%, and 54.5% identity, respectively. These proteins are of unknown role
261 but all harbour the LysM (lysine motif) domain of about 40 amino acids residues found in a
262 variety of enzymes involved in bacterial cell wall degradation [2].

263 The cell wall associated protein products of *EF0907* and *EF3041* share 64.5% identity and
264 belong to the same family of pheromone binding proteins which are assumed to be an
265 important factor for conjugative plasmid transfer involved in dissemination of antibiotic
266 resistance and virulence factors in enterococci [5]. The protein products of *EF3106*, identified
267 as an *EF3041* paralogue and that of *EF3256*, which corresponds to the pheromone cAD1
268 precursor lipoprotein, may also be involved in the same mechanisms. *EF3255* encode a
269 putative thiamine biosynthesis lipoprotein which homologue ApbE was localized in the
270 periplasmic compartment of *Salmonella typhimurium* cells [3].

271 The protein products of *EF0176* and *EF0177* (highly related paralogues, 70% identity) share
272 55% and 48% identity with *SPy1228* gene of *S. pyogenes* and *lmo1388* gene of *Listeria*
273 *monocytogenes*, respectively, both encoding a CD4+ T-Cell stimulating antigen precursor.

274 In spite of the increasing clinical importance of enterococci, no global analysis of their
275 secreted proteins had been achieved. In this study, we have established an inventory, while not
276 exhaustive, of the *E. faecalis* outer surface proteins. Computer searches allowed the validation
277 of the proteomic approach relatively to the sub-localization of the identified proteins, and even
278 most of the “unexpected” cytosolic proteins may deal with the cell surface and may have a
279 secondary role as antigenic targets. Comparison with the databases also revealed that most of
280 the proteins identified could be related to the bacterial virulence mechanisms. Future prospects
281 will aim to determine the exact role of these extracellular components in the pathogenic
282 lifestyle of *E. faecalis*.

283

284 **Acknowledgements**

285 Thierry Morin was the recipient of a post-doctoral fellowship from the Conseil Régional de
286 Basse-Normandie (France).

References

- [1] Antelmann, H., Tjalsma, H., Voigt, B., Ohlmeier, S., Bron, S., van Dijl, J.M., Hecker, M. (2001) A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* 11, 1484-1502.
- [2] Bateman, A., Bycroft, M. (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* 299, 1113-1119.
- [3] Beck, B.J., Downs, D.M. (1999) A periplasmic location is essential for the role of the ApbE lipoprotein in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 181, 7285-7290.
- [4] Bumann, D., Aksu, S., Wendland, M., Janek, K., Zimny-Arndt, U., Sabarth, N., Meyer, T.F., Jungblut, P.R. (2002) Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 70, 3396-3403.
- [5] Clewell, D.B., An, F.Y., Flannagan, S.E., Antiporta, M., Dunny, G.M. (2000) Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Mol. Microbiol.* 35, 246-247.
- [6] Coburn, P.S., Gilmore, M.S. (2003) The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eucaryotic and prokaryotic cells. *Cell. Microbiol.* 5, 661-669.
- [7] Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003) Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *Int. J. Food. Microbiol.* 88, 105-122.
- [8] Giard, J.C., Laplace, J.M., Rincé, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeuf, C., Flahaut, S., Auffray Y. (2001) The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22, 2947-2954.
- [9] Gohar, M., Okstad, O.A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolsto, A.B., Lereclus, D. (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* 2, 784-791.
- [10] Hughes, J.M., Moore, J.C., Lane, J.D., Wilson, R., Pribul, P.K., Younes, Z.N., Dobson, R.J., *et al.*, (2002) Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Immun.* 70, 1254-1259.
- [11] Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. (1994) Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 462-478.
- [12] Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J. (2004) Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22, 822-830.

- [13] Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., Wirth, R. (1992) Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* 60, 25-30.
- [14] Kuhn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup F., *et al.*, (2003) Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 133-145.
- [15] Low, D.E., Keller, N., Barth, A., Jones, R.N. (2001) Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32 (Suppl 2) S133-S145.
- [16] Lowe, A.M., Lambert, P.A., Smith A.W. (1995) Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* 63, 703-706.
- [17] Modun, B., Williams, P. (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect. Immun.* 67, 1086-1092.
- [18] Mohamed, J.A, Teng, F., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E. (2006) Pleiotropic effects of 2 *Enterococcus faecalis* *sagA*-like genes, *sala* and *salB*, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. *J. Infect. Dis.* 193, 231-240.
- [19] Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M. (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 513-522.
- [20] Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Höök, M., Murray B. (2000) *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* 68, 5218-5224.
- [21] Nilsen, T., Nes, I.F., Holo, H. (2003) Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *App. Environ. Microbiol.* 69, 2975-2984.
- [22] Oprea, S.F., Zaidi, N., Donabedian, S.M., Balasubramaniam, M., Hershberger, E., Zervos, M.J. (2004) Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 626-630.
- [23] Pancholi, V., Fischetti, V.A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* 176, 415-426.
- [24] Pancholi, V., Fischetti, V.A. (1998) α -enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of the pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* 273, 14503-14515.

- [25] Rich, R.L., Kreikemeyer, B., Owens, R.T., Lbrenz, S., Narayana, S.V.L., Weinstock, G.M., Murray, B.E., Höök, M. (1999) Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. J. Biol. Chem. 274, 26939-26945.
- [26] Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., Marre, R. (2000) Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. Infect.Immun. 68, 6044-6047.
- [27] Sauvageot, N., Pichereau, V., Louarme, L., Auffray, Y., Laplace, J.M. (2002) Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*. Eur. J. Biochem. 269, 5731-5737.
- [28] Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S. (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. Infect. Immun. 67, 193-200.
- [29] Shankar, N., Lockatell, C.V., Baghdayan, A.S., Drachenberg, C., Gilmore, M.S., Johnson, D.E. (2001) Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect. Immun. 69, 4366-4372.
- [30] Sibbald, M.J., Ziebandt, A.K., Engelmann, S., Hecker, M., de Jong, A., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Stokroos, I., Arends, J.P., Dubois, J.Y., van Dijl, J.M. (2006) Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 755-788.
- [31] Sussmuth, S.D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R., Rozdzinski, E. (2000) Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. Infect. Immun. 68, 4900-4906.
- [32] Vanek, N.N., Simon, S.I., Jacques-Palaz, K., Mariscalco, M.M., Dunny, G.M., Rakita, R.M. (1999) *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 26, 49-60.
- [33] Waters, C.M., Antiporta M.H., Murray, B.E., Dunny, G.M.(2003) Role of the *Enterococcus faecalis* GeLE protease in determination of cellular chain length, supernatant levels, and degradation of fibrin and misfolded proteins. J. Bacteriol. 185, 3613-3623.
- [34] Yagi, Y., Clewell, D.B. (1980) Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 143, 966-970.

Table 1. Identification of secreted proteins

band n°	Protein identified ¹	MW obs. (kDa)	MW th. (kDa)	Nb. of sequenced peptides	max SEQUEST Sp score ²	Protein coverage (aa from - to)	Signal Peptide (posn) ³
M1	EF0799 – Autolysin	85	77	3	1572 (19/24)	8.1 (374-735)	SP (53-54)
M2	EF0252 – Autolysin	75	54	7	1764 (18/24)	21.9 (210-501)	SP (24-25)
M3	EF3060 – secreted antigen SalA	68	51	12	2147 (20/24)	28.6 (41-334)	SP (27-28)
M4	EF0394 – secreted antigen SalB	67	47	42	2282 (21/26)	45.9 (34-449)	SP (27-28)
M5	EF1264 – Sulfatase family protein	52	80	8	1045 (15/18)	14.6 (309-598)	SP (31-32)
M6	EF0394 – secreted antigen SalB	47	47	21	1568 (19/26)	30.0 (38-214)	SP (27-28)
M7	EF0394 – secreted antigen SalB	40	47	5	1547 (19/26)	13.8 (83-221)	SP (27-28)
M8	EF2863 – N-Ac. glucosaminidase, putative	32	35	5	1069 (18/30)	26.1 (94-303)	SP (41-42)
	EF0071 – lipoprotein, putative	32	89	5	1032 (19/24)	7.7 (86-219)	SP (32-33)
M9	EF0443 – LysM domain protein	26	21	9	1624 (25/30)	47.7 (35-182)	SP (27-28)

¹ ORF name – predicted function, as annotated in the V583 genome available at www.tigr.org. ² Sp score given by SEQUEST for the most significant sequenced peptide (observed / theoretical b and y CID fragments for this peptide). ³ as deduced from sequence analysis with the SignalP 3.0 algorithm (available from www.expasy.org).

Table 2. Identification of cell-surface associated proteins

Region n°	Protein identified ¹	MW (kDa)	Nb. of sequenced peptides	max SEQUEST Sp score ²	Protein coverage (aa from - to)	Signal Peptide (posn) ³
01	EF 2857 – Penicillin binding protein 2B	78	21	1565	27.2 (104-677)	SP (57-58)
01	EF 0907 – Peptide ABC transporter. peptide binding protein	61	5	1713	15.1 (48-181)	SP (33-34)
02	EF 1264 – Sulfatase domain protein	80	21	1407	27.9 (336-699)	SP (31-32)
03	EF 1964 – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36	22	2793	42.1 (5-333)	no
03	EF 0685 – Protease maturation protein, putative	37	2	1113	12.9 (47-236)	SP (22-23)
04	EF 0177 – Basic membrane protein family	38	29	2332	62.7 (57-361)	SP (30-31)
04	EF 3256 – Pheromone cAD1 precursor lipoprotein	33	21	1966	42.3 (45-309)	SP (37-38)
05	EF 2903 – ABC Transporter. substrate binding protein	48	32	2865	54.4 (72-426)	SP (23-24)
05	EF 1961 – Enolase	47	10	2364	37 (17-421)	no
06	EF 1961 – Enolase	47	45	2352	76.9 (17-430)	no
07	EF 2556 – Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	54	19	2203	38.6 (80-491)	SP (28-29)
08	EF 0907 – Peptide ABC transporter. peptide binding protein	61	40	1997	53.7 (40-556)	SP (33-34)
09	EF 1308 – DnaK protein	66	14	1673	35.2 (4-556)	no
10	EF 0907 – Peptide ABC transporter. peptide binding protein	61	11	2062	12.1 (133-386)	SP (33-34)
10	EF 3106 – peptide ABC transporter peptide binding protein	65	2	639	4.8 (103-224)	SP (31-32)
10	EF 1308 – DnaK protein	66	3	1423	5.6 (143-316)	no
10	EF 3041 – Pheromone binding protein	61	45	1837	39.3 (75-542)	SP (25-26)
11	EF 0201 – EF TU	43	5	2649	23.7 (39-281)	no
11	EF 2556 – Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	54	54	2629	71.0 (80-505)	SP (28-29)
12	EF 2556 – Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	54	61	2709	71.4 (80-505)	SP (28-29)
13	EF 2556 – Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	54	53	2603	69.6 (80-505)	SP (28-29)
14	EF 2556 – Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	54	47	2596	(58-505)	SP (28-29)
15	EF 0176 – Basic membrane protein family	38	24	2613	60.0 (35-352)	SP (33-34)
15	EF 3256 – Pheromone cAD1 precursor lipoprotein	33	3	1020	20.8 (246-309)	SP (37-38)
16	EF 0105 – Ornithine carbamoyltransferase	38	5	1769	15.4 (109-306)	no
16	EF 0020 – PTS system component	36	3	1312	13.2 (106-254)	no
16	EF 0577 – Adhesion lipoprotein	36	3	1425	15.7 (42-129)	SP (28-29)
16	EF 1818 – Gelatinase	55	3	946	9.8 (305-494)	SP (30-31)
16	EF 2397 – EF-Ts	32	2	1084	11.0 (119-178)	no
16	EF 3255 – Thiamin biosynthesis lipoprotein ApbE putative	39	6	1331	23.6 (95-305)	SP (27-28)
17	EF 2254 – Hypothetical protein	22	2	834	20.8 (102-175)	SP (28-29)
18	EF 0754 – Conserved hypothetical protein	26	15	920	43.1 (78-228)	SP _{tat} (25-26)
18	EF 0443 – LysM domain protein	21	2	811	8.7 (62-77)	SP (27-28)
19	EF 0176 – Basic membrane protein family	37	2	1789	6.9 (182-216)	SP (33-34)
20	EF 2860 – ErfK/YbiS/YefS/YnhG family protein. putative	53	4	835	15.2 (160-381)	SP (48-49)
21	EF 0751 – Conserved hypothetical protein	26	8	1344	45.6 (92-243)	SP (25-26)
21	EF 2496 – Pheromone cOB1 precursor	30	2	2176	8.7 (143-262)	SP (21-22)

¹ ORF name – predicted function, as annotated in the V583 genome available at www.tigr.org. ² Sp score given by SEQUEST for the most significant sequenced peptide. ³ as deduced from sequence analysis with the SignalP 3.0 or tatP 1.0 (noted SP_{tat}) algorithms (available from www.expasy.org).

Table 3. Identification of proteins recovered from *in vivo* trypsinolysis

<i>Protein identified</i> ¹	<i>MW (kDa)</i>	<i>Nb. of sequenced peptides</i>	<i>max sequest Sp score</i>	<i>Protein coverage (aa from - to)</i>	<i>Signal peptide</i> ² (<i>position</i>)	<i>Transmembrane domain prediction</i> ³
EF 2556 – Fumarate reductase flavoprotein subunit precursor putative	54	9	1512	23 (80-491)	SP (23-24)	1/2
EF 0177 – Basic membrane protein family	38	3	737	11.6 (143-323)	SP (30-31)	1
EF 0907 – Peptide ABC transporter, peptide-binding protein	61	2	679	5.6 (411-525)	SP (33-34)	1
EF 3256 – Pheromone cAD1 precursor lipoprotein	33	1	819	3.9 (246-257)	SP (24-25)	1
EF 0201 – Translation elongation factor Tu	43	15	2943	16.7 (91-281)	no	0
EF 1964 – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36	2	886	18.6 (162-264)	no	0
EF 0958 – PTS system, II ABC components	78	2	939	5.8 (515-620)	SP (34-35)	8/9
EF 0761 – Amino acid-binding-permease protein	80	2	1012	6.9 (126-219)	SP (28-29)	5
EF 1221 – Spermidine-putrescine binding protein	38	1	492	5.6 (331-350)	SP (25-26)	3
EF 1060 – Pheromone binding protein	62	1	464	4.2 (174-196)	SP (26-27)	1
EF 1745 – Conserved hypothetical protein	15	3	772	18.2 (79-104)	SP (32-33)	1
EF 2592 – ABC transporter, permease-ATP binding protein	69	1	590	4.2 (395-420)	SPtat (20-21)	4/5
EF 1613 – Formate acetyltransferase	85	4	1001	10.2 (89-529)	no	1
EF 1584 – Cystein synthase A	33	3	622	16.8 (23-130)	no	1/2
EF 2612 – ATP synthase F0, B subunit	19	1	994	15.9 (120-147)	no	1
EF 2460 – GTP-binding protein TypA	68	3	1569	3.3 (406-425)	no	0
EF 0012 – Ribosomal protein L9	17	2	823	13.3 (13-41)	no	0

¹ ORF name – predicted function, as annotated in the V583 genome available at www.tigr.org. ² as deduced from sequence analysis with the SignalP 3.0 algorithm (available from www.expasy.org). ³ as deduced from sequence analysis using the algorithm TMpred (www.expasy.org).

Figure legends

Figure 1. Coomassie blue stained mono dimensional gel electrophoresis of secreted proteins from exponentially growing cells of *E. faecalis* JH2-2 strain. The arrows indicate the protein bands excised from the gel, trypsinolysed and subjected to mass spectrometry identification. Their anotation corresponds to that reported in table 1. The proteins molecular weight (kDa) of the ladder polypeptides is indicated on the right.

Figure 2. Coomassie blue stained two-dimensional gel electrophoresis of outer surface proteins from exponentially growing cells of *E. faecalis* JH2-2 strain. The circled regions (spots) are excised from the gel, trypsinolysed and subjected to mass spectrometry identification. Their numbers correspond to those reported in table 2.

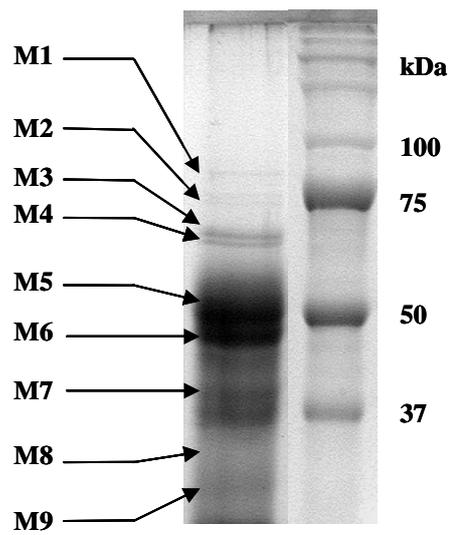


Figure 1

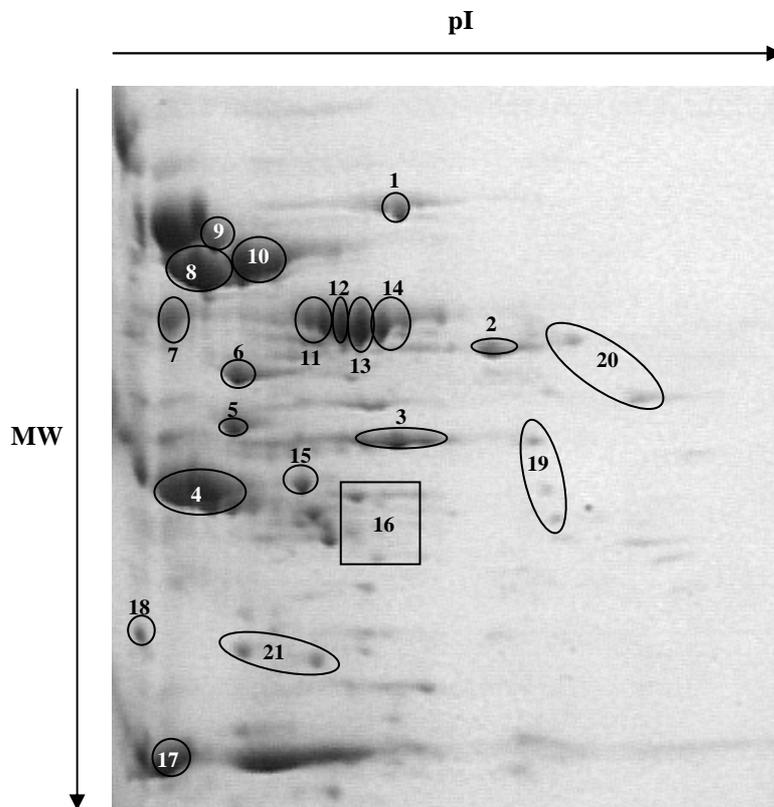


Figure 2

ANNEXE 2

Enterococcus faecalis Constitutes an Unusual Bacterial Model in Lysozyme Resistance[∇]

Laurent Hébert,¹ Pascal Courtin,² Riccardo Torelli,³ Maurizio Sanguinetti,³
 Marie-Pierre Chapot-Chartier,² Yanick Auffray,¹ and Abdellah Benachour^{1*}

Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, USC INRA 2017, EA956, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France¹;
 Unité de Biochimie Bactérienne, UR477, INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France²; and Institute of Microbiology,
 Catholic University of Sacred Heart, L. go F. Vito I, 00168 Rome, Italy³

Received 19 April 2007/Returned for modification 15 June 2007/Accepted 14 August 2007

Lysozyme is an important and widespread compound of the host constitutive defense system, and it is assumed that *Enterococcus faecalis* is one of the few bacteria that are almost completely lysozyme resistant. On the basis of the sequence analysis of the whole genome of *E. faecalis* V583 strain, we identified two genes that are potentially involved in lysozyme resistance, EF_0783 and EF_1843. Protein products of these two genes share significant homology with *Staphylococcus aureus* peptidoglycan O-acetyltransferase (OatA) and *Streptococcus pneumoniae* N-acetylglucosamine deacetylase (PgdA), respectively. In order to determine whether EF_0783 and EF_1843 are involved in lysozyme resistance, we constructed their corresponding mutants and a double mutant. The Δ EF_0783 mutant and Δ EF_0783 Δ EF_1843 double mutant were shown to be more sensitive to lysozyme than the parental *E. faecalis* JH2-2 strain and Δ EF_1843 mutant were. However, compared to other bacteria, such as *Listeria monocytogenes* or *S. pneumoniae*, the tolerance of Δ EF_0783 and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants towards lysozyme remains very high. Peptidoglycan structure analysis showed that EF_0783 modifies the peptidoglycan by O acetylation of N-acetyl muramic acid, while the EF_1843 deletion has no obvious effect on peptidoglycan structure under the same conditions. Moreover, the EF_0783 and EF_1843 deletions seem to significantly affect the ability of *E. faecalis* to survive within murine macrophages. In all, while EF_0783 is currently involved in the lysozyme resistance of *E. faecalis*, peptidoglycan O acetylation and de-N-acetylation are not the main mechanisms conferring high levels of lysozyme resistance to *E. faecalis*.

Enterococcus faecalis is intrinsically not as virulent as other gram-positive organisms, such as *Staphylococcus aureus*, pneumococci, or group A streptococci. However, *E. faecalis* emerges as an opportunistic pathogen and one of the leading causes of hospital-acquired infections, such as urinary tract, surgical wound, abdominal, pelvic, and neonatal infections in the United States and northern Europe (26). Little is known about its virulence potential. This lack of information can be partly attributed to the fact that *E. faecalis*, which normally grows as a commensal organism in the gut, possesses very subtle virulence traits that are not easily identified (27). Several surface proteins, enzymes, and capsular polysaccharides likely involved in virulence and the ability of *E. faecalis* to survive inside polymorphonuclear leukocytes (36) and macrophages (25) may contribute to its pathogenicity. Besides, intrinsic physiological properties of *E. faecalis*, such as its exceptional resistance to harsh conditions (37) and its inherent antibiotic resistance (27), may also provide an advantage during the infection process. In order to survive and colonize the host, bacteria must overcome the constitutive or innate defense system and the host's phagocytic response to achieve infection. One of the most important and widespread compounds of the constitutive defense system is lysozyme. Lysozyme is a component of granules of neutrophils and the

major secretory product of macrophages (29), found in mammalian secretions and tissues, and undoubtedly one of the most important enzymes of the human innate immune system. Lysozyme is a muramidase that cleaves peptidoglycan (PG) between the glycosidic beta-1,4-linked residues of N-acetylmuramic acid (NAM) and N-acetylglucosamine. In addition to the enzymatic lysis of the bacterial cell wall, lysozyme can also kill bacteria by a nonenzymatic mechanism in which its cationic and hydrophobic properties have been proposed to induce cell death by membrane perturbation (28). Therefore, pathogenic bacteria that colonize the host over a long period or that cause chronic infections must have developed mechanisms to avoid the lysozyme defense.

E. faecalis has an extraordinary capacity of resistance to the action of lysozyme, although variations in the lytic response of enterococcal cells were observed (16). However, the exact mechanism responsible for this resistance remains unknown hitherto. Two main mechanisms involved in lysozyme resistance have been characterized for different species of bacteria. The first mechanism is related to the modification of PG backbone structure via either O acetylation occurring on the C-6 hydroxyl moiety of the NAM residues (7) or the deacetylation of the N-acetylglucosamine residues (48). In gram-positive bacteria, the genes responsible for these activities encode OatA (O-acetyltransferase A) and PgdA (peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase A) proteins, respectively. Two other O-acetyltransferase genes called *aac(2')-Ia* and *pacA* have also been identified in the gram-negative bacteria *Providencia stuartii* (24) and *Neisseria* sp. (22). These modifications act as a steric hindrance, preventing the binding of the

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, USC INRA 2017, EA956, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France. Phone: 33 (0)2 31 56 66 18. Fax: 33 (0)2 31 56 53 11. E-mail: abdellah.benachour@unicaen.fr.

[∇] Published ahead of print on 4 September 2007.

TABLE 1. Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotide primers and probes

Strain, plasmid, or oligonucleotide primer or probe	Relevant characteristic(s) or oligonucleotide sequence ^a	Reference or source
<i>E. faecalis</i> strains		
JH2-2	Fus ^r Rif ^r ; plasmid-free wild-type strain	49
ΔEF_1843	JH2-2 isogenic derivative EF_1843 deletion mutant	This study
ΔEF_0783	JH2-2 isogenic derivative EF_0783 deletion mutant	This study
ΔEF_1843 ΔEF_0783	JH2-2 isogenic derivative EF_1843 EF_0783 deletion double mutant	This study
<i>E. coli</i> strains		
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> λ ⁻	Invitrogen
Plasmids		
pMAD	ori _{pE194} ^{ts} , Em ^r Amp ^r <i>bgab</i>	4
pMAD-ΔEF0783	pMAD carrying EF_0783 deletion	This study
pMAD-ΔEF1843	pMAD carrying EF_1843 deletion	This study
pMAD-EF0783	pMAD carrying functional allele of EF_0783 (LH37-LH40 amplification)	This study
pMAD-EF1843	pMAD carrying functional allele of EF_1843 (pgd8-pgd10 amplification)	This study
Oligonucleotide primers		
Pgd10	CAATTTAGAGGAATTCTAAAACCTC (EcoRI)	
Pgd15	CTACTACAGTCCGACAGAAATGC (SalI)	
Pgd14	GAATTTTTAGTTCGACTGTCTGCG (SalI)	
Pgd18	GTATGGTGGCATGCCCTTCTTGAT (SphI)	
LH21	TGTAAAACCATGGCCAGTG (NcoI)	
LH22	TACACTTTATGGATCCGGCTCG (BamHI)	
LH37	CAAACGAAATTCAGAGACTGACG (EcoRI)	
LH38	CGCAACAAGTCCGACAATAAGA (SalI)	
LH39	AGTCAAGTCCGACAAAAAATACG (SalI)	
LH40	AAGCCGGGATCCCTTGAGGG (BamHI)	
PU	GTAAAACGACGGCCAGT	
PR	CAGGAAACAGCTATGAC	
Oligonucleotide probes		
PgdA-1	CAACACTAAAGAAATACAAGCGGAAA	
PgdA-2	ACTGTAGTAGGCTGTCTGTCTAAC	
PgdA	FAM-CGCATCTCCAACCATCGCATTCCA-TAMRA	

^a The underlined bases correspond to the restriction sites shown in parentheses. FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxy-*N,N,N',N'*-tetramethylrhodamine.

lysozyme to the polysaccharide substrate, thus inhibiting its activity. The second mechanism is based on the production of lysozyme inhibitors which have a protective function. The first example was reported for *Escherichia coli* and consists of the periplasmic lysozyme inhibitor Ivy (inhibitor of vertebrate lysozyme) (20), and the second example is the *Streptococcus pyogenes* secreted factor Sic (streptococcal inhibitor of complement), identified as an extracellular virulence factors inhibiting lysozyme (8).

In this work we investigated the causes of the extraordinary resistance to lysozyme of *E. faecalis*. For this purpose, we mainly focused on the analysis of two proteins, the EF_0783 and EF_1843 proteins that display homology with OatA and PgdA, respectively. We studied the role of EF_0783 and EF_1843 in lysozyme resistance and their ability to survive within mouse peritoneal macrophages. In addition, we investigated the role of EF_0783 and EF_1843 on the PG structure of *E. faecalis*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *E. faecalis* strain JH2-2 (49) and its derivatives were grown at 37°C without shaking in M17 medium supplemented with 0.5%

glucose (GM17) (43) or in tryptic soy broth (TSB) or in brain heart infusion (BHI). When required, erythromycin (100 µg/ml) was added. *E. coli* Top10 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) strain was cultured with vigorous shaking at 37°C in LB medium (40) with ampicillin (100 µg/ml) when required.

DNA manipulations. General molecular methods, molecular cloning, and other standard techniques were performed essentially by the methods of Sambrook et al. (40). *E. coli* and *E. faecalis* were transformed by electroporation using Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad Laboratories). Plasmids and PCR products were purified using QIAGEN kits (QIAGEN, Valencia, CA).

Construction of ΔEF_0783, ΔEF_1843, and ΔEF_0783 ΔEF_1843 mutants of *E. faecalis*. Plasmid pMAD, a thermosensitive, pE194^{ts}-based delivery vector system previously described by Arnaud et al. (4), was used to construct isogenic mutants of the *E. faecalis* JH2-2 strain. Construction of the deletion in EF_0783 and EF_1843 genes utilized DNA primers designed on the basis of the genome sequence of *E. faecalis* V583 strain (33) with flanking restriction sites (Table 1). For each gene, two DNA fragments consisting of ~900-bp region were amplified from the upstream part of the gene (including the start codon and the 5' part of the coding sequence) and the downstream part (including the 3' part of the gene and the stop codon). Both PCR products were purified and digested by SalI and then self ligated in order to create a copy of the EF_0783 or EF_1843 gene carrying a deletion of ~70% of the coding sequences. Ligated products were digested by appropriate restriction enzymes (Table 1), cloned into the pMAD vector, and finally transformed into electrocompetent cells of *E. coli* Top10. pMAD-ΔEF0783 and pMAD-ΔEF1843 recombinant plasmids were verified by restriction and PCR amplification to confirm gene deletion. These plasmids were subsequently used to transform *E. faecalis* strain JH2-2 cells. Gene replacement

was performed via a double crossover event by a method based on the conditional replication of the pMAD plasmid as previously described (46). Briefly, after electroporation, the cell suspension was plated onto GM17 agar containing 100 µg/ml of erythromycin and 80 µg/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal). After 48 h of incubation at 30°C, the resulting erythromycin-resistant blue colonies were selected and grown twice to log phase at 42°C in the presence of erythromycin. To induce the excision of the recombinant plasmid vector sequence, cultures were incubated for 4 h at 30°C, followed by incubation at 42°C overnight without antibiotics. This step was repeated four or five times. Erythromycin-sensitive white colonies, which indicated that the plasmid had been excised, were selected by plating on GM17 agar containing X-Gal (80 µg/ml) at 37°C. The gene deletion of the white erythromycin-sensitive colonies was verified by PCR. The ΔEF_0783 ΔEF_1843 double mutant was constructed by deleting the EF_0783 gene in the ΔEF_1843 mutant, following the same procedure. Comparison of the growth of the wild-type (WT) strain and the isogenic ΔEF_0783, ΔEF_1843, and ΔEF_0783 ΔEF_1843 deletion mutant strains was performed by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of the cultures in GM17 medium, using a turbidimeter.

Lysozyme sensitivity assay. Lysozyme sensitivity assays were performed on 3 ml of Mueller-Hinton agar (pH 7.4) medium containing different lysozyme concentrations (0, 5, 20, 40, and 60 mg/ml) and potassium tellurite at 0.8 µg/ml disposed into five-by-five compartmented square culture plates. Ten microliters of a suspension containing 10⁶ cells/ml of each strain taken after overnight culture was then spotted onto the different media. Growth zones were photographed after 48 h of incubation at 37°C. The difference in color between the first column and the others is due to turbidity caused by lysozyme. Potassium tellurite was added in order to increase contrast between the colonies and media, and similar experiments were performed on medium deprived of potassium tellurite.

Survival assays in mouse peritoneal macrophages. Survival of *E. faecalis* in mouse peritoneal macrophages was tested by using an *in vivo/in vitro* infection model as described previously (25, 47). Briefly, *E. faecalis* ΔEF_1843, ΔEF_0783, and ΔEF_0783 ΔEF_1843 mutants and *E. faecalis* JH2-2 were grown aerobically at 37°C in BHI for 16 h. Then, bacteria were pelleted and resuspended in an adequate volume of phosphate-buffered saline for injection. Male BALB/c mice (10 weeks old) were infected with 10⁷ to 10⁸ cells of each strain by intraperitoneal injection. After a 8-h infection period, peritoneal macrophages were collected by peritoneal wash, centrifuged, and suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 10% bovine fetal serum, and 1 × nonessential amino acids supplemented with vancomycin (10 µg/ml) and gentamicin (150 µg/ml). The cell suspension was dispensed into 24-well tissue culture plates and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 2 h, and bacterial survival was monitored 24, 48, and 72 h after infection. All experiments were performed three times, and the results were subjected to statistical analysis using one-way analysis of variance with a Bonferroni's correction post test with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

PG structure analysis. *E. faecalis* PG structure was analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as described previously for *Lactococcus lactis* (18). Briefly, PG was extracted from exponential- and stationary-phase cultures (OD₆₀₀ of 0.5 and 2, respectively) grown on GM17 or BHI with boiling sodium dodecyl sulfate and was deproteinized by treatment with pronase and trypsin. It was then treated with 48% hydrofluoric acid at 4°C for 16 h, washed several times with 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, and washed with H₂O before lyophilization. Purified PG (4 mg [dry weight] in 500 µl) was digested with mutanolysin (Sigma, Saint-Quentin, France; 2,500 U/ml) in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 5.5, for 19 h at 37°C with shaking. The enzyme was inactivated by boiling the sample for 3 min, and insoluble material was removed by centrifugation. The soluble muropeptides were reduced with sodium borohydride. They were then separated by RP-HPLC using a Hypersil octyldecyl silane column (C₁₈; 250 × 4.6 mm; 5 µm; ThermoHypersil-Keystone) at 50°C by the method of Courtin et al. (18). Muropeptides were eluted for 5 min with 10 mM ammonium phosphate buffer (pH 5.6) (buffer A) and then with a 270-min methanol linear gradient (0 to 30%) in buffer A at a flow rate of 0.5 ml/min. Sodium azide was added (180 µg/liter of buffer A) to avoid baseline drift at 202 nm. Fractions were collected, and 1-µl portions of fractions containing the main peaks were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry with a Voyager DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. It is noteworthy that O-acetyl groups are quite labile, since an incubation of 1 h at 37°C with NaOH (pH 9) reduces the quantity of O-acetylated muropeptides by about 30% (7). Thus, it is possible that the *in vivo* proportion of O-acetylated muropeptides was higher than that determined experimentally.

Quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was extracted from exponential-phase enterococcal cultures or mouse peritoneal fluid samples with an RNeasy Protect Mini kit (QIAGEN) after the cells were suspended in RNA-later solution (QIAGEN) as described previously (21). Expression of the EF_1843 gene was quantitatively assessed by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) in an iCycler iQ system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), using *rpoB* as the normalization gene (14). For each gene, a set of primer pairs and a TaqMan probe (Table 1) were designed with Beacon Designer 2 (version 2.06) software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) and synthesized by MWG Biotech. *rpoB* primers and probe have been previously described (14).

PCRs were performed in a 50-µl volume containing the following reagents: 25 µl of the Platinum quantitative RT-PCR ThermoScript reaction mix (Invitrogen Inc., Milan, Italy), 1.5 U of ThermoScript Plus/Platinum Taq mix (Invitrogen), each primer pair and Taqman probe at a concentration of 0.5 µM, and 5 µl of total RNA sample and distilled water up to the final volume. Samples were subjected to an initial step at 52°C for 45 min for RT; 94°C for 5 min to inactivate the ThermoScript Plus reverse transcriptase and to activate the Platinum Taq polymerase; and 50 cycles, each consisting of 15 s at 94°C and 1 min at 59°C. Fluorescence data were collected during the 59°C annealing/extension step and analyzed with the iCycler iQ software. Each reaction was run in quadruplicate, and amplification efficiencies for the target gene were determined. The relative mRNA expression level of the target gene in each sample was calculated using the comparative cycle time as described previously (32).

RESULTS

Identification of EF_0783 and EF_1843 genes potentially involved in lysozyme resistance. *E. faecalis* has already been shown to acetylate its PG (35). In different bacteria, such as *Neisseria gonorrhoeae* and *Proteus mirabilis*, this modification has been shown to inhibit the action of lysozyme in a concentration-dependent manner (23, 38, 39, 42). The *in silico* analysis of the genome sequence of *E. faecalis* V583 strain (GenBank accession no. AE016830) revealed an open reading frame, EF_0783, showing significant similarity with an acetyltransferase gene of *Staphylococcus aureus* (7). The corresponding enzyme, OatA, acts to O acetylate at the C-6 OH group of NAM residues. The EF_0783 gene product (625 amino acids) shares 33% identity (55% similarity) with OatA over 613 amino acids. The predicted EF_0783 protein has several putative transmembrane segments, strongly suggesting its membrane association.

A similar search for a putative PG *N*-acetylglucosamine deacetylase (*pgdA*) involved in lysozyme resistance of *Streptococcus pneumoniae* (48) revealed that the EF_1843 protein product (301 amino acids) of *E. faecalis* shares 35% identity (53% similarity) with PgdA over 204 amino acids. PgdA, as well as the EF_1843 protein and other PG *N*-acetylglucosamine deacetylases previously identified in *Listeria monocytogenes* (12) and *L. lactis* (45), are members of the family 4 carbohydrate esterases as defined by the CAZy database (http://www.cazy.org/fam/acc_CE.html) and share conserved catalytic residues and metal ligand amino acids of the family 4 carbohydrate esterases identified by Blair et al. (9, 10) (Fig. 1). The EF_1843 gene of *E. faecalis* encodes a putative secreted protein with an N-terminal signal peptide typical for gram-positive bacteria (44). There is no predicted cleavage site for any known leader peptidase, suggesting that the protein remains likely anchored to the cytoplasmic membrane through its N-terminal membrane domain.

Nucleotide sequence analysis of the chromosomal DNA fragment harboring the EF_0783 gene revealed the presence of putative promoter sequences (TTGCCAN₁₇TATTAT) re-

<i>LmPgdA</i>	-MKTRWTRISTVATITTTAVVFTGVTGFQKYQPSKSRNKVMTQMDRIMKDKDQGGNFRRTDK	59
<i>LlPgdA</i>	-----	
<i>SpPgdA</i>	MNKSRLGRGRHGKTRHVLALLIGILALISICLLGGFIAPFKIYQQKSPFEQKIESLKKEKDDQ	60
EF1843	-----	
<i>LmPgdA</i>	KENGVEIISYIPKTTEKKDNEIIQKEIGKATDAEVKLLNRDKETQGIIFYTYQKHRMAEQ	119
<i>LlPgdA</i>	-----MSQKRSARSKSSKKAFFWKLTLIMGALLLVVA	31
<i>SpPgdA</i>	LSEGNQKEHFROGQAEVIAIYPLQGEKVISSVRELINQDVKDKLESKDNLVFYFTEQEEES	120
EF1843	-----	
<i>LmPgdA</i>	AIS-YKAVQSEYVKEGRTKFVLKDKKDICKNIVTDAETGALLTLGEVLIKSNQTKLNLKT	178
<i>LlPgdA</i>	GIG-TYYDYDQGVRRQNIAIYEQVNEAKEAKDKAYNSRRTSDINEAKKLIVKLHEKDKSSL	91
<i>SpPgdA</i>	GLKGVVNRNVTKQIYDLVAFKIBETEKTSLGKVHLTBDGQPFPLDQLFSDASKAKEQLIK	180
EF1843	-----MREKRRKFK	9
<i>LmPgdA</i>	AVEEELIKTGDFSLKDVGNLCKIKSLVKWNQTDFEITNSEIILPVKIPCAPEPKVKVKVL	238
<i>LlPgdA</i>	NQSITQLLAYLADIDKVSQLVAKEHQNITEDTIKEAEQGLELLNASYEKTDKEKFAQQIA	151
<i>SpPgdA</i>	ELTSPFIEDKKIEQDQSEQIVKNFSDQDLSAWNFDYKDSQIILYPSVVENLEEIALPVSA	240
EF1843	INGYVLFSAIILIVLVFIQTFLLTQPKITSKNDDTTQTSTKNSTAKKDSPTKLEKESTHM	69
<i>LmPgdA</i>	ADIASVVKRYLPSSVKVFEVPAKATNKRIALTFDDGPPSSSVITPGVLDLTKRHNVKATFF	299
<i>LlPgdA</i>	ADKQILVERQKEAERIAD-EKNKLANCKLIAITFDDGPNPTTFPQLKTLKLSAAKVPATFF	210
<i>SpPgdA</i>	FFDVIQSSYLLEKDAALYQSYFDKHKQKVVALTFDDGPNPATTFQVLETLAKYDIKATFF	300
EF1843	TISSKKYAYSADKIRKYITGEEPYKGEKLVFLTFDDGVNNTIPEQVLETLKKNVHATFF	129
<i>LmPgdA</i>	VLC-SSVIQNPGLVKKRELEEGHQVGS [*] HSWDHPQLTKQS-----TQEVYNQ [*] LKTQKAVFD	353
<i>LlPgdA</i>	ALG-SEAQQYPTDIKKEESDIGNEVASH [*] TWDHKDLVTL [*] S-----PAQQKQEEESANQLINK	264
<i>SpPgdA</i>	VLC-KNVSGNEDLVKRIKSEGHVVGNS [*] HSWSHPILS [*] QLS-----LDEAKQEDTEDVLT [*] K	354
EF1843	LVCNTLTSENQKIVKREVAEGCHS [*] TGFHS [*] STHDYATLYPNGIVNTKEIQAE [*] ATMENS [*] LKK	189
<i>LmPgdA</i>	QTGY--FP [*] TTMR [*] PPYCAVNKQVAEEIGLPIIQWSVDTE [*] DWKYRNAGIVTKKVLGATDGA	411
<i>LlPgdA</i>	ITCK--NVT [*] LR [*] PP [*] FGSYNNSVLCQ [*] TDLTAVNWSVD [*] TNDWRYRTSAPV [*] VQNVATY [*] AHDGA	322
<i>SpPgdA</i>	VLCG--SSK [*] LMR [*] PP [*] YCAITDDIRNSLDLSFIMWDVDS [*] LDW [*] SKNEASILTEIQHQVANGS	412
EF1843	ILGETFQ [*] TTLW [*] RY [*] EGGHMSWGGTEKSDEL [*] FKQLGIHW [*] LD [*] WNAMVGDAEPLDRQ [*] TTVAEM	249
<i>LmPgdA</i>	-----IVLM [*] HD [*] IHKTTAASLDTT--LTKLKSQ [*] GYE [*] VTIDELYGEK [*] LQ	452
<i>LlPgdA</i>	-----IILM [*] HD [*] IHQWSVDAV [*] PQI--IQNLKAQ [*] GYE [*] VTVSTLLD [*] IRNG	363
<i>SpPgdA</i>	-----IVLM [*] HD [*] IHSPTVNALPRV--IEYLK [*] NG [*] GYE [*] VTIPEMLN [*] TRLK	453
EF1843	LAFHQHSLEVYPDYNIRV [*] LM [*] HSVDKELTKQALPQLLEFYQANGY [*] EGVLY-----	301
<i>LmPgdA</i>	IGKQYFDKTD [*] SRMVK	467
<i>LlPgdA</i>	GAKAQVYFGR----	374
<i>SpPgdA</i>	AHEL [*] YYSRDE-----	463
EF1843	-----	301

FIG. 1. Sequence alignment of three *N*-acetylglucosamine deacetylases from *L. monocytogenes* (*LmPgdA*), *L. lactis* (*LlPgdA*), and *S. pneumoniae* (*SpPgdA*) and the EF_1843 (EF1843) protein product of *E. faecalis*. The sequences were aligned on the respect of the catalytic residues. Sequence manipulation was carried out using CLUSTALW software (<http://align.genome.jp>). The residues that are identical in all four proteins are indicated by the white letters on black background. Arrows and asterisks indicate the conserved catalytic residues and metal ligand amino acids characterized for *S. pneumoniae* PgdA, respectively. Amino acid numbers for each sequence are given on the right. Gaps introduced to maximize alignment are indicated by dashes. The GenBank accession numbers for the PgdA proteins of *L. monocytogenes*, *L. lactis*, *S. pneumoniae*, and for the putative EF_1843 polysaccharide deacetylase of *E. faecalis* are CAC98494, NP_266439, CAB96552, and AAO81606, respectively.

lated to the σ^{70} consensus recognition motif (TTGACAN₁₆₋₁₈TATAAT). The analysis of EF_1843 promoter region previously performed (5) revealed the presence of a putative promoter sequence related to that of the extracytoplasmic sigma factor SigV of *E. faecalis*. The structural organization of the two loci showed that the EF_0783 gene is bordered by two inverted repeats, while the EF_1843 gene is preceded by a divergently transcribed gene and terminated by an inverted repeat located downstream of the stop codon (Fig. 2). These inverted repeats may form a secondary structure which could function as Rho-independent terminators. These observations strongly suggested a monocistronic operon structure of the EF_0783 and EF_1843 genes.

In order to investigate the possible phenotypic changes due to EF_0783 and EF_1843 gene inactivations, deletion of these genes was performed via a double crossover event using a method based on the conditional replication of the pMAD vector as described in Materials and Methods. This procedure led to obtaining Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutant strains (Table 1). Inactivation of the EF_0783 and EF_1843 genes had no consequences on the growth rate, morphology (photonic microscopy), and autolysis of the strains (data not shown).

In addition, in silico analysis of the genome sequence of *E. faecalis* V583 strain did not reveal any homologue for *aac(2')*-*Ia*, *pacA*, *ivy*, and *sic* genes.

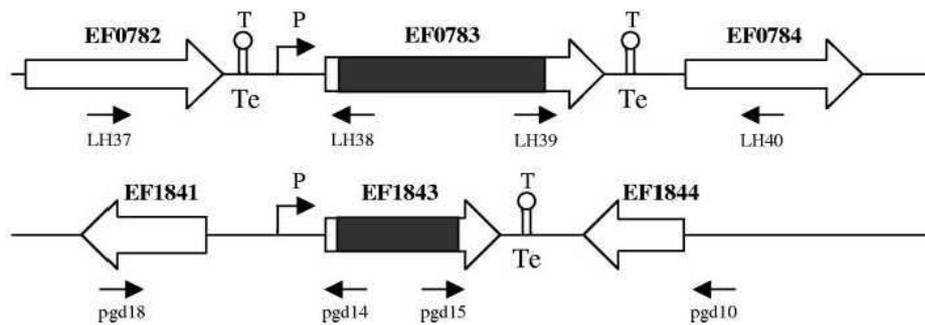


FIG. 2. Schematic representation of the genetic organization of the EF_0783 (EF0783) and EF_1843 (EF1843) chromosomal loci in the *E. faecalis* JH2-2 strain. Large arrows represent the open reading frames, and their orientation shows the transcriptional direction. The putative promoter motifs (P) and terminators (T and Te) are indicated. Shaded boxes correspond to the deleted region in each mutant. The primers used for the mutagenesis experiments and PCR cloning are indicated by black arrows.

Lysozyme resistance of Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants. The parental strain JH2-2 and its derivative mutants were grown in liquid media (GM17, BHI, and TSB) in the presence of lysozyme concentrations up to 50 mg/ml. These attempts revealed no growth inhibition, neither for the WT JH2-2 strain, nor for the Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants (data not shown). Thus, lysozyme sensitivity assays were performed on solid medium by plating 3 μ l of a suspension containing 10^6 cells/ml of each strain taken after overnight culture on Mueller-Hinton agar medium containing different lysozyme concentrations (0, 10, 20, 40, and 60 mg/ml). In the presence of 10 mg/ml of lysozyme, there was no significant differences between the spots of colonies of the four strains grown, whereas the Δ EF_0783 and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants showed a reduced intensity in the spots at 20 mg/ml of lysozyme and no growth at 40 mg/ml compared to the WT and the Δ EF_1843 strains (Fig. 3). This experiment revealed that the Δ EF_0783 mutant and the Δ EF_0783 Δ EF_1843 double mutant are more sensitive to lysozyme than the parental JH2-2 strain and its derivative Δ EF_1843 mutant. The pHs of the media used for all these experiments correspond to physiological values (around pH 7) consistent with the optimal range (pH 6 to 9) of lysozyme activity.

Effects of EF_0783 and EF_1843 mutations on survival within mouse peritoneal macrophages. *E. faecalis* has already been shown to be able to persist for an extended period in mouse peritoneal macrophages by using a well-established in-

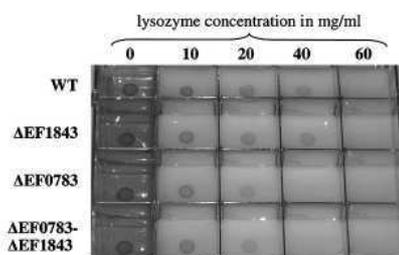


FIG. 3. Lysozyme sensitivity of *E. faecalis* JH2-2, Δ EF_1843 (Δ EF1843), Δ EF_0783 (Δ EF0783), and Δ EF_0783 Δ EF_1843 (Δ EF0783- Δ EF1843) strains. The sensitivity to lysozyme was tested on Mueller-Hinton agar medium containing potassium tellurite at 0.8 μ g/ml (to increase contrast between colonies and medium) and lysozyme at the indicated concentrations (in milligrams/milliliter).

fection model consisting of infecting BALB/c mice intraperitoneally, recovering infected macrophages, and then monitoring over a 72-h period the survival of intracellular bacteria within peritoneal macrophages maintained in vitro (25).

Since phagocytic cells produce lysozyme at high levels during phagocytosis (29), we compared the intracellular survival of the Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants and the WT strain inside infected mouse peritoneal macrophages (Fig. 4). In this experiment, the nonpathogenic strain *E. coli* DH5 α was used as a negative control, since this strain is known to be susceptible to killing by mouse peritoneal macrophages (25). No significant difference was observed in the levels of the *E. faecalis* strains recovered 8 h postinfection, suggesting that the strains possessed similar abilities to infect macrophages (Fig. 4). In contrast, *E. faecalis* JH2-2 was superior to the *E. faecalis* Δ EF_1843 and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants in its ability to survive intracellularly at the 24-, 48-, and 72-h time points ($P < 0.05$), whereas Δ EF_0783 was shown

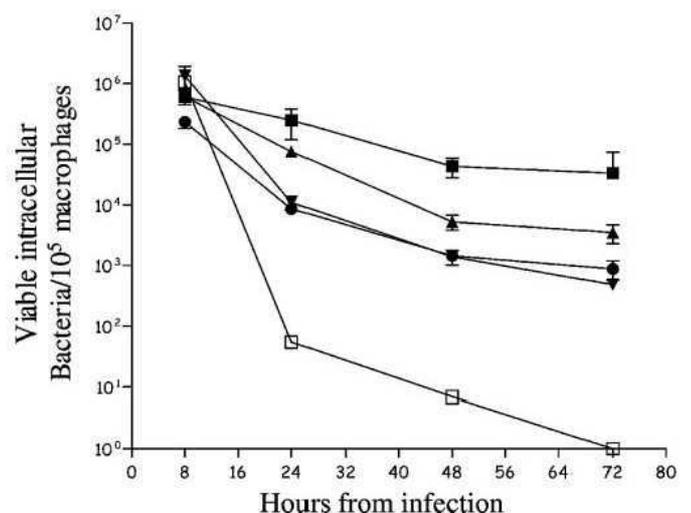


FIG. 4. Time course of intracellular survival of the *E. faecalis* and *E. coli* DH5 α strains within murine peritoneal macrophages. The data are the mean numbers of viable intracellular bacteria per 10^5 macrophages \pm standard deviations (error bars) for three independent experiments with three wells in each experiment. Symbols: \blacksquare , *E. faecalis* JH2-2; \blacktriangle , Δ EF_0783 mutant; \bullet , Δ EF_1843 mutant; \blacktriangledown , Δ EF_0783 Δ EF_1843 double mutant; \square , *E. coli* DH5 α .

to be more susceptible than strain JH2-2 to the macrophage killing only at 48- and 72-h time points ($P < 0.05$). At the end of the experiment, the survival of the parental strain JH2-2 was 1 to 2 log units higher than that of each mutant strain. As expected, *E. coli* DH5 α was efficiently killed by the macrophages ever since 24 h postinfection.

Muropeptide composition of *E. faecalis* peptidoglycan. In order to study the functions of the EF_0783 and EF_1843 genes, we determined the PG structures of Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants and compared them with the muropeptide profile of the *E. faecalis* parental strain JH2-2. After muramidase digestion and borohydride reduction of the obtained muropeptides, the PG from strain JH2-2 and its derivative mutants was analyzed by RP-HPLC and mass spectrometry (18). PG was extracted from the WT strain and the different mutants from exponential- and stationary-phase cultures (OD₆₀₀ of 0.5 and 2, respectively); the elution profiles of muropeptides extracted in both growth phase conditions were similar for each strain (data not shown). The mass of 29 muropeptides present in the WT strain was determined by MALDI-TOF mass spectrometry (Table 2 and Fig. 5). Taking into account the previously described *E. faecalis* PG structure (13, 30) (Fig. 6), we deduced the total number of Ala residues present in the C termini of the stem peptides and in the cross-bridges for each muropeptide. Our results showed nine muropeptides harboring a mass increase of 42 Da compared to nine other major muropeptides, suggesting the acetylation of these nine muropeptides. Furthermore, MALDI-post-source decay analysis of acetylated muropeptide 11 indicated that O acetylation occurs on NAM residues as described previously (17) (data not shown).

The muropeptide profiles of Δ EF_0783 and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants lacked the nine peaks corresponding to O-acetylated muropeptides (peaks 7, 11, 15, 18, 19, 24, 25, 27, and 29 in Table 2) present in the parental strain, JH2-2 PG (Fig. 5). These results confirmed our prediction, based on DNA homology, that the EF_0783 gene encodes the *E. faecalis* PG O-acetyltransferase.

In contrast, we did not observe any peak harboring a mass defect of 42 Da corresponding to de-N-acetylation in the parental JH2-2 strain, and no obvious differences were observed between the muropeptide profile of the *E. faecalis* parental strain and that of the Δ EF_1843 mutant. Moreover, the muropeptide profile of the Δ EF_0783 Δ EF_1843 double mutant was similar to that of the Δ EF_0783 mutant.

Following the observed survival sensitivity of the Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants within murine macrophages, we assessed the comparison of the PG structure of the WT strain grown under rich medium (BHI) and infectious conditions. Since the PG analysis is technically inappropriate for the macrophage model, the cells were incubated instead in an acidic, low magnesium, and minimal nutrient medium (MgM) designed to roughly mimic the macrophage phagosomal environment and to up-regulate virulence gene expression (2). The PG from the stationary-phase culture on BHI or on BHI followed by 4-h incubation in MgM following the procedure of Adkins et al. (2) was treated and extracted as described above. Under these conditions, the muropeptide profiles obtained in BHI and MgM medium were similar to those obtained in GM17 medium.

TABLE 2. Molecular masses of muropeptides from *E. faecalis* JH2-2 strain

Compound	Peak no. ^a	Structure			Molecular mass (Da)	
		R ^b	N ^c	Acetylation ^d	Observed ^e	Calculated ^f
Monomer	1	0	0		825.2968	825.3967
	2	0	2		967.4002	967.4709
	3	0	2		967.4280	967.4709
	4	0	1		896.3611	896.4338
	5	0	2		968.4374	968.4550
	6	0	2		967.3656	967.4709
	7*	0	2	2+Ac or 6+Ac	1,009.4857	1,009.4815
	8	0	3		1,038.5143	1,038.5081
	9	0	3		1,038.5505	1,038.5081
	10	0	4		1,109.6104	1,109.5452
	11*	0	4	10+Ac	1,151.6369	1,151.5557
Dimer	12	1	2		1,846.0257	1,845.8942
	13	1	4		1,987.9778	1,987.9685
	14	1	4		1,988.1494	1,987.9685
	15*	1	4	13+Ac	2,029.9014	2,029.9790
	16	1	5		2,059.1125	2,059.0056
	17	1	6		2,130.1473	2,130.0427
	18*	1	4	14+Ac	2,030.1084	2,029.9790
	19*	1	6	17+Ac	2,172.1323	2,172.0533
	Trimer	20	2	6		3,008.8402
21		2	6		3,008.3134	3,008.4613
22		2	7		3,079.3933	3,079.4984
23		2	8		3,150.3171	3,150.5355
24*		2	6	21+Ac or 20+Ac	3,050.3260	3,050.4718
25*		2	8	23+Ac	3,192.6598	3,192.5461
Tetramer	26	3	10		4,170.8157	4,171.0283
	27*	3	10	26+Ac	4,212.8034	4,213.0389
Pentamer	28	4	12		5,190.8824	5,191.5211
	29*	4	12	28+Ac	5,233.1140	5,233.5317

^a Numbers refer to Fig. 5; acetylated muropeptides are indicated by an asterisk.

^b R is the number of oligomeric structures (see Fig. 6).

^c N is the total number of alanine on positions a, b, and c (see Fig. 6) corresponding to the formula $N = a + (b \times R) + c$, where a, b, and c are the number of alanines on position a, b, and c, respectively.

^d Acetylation present on the indicated muropeptide numbered as in Fig. 5. 2+Ac, content of muropeptide from peak 2 harboring one additional acetyl group.

^e Observed mass of the reduced muropeptide.

^f Calculated mass of the reduced muropeptides, when all isoglutamate (iGlu) are amidated to isoglutamine (iGln), except for monomer 5 whose mass indicates the presence of iGlu.

Expression analysis of EF_1843 and its incidence on *E. faecalis* PG structure. The curious results obtained with the *pgdA* homologue raised the questions of whether EF_1843 is expressed and what is its potential effect on the PG structure. For this purpose, the comparative transcriptional analysis of EF_1843 on different media and with different infectious conditions (within mouse peritoneal macrophages) was performed. The quantitative RT-PCR assays showed that the expression of EF_1843 is weak and is expressed 15.1-fold \pm 0.08-fold more in cells grown on BHI compared to those grown in macrophages. Moreover, to establish whether EF_1843 has a PG de-N-acetylase function, we incubated the purified histidine-tagged EF_1843 protein (lacking its putative signal sequence) with purified PG under the conditions allowing the PG de-N-acetylation by PgdA of *S. pneumoniae* (10). After the RP-HPLC analysis under these conditions, no significant modification of the PG structure was observed (data not shown).

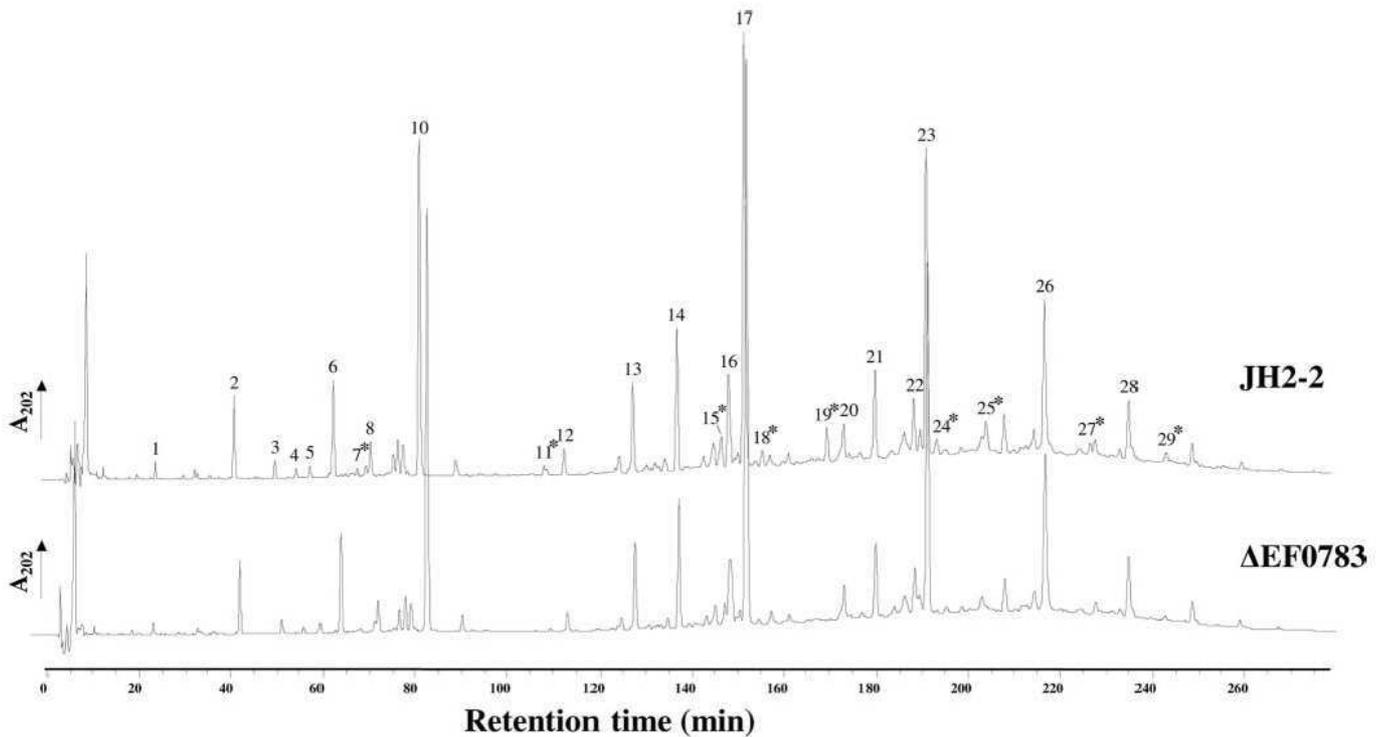


FIG. 5. RP-HPLC separation of mucopeptides from *E. faecalis* JH2-2 and the Δ EF_0783 mutant (Δ EF0783). See Table 2 for analysis of peaks. Asterisks indicate peaks identified as containing O-acetylated mucopeptides.

DISCUSSION

It is becoming apparent that pathogens have developed many strategies to evade host control. For example, structural modifications of lipopolysaccharides or secondary polysaccharides and antigenic variation of virulence factors have been acknowledged for some time as mechanisms to escape the innate and adaptive immune systems. Since 1958, it has been known that bacteria have developed ingenious strategies, such as O acetylation (1, 15) and/or de-N-acetylation (3) of the PG, to counteract the hydrolytic activity of lysozyme. Recent studies show that PG is the pathogen-associated molecular pattern recognized by some recently discovered intracellular receptors of the innate immune system (such as Nod proteins and Toll-

like receptors) (11, 19). Thus, we hypothesize that O acetylation and de-N-acetylation might be bacterial mechanisms that affect the capacity of the host to present these PG motifs and, therefore, to set up an appropriate response to infection.

In this study, the analysis of the mucopeptides isolated from WT PG of *E. faecalis* showed different peaks with an additional mass of 42 Da (Table 2 and Fig. 5). This strongly suggests the presence of an additional acetyl group in the compounds of these peaks. PG of the Δ EF_0783 mutant lacked these peaks, which indicated that EF_0783 is involved in PG acetylation as previously described for the *S. aureus* OatA homologue (7). This acetylation should occur at the C-6 OH group of NAM, as demonstrated by MALDI-post-source decay (data not shown) analysis and in accordance with other studies (17, 34, 42). All these data indicate that EF_0783 encodes an NAM-specific O-acetyltransferase, and therefore, we propose naming it the *oatA* gene.

Sequence alignment of the EF_1843 protein with three PG N-acetylglucosamine deacetylase proteins (Fig. 1) shows that conserved catalytic residues and metal ligand amino acids of the family 4 carbohydrate esterases identified by Blair et al. (9, 10) are conserved in all these proteins. In spite of this homology and although EF_1843 is expressed 15-fold more on BHI than in mouse peritoneal macrophages, no de-N-acetylated mucopeptides were identified and no obvious difference was observed between the mucopeptide profiles of the *E. faecalis* parental strain and Δ EF1843 mutant in BHI, GM17, or MgM medium. Moreover, no evidence for de-N-acetylase activity was found for the histidine-tagged EF_1843 protein when incubated directly with the purified PG. These data strongly suggest that EF_1843 does not have a PG de-N-acetylase ac-

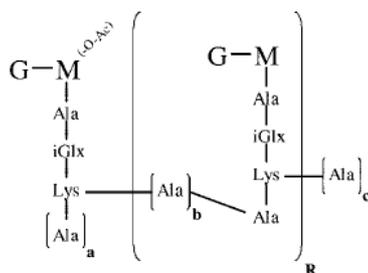


FIG. 6. Model structure for mucopeptides from *E. faecalis* PG showing possible variations in the number of alanyl residues in the C terminus of peptide stems (a), in the cross-bridges (b), and in the free N-terminal side chains (c). R is the number of cross-bridges in oligomeric structures. G, N-acetylglucosamine; M, N-acetylmuramic acid; Ala, alanine; iGlx, isoglucosamine or isoglucamate; Lys, lysine; O-Ac, O acetylation.

tivity, which is in agreement with the literature data, since to our knowledge, no de-N-acetylated PG was reported during previous *E. faecalis* PG structure analysis.

As there is no cleavage site on the EF_1843 protein sequence for any known leader peptidase, the protein is most likely translocated across the cytoplasmic membrane by components of the general secretory pathway and remains anchored to the cytoplasmic membrane by its N-terminal membrane domain. Because of the location of the enzyme, the substrate of this member of the polysaccharide deacetylase family would be another extracellular polysaccharide, rather than PG.

It is conceivable that O acetylation of NAM plays a role in controlling the activity of enterococcal cell wall-hydrolyzing enzymes. It has been shown that *E. faecalis* produces different kinds of autolysins that preferentially hydrolyze either O-acetylated or non-O-acetylated PG (35). Vollmer and Tomasz (48) hypothesized that de-N-acetylation could also be involved in the control of autolysins. However, no difference in morphology (photonic microscopy), growth rate in exponential-phase cultures, and autolysis of stationary-phase cultures has been observed for Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants, indicating that these genes do not have an obvious key role in the regulation of autolysin processes.

In numerous bacteria, resistance to lysozyme was shown to be directly proportional to the levels of O-acetylated and de-N-acetylated PG. Phenotypic analyses of the Δ EF_1843 mutant did not show a decrease in lysozyme resistance. Only the Δ EF_0783 and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants have an obvious sensitivity to exogenous lysozyme (Fig. 3). It is noteworthy that the sensitivity of the non-O-acetylated strains remains relative because their growths are only slightly inhibited under 20 mg/ml of lysozyme. In comparison, the growth of *S. aureus oata* deletion mutant is affected at 0.8 mg/ml in a lysozyme agar diffusion assay, while its parental strain resists lysozyme concentrations up to 50 mg/ml in liquid medium (6, 7). On the other hand, many bacteria are very sensitive to lysozyme; for example, *Listeria monocytogenes* and *S. pneumoniae* show lysozyme sensitivity at concentrations of 10 μ g/ml and 80 μ g/ml, respectively (12, 48). Collectively, these data suggest that EF_0783 is involved in lysozyme resistance but also that PG O acetylation and de-N-acetylation are not major determinants for lysozyme resistance of *E. faecalis*.

In this work, we demonstrated that the number of viable intracellular bacteria in infected murine macrophages was significantly reduced in Δ EF_0783, Δ EF_1843, and Δ EF_0783 Δ EF_1843 mutants over the 72-h infection period compared with the JH2-2 wild-type strain of *E. faecalis*. This suggests that the EF_0783 and EF_1843 genes may be part of the virulence mechanisms of *E. faecalis*. We could hypothesize that the diminution of persistence in mouse peritoneal macrophages observed for the Δ EF_0783 strain is due to a decrease in lysozyme resistance. However, this hypothesis does not explain the Δ EF_1843 mutant phenotype. As PG motifs are pathogen-associated molecular patterns recognized by the innate immune system, O acetylation may confer to *E. faecalis* the ability to evade this defense system, as shown recently for PG de-N-acetylation in *Listeria monocytogenes* (12). Even if the EF_1843 gene is expressed less in mouse peritoneal macrophages, this level of expression seems sufficient to confer a survival advantage to *E. faecalis* under infectious conditions.

In contrast to lysozyme, a small protein with a molecular mass of 14 kDa, it is assumed that small amounts (less than 50 μ g/ml) of mutanolysin (a 23-kDa muramidase from *Streptomyces globisporus*, not affected by PG O acetylation) (41) usually lysed enterococci. This observation helps to rule out hampered access of lysozyme to its target substrate, i.e., the PG, and suggests that the resistance of *E. faecalis* to lysozyme may rather be due to a phenomenon that specifically inhibits lysozyme activity.

Moreover, several lines of evidence suggest that lysozyme possesses a bactericidal mode of action that is independent of its enzymatic activity and that does not cause cell lysis. This nonenzymatic inactivation mechanism has been attributed to cytoplasmic membrane destabilization due to the cationic properties of lysozyme, resulting in cell leakage, or to the induction of autolysins (31). This finding may explain why deletion of a PG modification enzyme, like the EF_0783 protein, has such a moderate effect on lysozyme resistance of *E. faecalis*. In fact, we could hypothesize that this bacterium possesses mechanisms other than PG modification that inhibit the nonenzymic and/or nonlytic mode of action of lysozyme. Such mechanisms might involve secreted proteinaceous lysozyme inhibitors, such as Ivy and Sic reported in *E. coli* (20) and *S. pyogenes* (8), respectively. If they exist, these genes remain to be identified, as no homologue for Ivy or Sic is present in the *E. faecalis* V583 genome sequence. Another way to explain the great lysozyme resistance of *E. faecalis* is the possible contribution of PG cross-linking and phosphoester-linked wall teichoic acid in the C-6 position of NAM (the same site as for O acetylation) to the resistance against the hydrolytic activity of lysozyme as recently shown for *S. aureus* (6).

Finally, we can add that EF_1843 is not responsible for the lysozyme sensitivity phenotype observed for the *E. faecalis sigV* mutant as first hypothesized by Benachour et al. (5), and unlike *S. pneumoniae* PgdA (48), it appears to not be a PG de-N-acetylase. Taken together, our results showed that *E. faecalis* lysozyme resistance constitutes an unusual model where EF_0783 PG O-acetyltransferase plays a role but is not the major determinant of lysozyme resistance.

ACKNOWLEDGMENTS

L. Hébert was supported by a thesis grant awarded by Region Basse-Normandie and INRA.

We are grateful to François Lebreton for technical assistance and to Jean-Christophe Giard and Vianney Pichereau for critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Abrams, A. 1958. O-acetyl groups in the cell wall of *Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem. 230:949-959.
- Adkins, J. N., H. M. Mottaz, A. D. Norbeck, J. K. Gustin, J. Rue, T. R. W. Clauss, S. O. Purvine, K. D. Rodland, F. Heffron, and R. D. Smith. 2006. Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. Mol. Cell. Proteomics 5:1450-1461.
- Araki, Y., S. Fukuoka, S. Oba, and E. Ito. 1971. Enzymatic deacetylation of N-acetylglucosamine residues in peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:751-758.
- Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Débarbouillé. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70:6887-6891.
- Benachour, A., C. Muller, M. Dabrowski-Coton, Y. Le Breton, J.-C. Giard, A. Rincé, Y. Auffray, and A. Hartke. 2005. The *Enterococcus faecalis* SigV protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival following heat, acid, and ethanol treatments. J. Bacteriol. 187:1022-1035.

6. Bera, A., R. Biswas, S. Herbert, E. Kulauzovic, C. Weidenmaier, A. Peschel, and F. Götz. 2007. Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:280–283.
7. Bera, A., S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, and F. Götz. 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan *O*-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **55**:778–787.
8. Binks, M. J., B. A. Fernie-King, D. J. Seilly, P. J. Lachmann, and K. S. Sriprakash. 2005. Attribution of the various inhibitory actions of the streptococcal inhibitor of complement (SIC) to regions within the molecule. *J. Biol. Chem.* **280**:20120–20125.
9. Blair, D. E., O. Hekmat, A. W. Schüttelkopf, B. Shrestha, K. Tokuyasu, S. G. Withers, and D. M. F. van Aalten. 2006. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry* **45**:9416–9426.
10. Blair, D. E., A. W. Schüttelkopf, J. I. MacRae, and D. M. F. van Aalten. 2005. Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:15429–15434.
11. Boneca, I. G. 2005. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:46–53.
12. Boneca, I. G., O. Dussurget, D. Cabanes, M. A. Nahori, S. Sousa, M. Lecuit, E. Psyllinakis, V. Bouriotis, J. P. Hugot, M. Giovannini, A. Coyle, J. Bertin, A. Namane, J. C. Rousselle, N. Cayet, M. C. Prévost, V. Balloy, M. Chignard, D. J. Philpott, P. Cossart, and S. E. Girardin. 2007. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:997–1002.
13. Bouthss, A., N. Josseaume, A. Severin, K. Tabei, J.-E. Hugonnet, D. Shlaes, D. Mengin-Lecreux, J. van Heijenoort, and M. Arthur. 2002. Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **277**:45935–45941.
14. Brinster, S., B. Posteraro, H. Bierre, A. Alberti, S. Makhzami, M. Sanguinetti, and P. Serror. 2007. Enterococcal leucine-rich-repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response. *Infect. Immun.* **75**:4463–4471.
15. Brumfitt, W., A. C. Wardlaw, and J. T. Park. 1958. Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodieticus* and its association with an increased *O*-acetyl content of the cell wall. *Nature* **181**:1783–1784.
16. Chesbro, W. R. 1961. Lysozyme and the production of osmotic fragility in enterococci. *Can. J. Microbiol.* **7**:952–955.
17. Clarke, A. J., and C. Dupont. 1992. *O*-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **38**:85–91.
18. Courtin, P., G. Miranda, A. Guillot, F. Wessner, C. Mézange, E. Domakova, S. Kulakauskas, and M.-P. Chapot-Chartier. 2006. Peptidoglycan structure analysis of *Lactococcus lactis* reveals the presence of an L,D-carboxypeptidase involved in peptidoglycan maturation. *J. Bacteriol.* **188**:5293–5298.
19. Creagh, E. M., and L. A. J. O'Neill. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* **27**:352–357.
20. Deckers, D., B. Masschalck, A. Aertsen, L. Callewaert, C. G. M. Van Tiggelen, M. Atanassova, and C. W. Michiels. 2004. Periplasmic lysozyme inhibitor contributes to lysozyme resistance in *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:1229–1237.
21. Delogu, G., M. Sanguinetti, B. Posteraro, S. Rocca, S. Zanetti, and G. Fadda. 2006. The *hbbA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically upregulated in the lungs but not in the spleens of aerogenically infected mice. *Infect. Immun.* **74**:3006–3011.
22. Dillard, J. P., and K. T. Hackett. 2005. Mutations affecting peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **73**:5697–5705.
23. Dupont, C., and A. J. Clarke. 1991. Evidence for N→O acetyl migration as the mechanism for *O*-acetylation of peptidoglycan in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **173**:4318–4324.
24. Franklin, K., and A. J. Clarke. 2001. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-*N*-acetyltransferase of *Providencia stuartii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2238–2244.
25. Gentry-Weeks, C. R., R. Karkhoff-Schweizer, A. Piki, M. Estay, and J. M. Keith. 1999. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **67**:2160–2165.
26. Gilmore, M. S., P. S. Coburn, S. R. Nallapareddy, and B. E. Murray. 2002. Enterococcal virulence, p. 301–354. In M. S. Gilmore (ed.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
27. Huycke, M. M., D. F. Sahn, and M. S. Gilmore. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:239–249.
28. Ibrahim, H. R., T. Aoki, and A. Pellegrini. 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr. Pharm. Des.* **8**:671–693.
29. Keshav, S., P. Chung, G. Milton, and S. Gordon. 1991. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J. Exp. Med.* **174**:1049–1058.
30. Mainardi, J. L., D. Billot-Klein, A. Coutrot, R. Legrand, B. Schoot, and L. Gutmann. 1998. Resistance to cefotaxime and peptidoglycan composition in *Enterococcus faecalis* are influenced by exogenous sodium chloride. *Microbiology* **144**:2679–2685.
31. Masschalck, B., and C. W. Michiels. 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **29**:191–214.
32. Meijerink, J., C. Mandigers, L. van de Locht, E. Tönissen, F. Goodsaid, and J. Raemaekers. 2001. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J. Mol. Diagn.* **3**:55–61.
33. Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, and C. M. Fraser. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**:2071–2074.
34. Paye, K. G., H. Strating, and A. J. Clarke. 1996. The role of *O*-acetylation in the metabolism of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *Microb. Drug Resist.* **2**:135–140.
35. Pfeffer, J. M., H. Strating, J. T. Weadge, and A. J. Clarke. 2006. Peptidoglycan *O* acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* **188**:902–908.
36. Rakita, R. M., N. N. Vanek, K. Jacques-Palaz, M. Mee, M. M. Mariscalco, G. M. Dunny, M. Snuggs, W. B. Van Winkle, and S. I. Simon. 1999. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect. Immun.* **67**:6067–6075.
37. Rince, A., S. Flahaut, and Y. Auffray. 2000. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* **55**:87–91.
38. Rosenthal, R. S., J. K. Blundell, and H. R. Perkins. 1982. Strain-related differences in lysozyme sensitivity and extent of *O*-acetylation of gonococcal peptidoglycan. *Infect. Immun.* **37**:826–829.
39. Rosenthal, R. S., W. J. Folkening, D. R. Miller, and S. C. Swim. 1983. Resistance of *O*-acetylated gonococcal peptidoglycan to human peptidoglycan-degrading enzymes. *Infect. Immun.* **40**:903–911.
40. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
41. Shiba, T., S. Harada, H. Sugawara, H. Naitow, Y. Kai, and Y. Satow. 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a bacterial lysozyme produced by *Streptomyces globisporus*. *Acta Crystallogr. Sect. D* **56**:1462–1463.
42. Swim, S. C., M. A. Gfell, C. E. Wilde III, and R. S. Rosenthal. 1983. Strain distribution in extents of lysozyme resistance and *O*-acetylation of gonococcal peptidoglycan determined by high-performance liquid chromatography. *Infect. Immun.* **42**:446–452.
43. Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**:807–813.
44. Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. H. Jongbloed, S. Bron, and J. M. van Dijk. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:515–547.
45. Veiga, P., C. Bulbarela-Sampieri, S. Furlan, A. Maisons, M.-P. Chapot-Chartier, M. Erkelenz, P. Mervelet, P. Noirot, D. Frees, O. P. Kuipers, J. Kok, A. Gruss, G. Buist, and S. Kulakauskas. 2007. SpxB regulates *O*-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **282**:19342–19354.
46. Verneuil, N., A. Mazé, M. Sanguinetti, J. M. Laplace, A. Benachour, Y. Auffray, J. C. Giard, and A. Hartke. 2006. Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiology* **152**:2579–2589.
47. Verneuil, N., M. Sanguinetti, Y. Le Breton, B. Posteraro, G. Fadda, Y. Auffray, A. Hartke, and J.-C. Giard. 2004. Effects of the *Enterococcus faecalis* *hypR* gene encoding a new transcriptional regulator on oxidative stress response and intracellular survival within macrophages. *Infect. Immun.* **72**:4424–4431.
48. Vollmer, W., and A. Tomasz. 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**:20496–20501.
49. Yagi, Y., and D. B. Clewell. 1980. Recombination-deficient mutant of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **143**:966–970.

Lors des deux dernières décennies, *Enterococcus faecalis* a émergé comme une cause majeure d'infections nosocomiales. *E. faecalis* est une des rares bactéries presque complètement résistante à l'un des composés les plus importants et les plus répandus du système immunitaire inné : le lysozyme. C'est donc l'étude des causes de cette résistance qui nous a intéressé au cours de ce travail de thèse.

Nous avons identifié deux gènes nommés EF0783 et EF1843, potentiellement impliqués dans la résistance au lysozyme. Les protéines codées par ces gènes partagent respectivement des homologies avec une *O*-acétyltransférase du peptidoglycane (OatA) de *Staphylococcus aureus* et une *N*-acétylglucosamine déacétylase (PgdA) de *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons construit les mutants correspondants (Δ EF0783 et Δ EF1843) et le double mutant Δ EF0783- Δ EF1843. Nous avons montré que la mutation de EF0783 entraîne la perte des groupements *O*-acétyles du peptidoglycane ainsi qu'une diminution de la résistance au lysozyme. Par contre, aucun effet sur la résistance au lysozyme n'a été associé au gène EF1843. De plus, la délétion de EF0783 et/ou de EF1843 affecte significativement la capacité d'*E. faecalis* à survivre dans des macrophages murins.

Bien que EF0783 soit effectivement impliqué dans la résistance au lysozyme, la *O*-acétylation et la dé-*N*-acétylation ne sont pas les principaux mécanismes conférant les hauts niveaux de résistance au lysozyme à *E. faecalis*. Des expériences pour identifier d'autres facteurs expliquant cette résistance au lysozyme sont à envisager.

Study of lysozyme resistance in *Enterococcus faecalis*.

Over the two last decades, *Enterococcus faecalis* has emerged as major cause of nosocomial infections. *E. faecalis* is also a member of the few bacteria that are almost completely resistant to one of the most important and widespread compounds of the constitutive defence system: the lysozyme. Therefore, the bases of this high resistance to lysozyme were investigated within this thesis work.

We identified two genes referred as EF0783 and EF1843, potentially involved in lysozyme resistance. Proteins encoded by these genes share homology with *Staphylococcus aureus* peptidoglycan *O*-acetyltransferase (OatA) and *Streptococcus pneumoniae* *N*-acetylglucosamine deacetylase (PgdA), respectively. We constructed the corresponding mutants (Δ EF0783 and Δ EF1843) and the double mutant Δ EF0783- Δ EF1843. We showed that EF0783 mutation leads to the loss of *O*-acetyl groups from the peptidoglycan and to a decrease of the lysozyme resistance. On the other hand, no effect on lysozyme sensitivity could be associated to the EF1843 gene. Moreover, the EF0783 and/or EF1843 deletions significantly affect the ability of *E. faecalis* to survive within murine macrophages.

While EF0783 is involved in the lysozyme resistance, the peptidoglycan *O*-acetylation and de-*N*-acetylation are not the main mechanisms conferring high levels of lysozyme resistance to *E. faecalis*. Experiments aiming to identify additional factors explaining this lysozyme resistance have to be considered.

MOTS-CLES

Indexation Rameau : *Enterococcus*, lysozyme, virulence (microbiologie), génétique microbienne

Indexation libre : peptidoglycane

DISCIPLINE

Microbiologie, Biologie Moléculaire

Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement EA956-USC INRA 2017. Université de Caen, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex.