

N° ordre :

N° série :

Thèse
Préparée en vue de l'obtention du
Doctorat en Sciences
Option : Biochimie et Microbiologie

Préparée par
Mokhtari Abdelhamid

Thème

**Aspects génétiques en relation avec le métabolisme
du maltose chez les bactéries à Gram+ :
*Bacillus subtilis et Enterococcus faecalis***

Soutenue publiquement le 17 Novembre 2014

Membres du Jury

Président :	Pr Boulahrouf A.	Univ Mentouri Constantine
Directrice de thèse :	Pr Mechakra-Maza A.	Univ Mentouri Constantine
Co-directeur de thèse :	D.R. Deutscher J.	AgroParisTech, France
Examineurs :	Pr Hartke A.	Univ Caen, France
	Pr Touil-Boukoffa C.	USTHB Alger
	Pr Karam N.	USTOran

Remerciements

Il m'est agréable d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont apporté de près ou de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de cette thèse de doctorat. Mes premiers remerciements vont d'abord à l'état algérien, qui m'a permis de terminer cette formation, en me fournissant les ressources nécessaires. Que tous ceux qui ont contribué à faciliter cette étude trouvent ici le témoignage de ma sincère gratitude.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse, Professeur Mechakra-Maza A. pour l'aide qu'elle m'a apportée. Son œil critique m'a été très précieux. Je vous suis reconnaissant de m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de ces années, tout en me donnant toutefois la possibilité de trouver par moi-même mon cheminement personnel.

Je remercie également mon co-encadreur Monsieur Deutscher J. pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, ainsi que pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes. Je vous remercie pour tous vos conseils et critiques et le partage de vos connaissances lors de nos nombreuses discussions. Merci pour votre écoute, votre générosité, votre patience, et votre extraordinaire force de travail qui font de vous un exemple dont j'espère pouvoir encore profiter longtemps.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, le président Professeur Boulahrouf A. et les professeurs Touil-Boukoffa C., Hartke A et Karam N. pour avoir consacré de leur précieux temps à la lecture de ce document.

Un grand merci à toutes les personnes du Laboratoire de Microbiologie et de Génétique moléculaire, MICALIS de l'AgroParis Tech Grignon ; Alexa, Arthur, Cao, Eliane, Francine, Guillermo, Houda, Meriem, Philippe et Takfarinas, ainsi que Abderahmane, Guy et Stéphane.

Que toutes les personnes que j'ai oubliées de citer reçoivent mes sincères remerciements et ma reconnaissance.

Je remercie toute ma famille pour son soutien tout le long de la préparation de cette thèse, notamment dans les moments difficiles.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<u>PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
1. L'AMIDON : STRUCTURE ET DEGRADATION	3
2. COMPOSITION CHIMIQUE	3
2.1. L'AMYLOSE	3
2.2. L'AMYLOPECTINE.....	4
3. DEGRADATION DE L'AMIDON	5
4. LES SYSTEMES DE TRANSPORT DES SUCRES CHEZ LES MICROORGANISMES	7
4.1. LA DIFFUSION FACILITEE	7
4.2. LES TRANSPORTEURS ABC	7
4.3. LES SYSTEMES DE TRANSPORT SECONDAIRE	8
4.4. LE PEP: CARBOHYDRATE PHOSPHOTRANSFERASE SYSTEM (PTS).....	9
5. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES IMPLIQUES DANS LE METABOLISME DU CARBONE	12
5.1. LA REPRESSION CATABOLIQUE	12
5.2. LA REPRESSION CATABOLIQUE CHEZ LES BACTERIES A GRAM POSITIFS ET A GRAM NEGATIFS	12
5.3. LA REPRESSION CATABOLIQUE MEDIEE PAR CCPA ET HPR.....	13
5.4. MECANISME DE LA REPRESSION CATABOLIQUE MEDIEE PAR CCPA ET HPR.....	15
5.4.1. La protéine CcpA	17
5.4.2. Les protéines HPr et Crh	18
5.4.3. Rôle des petites molécules dans la régulation de l'activité de CcpA	19
6. BACILLUS SUBTILIS UN MODELE D'ETUDE.....	19
7. LE METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ B. SUBTILIS	21
8. LE PTS CHEZ B. SUBTILIS	22
9. LE METABOLISME DU MALTOSE CHEZ B. SUBTILIS	24
9.1. IMPLICATION DU PTS DANS L'UTILISATION DU MALTOSE CHEZ B. SUBTILIS.....	25
9.2. L'ORGANISATION DES GENES DU METABOLISME DU MALTOSE CHEZ B. SUBTILIS	26
9.2.1. Structure et organisation de l'opéron glv.....	26
9.2.1.1. Le gène glvA.....	26
9.2.1.2. Le gene glvC.....	27
9.2.1.3. Le gene glvR.....	28
9.2.2. Transport et utilisation du maltose et des maltodextrines par le système ABC.....	29
9.2.3. Description du système ABC chez B. subtilis	30
9.2.3.1. Le gène mall (yvdL) et MAase (YvdF)	30
9.2.3.2. La maltose phosphorylase et la β - phosphoglucomutase	32
9.2.3.3. La MdxE (maltodextrin binding protein).....	32
9.3. MODELE DE LA VOIE METABOLIQUE DU MALTOSE CHEZ B. SUBTILIS	33
10. LE METABOLISME DU MALTOSE CHEZ ENTEROCOCCUS. FAECALIS	35
10.1. CARACTERISTIQUES DE E. FAECALIS	35
10.2. LE METABOLISME DU MALTOSE CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES	36
10.2.1. Description de la voie métabolique du maltose chez E. faecalis.....	38

10.2.2.	<i>Organisation génétique de l'opéron malMBPR</i>	38
10.2.2.1.	<i>Le gène malP</i>	39
10.2.2.2.	<i>Le gène malT</i>	39
10.2.2.3.	<i>Le gène malR</i>	40
10.2.3.	<i>Rôle probable de la phosphoglucomutase dans le métabolisme du tréhalose chez E. faecalis</i>	41

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

1.	SOUCHES UTILISEES	43
1.1.	LES SOUCHES BACTERIENNES.....	43
1.2.	PLASMIDES.....	44
1.3.	LES CONDITIONS DE CROISSANCE	46
1.4.	CONSERVATION DES SOUCHES.....	46
2.	METHODE D'EXPLORATION DU MATERIEL GENETIQUE	47
2.1.	EXTRACTION DE L'ADN CHROMOSOMIQUE DE <i>B. SUBTILIS</i>	47
2.2.	EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE	47
2.3.	AMPLIFICATION PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR).....	47
2.4.	ELECTROPHORESE D'ADN.....	48
2.5.	PURIFICATION DE L'ADN	48
2.6.	DIGESTION ET LIGATURE.....	48
3.	CONSTRUCTION DES MUTANTS ET DES VECTEURS	49
3.1.	CONSTRUCTION D'UNE SOUCHE DE <i>E. FAECALIS DEFECTUEUSE POUR LE GENE MALP</i>	50
3.2.	CONSTRUCTION D'UN MUTANT <i>E. FAECALIS MAPP</i>	51
3.3.	CONSTRUCTION D'UN MUTANT <i>B. SUBTILIS</i> DELETE POUR LE GENE <i>MALA</i>	51
3.4.	CONSTRUCTION D'UN DOUBLE MUTANT DE <i>B. SUBTILIS MALA MDXE</i>	52
3.5.	COMPLEMENTATION DU MUTANT DE <i>B. SUBTILIS MALA-MDXE</i> AVEC <i>E. FAECALIS MAPP</i>	52
4.	METHODES CONCERNANT LES CELLULES	52
4.1.	PREPARATION DE CELLULES COMPETENTES D' <i>E. COLI</i>	52
4.2.	ELECTROPORATION DE CELLULES COMPETENTES D' <i>E. COLI</i>	53
4.3.	PREPARATION DES CELLULES COMPETENTES DE <i>B. SUBTILIS</i>	53
4.4.	TRANSFORMATION DES CELLULES COMPETENTES DE <i>B. SUBTILIS</i>	53
4.5.	MILIEUX MINIMUMS POUR PREPARER DES CELLULES COMPETENTES DE <i>B. SUBTILIS</i>	54
5.	CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS OU MUTANTS	54
5.1.	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	54
5.2.	TEST DE CRIBLAGE BLEU/BLANC.....	54
5.3.	VERIFICATION DES CLONES PAR PCR	55
5.4.	VERIFICATION DES CLONES PAR SEQUENÇAGE	55
6.	METHODES CONCERNANT LES PROTEINES	55
6.1.	PURIFICATION DE LA MALTOSÉ-PHOSPHORYLASE ET DE LA MALTOSÉ-6-P PHOSPHATASE DE <i>E. FAECALIS</i> FUSIONNEES A 6 RESIDUS HISTIDYLES.....	55
6.2.	PRODUCTION DE MAPP ET MALP-HISTIDINE-TAGGED DANS <i>E. COLI</i> NM522 ET LEURS PURIFICATION	56
6.3.	PURIFICATION DE PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE.....	56
6.4.	DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD	57
6.5.	ELECTROPHORESE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS.....	57
6.6.	COLORATION DES PROTEINES	57

7. DOSAGES SPECTROPHOTOMETRIQUES DES ACTIVITES DE LA MALTOSE PHOSPHORYLASE ET DE LA MALTOSE-6'-P PHOSPHATASE.....	57
9 ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DES COMPOSES PHOSPHORYLES TRAITES AVEC MAPP	59
10 ÉTUDES DE TRANSPORT DU MALTOSE AVEC LE MALTOSE-[14C] *	59
11 SEPARATION ET CARACTERISATION DES COMPOSES RADIOACTIFS CHARGÉES NEGATIVEMENT ACCUMULES PENDANT L'ABSORPTION DU [14C]-MALTOSE *	60

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1. OBJECTIFS DU TRAVAIL	61
2. MALP PRESENTE UNE ACTIVITE MALTOSE-PHOSPHORYLASE, ET NON UNE ACTIVITE MALTOSE-6'-P PHOSPHORYLASE	61
3. L'INACTIVATION DU GENE CODANT POUR LA MALTOSE PHOSPHORYLASE MALP BLOQUE LE METABOLISME DU MALTOSE	64
4. LE GENE EN AVAL DE <i>MALT</i> CODE POUR UNE MALTOSE-6'-P PHOSPHATASE.....	66
5. MAPP ATTAQUE PREFERENTIELLEMENT LES DISACCHARIDES PHOSPHATES CONTENANT UNE LIAISON α -GLYCOSIDIQUE	70
7. COMPLEMENTATION HETEROLOGUE D'UN DOUBLE MUTANT <i>MALA MDXE</i> DE <i>B. SUBTILIS</i> AVEC LE MUTANT <i>MAPP</i> DE <i>E. FAECALIS</i>	78
CONCLUSION	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83
ANNEXE.....	99
RESUME.....	100

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique message
ATP	adénosine triphosphate
CAP	catabolite Activator Protein
CcpA	catabolite control protein A
Cra	catabolite activator/repressor
cre	catabolite responsive element
Crh	catabolite repression HPr
CRP	cAMP receptor protein
EI	enzyme I
EII	enzyme II
F26P	fructose-2,6-biphosphate
F6P	fructose-6-phosphate
FBP	fructose-1,6-biphosphate
GLC	glucose
GTP	guanosine triphosphate
His	histidine
HPr	heat resistant protein
HPrK/P	HPr kinase/phosphatase
IPTG	isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
LAB	bactéries acidolactiques
LAC	lactate
mM	millimolaire
MS	spectrométrie de masse
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ORF	open reading frame / phase ouverte de lecture
P~His15-HPr	forme phosphorylée d'HPr sur l'histidine 15
P~Ser46-HPr	forme phosphorylée d'HPr sur la sérine 46

Pb	paire de base
PEP	phosphoénopyruvate
PGM	phosphoglycérate mutase
Pi	phosphate inorganique
PPP	voie des pentoses phosphates
PRD	PTS Regulation Domain
PTS	phosphoénolpyruvate: sucre phosphotransférase
PYR	pyruvate
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE	électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide dénaturant
TCS	système à deux composants
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Liste des figures et des tableaux

		Pages
Figure 1	<i>α-D-glucose de conformation 4C1 (thermodynamiquement la plus stable)</i>	03
Figure 2	<i>chaîne d'amylose</i>	04
Figure 3	<i>Amylopectine avec les branchements α-(1-6)</i>	04
Figure 4	<i>Les différentes enzymes impliquées dans la conversion de l'amidon.</i>	05
Figure 5	<i>Cascade de phosphorylation du PTS. Les flèches à double sens indiquent les quatre réactions réversibles. Seule la dernière étape (5) est irréversible.</i>	10
Figure 6	<i>Le transport du glucose par le système phosphotransferase chez <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	10
Figure 7	<i>Configuration des EII du PTS.</i>	11
Figure 8	<i>RC des bactéries à Gram positifs et à Gram négatif.</i>	13
Figure 9	<i>Rôle du FBP dans la mise en place de la regulation catabolique par l'intermédiaire de P~Ser-HPr.</i>	15
Figure 10	<i>Régulation des gènes par CcpA.</i>	16
Tableau 1	<i>Affinité de CcpA, LacI et GalR pour l'ADN.</i>	19
Figure 11	<i>Phylogénie globale de 191 espèces séquencées.</i>	20
Figure 12	<i>Systèmes de transport PTS chez <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	23
Figure 13	<i>Représentation schématique de l'opéron <i>glv</i> chez <i>Bacillus subtilis</i></i>	25
Figure 14	<i>Détermination du site d'initiation de la transcription de l'opéron <i>glv</i>.</i>	28
Figure 15	<i>Organisation génétique du système de transport de type ABC spécifique aux maltodextrines chez <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	30
Figure 16	<i>Modèle schématique de l'utilisation de l'amidon chez <i>Bacillus subtilis</i>.</i>	34
Figure 17	<i>Organisation taxonomique des bactéries à Gram positifs du phylum des firmicutes.</i>	35
Figure 18	<i>Les différentes voies métaboliques impliquées dans l'utilisation du maltose chez les bactéries lactiques.</i>	37
Figure 19	<i>Organisation génétique de l'opéron <i>malPBMR</i> chez <i>Enterococcus</i></i>	38

	<i>faecalis.</i>	
Tableau 2	<i>Différentes souches et plasmide utilisés.</i>	43
Figure 20	<i>Représentation schématique du pMAD.</i>	45
Figure 21	<i>Représentation schématique du plasmide pQE30.</i>	45
Tableau 3	<i>Liste des amorces utilisés dans cette étude.</i>	49
Figure 22	<i>protocole de mutagenese par le vecteur pMAD.</i>	55
Figure 23	<i>Organisation des gènes codant pour les protéines impliqués dans l'utilisation du maltose chez E. faecalis JH2-2.</i>	62
Figure.24	<i>Le comportement de croissance de la souche de type sauvage E. faecalis JH2-2 et les mutants MalP MapP dans un milieu M17 complété avec (A) 0,5% de glucose ou (B) 0,5% de maltose.</i>	64
Tableau 4	<i>Répartition des composés radioactifs sous leur forme chargées et non chargées, après la captation du maltose-[¹⁴C] par la souche sauvage E. faecalis JH2-2 et les mutants MALP et Mapp.</i>	65
Figure 25	<i>Etudes de l'absorption du maltose-[¹⁴C] chez la souche sauvage E. faecalis JH2-2 et les mutants MalP et MapP. Les expériences ont été réalisées avec 55 µM de maltose-[¹⁴C],</i>	66
Figure 26	<i>Dosage spectrophotométrique de l'activité de la phosphatase-6'-maltose P par réaction de couplage.</i>	67
Figure 27	<i>La catalyse par MapP de la conversion du maltose-6'-P en maltose a été mis en évidence par spectroscopie de masse.</i>	68 - 69
Tableau 5	<i>Liste des sucres phosphoryles et de dérivés de sucres utilisés dans cette étude.</i>	73 - 76
Tableau 6	<i>Effet de l'activité catalytique de MapP sur les composés radioactifs chargés qui sont accumulés par le mutant E. faecalis MapP AB01.</i>	77
Figure 28	<i>Modèle proposé pour l'absorption et le métabolisme du maltose chez les entérocoques et d'autres bactéries portant les genes malT et Mapp.</i>	78

Introduction

Introduction

Dans leur habitat naturel, la capacité des bactéries à coloniser une niche écologique dépend pour beaucoup de leurs grandes flexibilités métaboliques. En effet, la croissance d'une bactérie impose des besoins en nutriments qui servent de matériaux de construction et de source d'énergie qui est nécessaires à la synthèse des constituants, mais aussi au maintien de la vie bactérienne en dehors de toute croissance. Or ces nutriments sont très souvent convoités par diverse organismes, bactéries, moisissures et autres. Dans ces conditions de croissance et de stress environnementaux certaines bactéries peuvent modifier leurs profils métaboliques en l'orientant vers l'utilisation d'une source de nourriture qui est rapidement métabolisable et qui fournit un maximum d'énergie. Par conséquent, la présence d'un système de sélection d'une source de carbone servira principalement à s'ajuster aux modifications de l'environnement et à l'optimisation de l'utilisation de la ressource.

A cette fin d'optimisation, le contrôle concerté de l'expression des gènes, requis pour l'utilisation préférentielle d'une source de carbone, est essentiel pour le maintien équilibré de la croissance cellulaire. En effet pour la cellule l'utilisation des sources de carbone doit se traduire en termes du meilleur rendement d'énergie utilisable. La première étape de ce processus consiste à faire pénétrer à l'intérieur de la cellule les molécules qui vont y être dégradées. Ainsi, les bactéries utilisent pour se nourrir une vaste gamme de sucres et de glucides qu'elles trouvent dans leurs environnements qui parfois sont riches en substrats fermentescibles (lait, plantes en décomposition, etc.). Les bactéries disposent de différents systèmes de transports (antiport, symport, ...) pour consommer les nutriments présents dans l'environnement. Un des systèmes majeurs de transports de sucres à travers la membrane cytoplasmique est le PTS (système de phosphotransphérase dépendant du PEP), qui couple le transport du sucre avec sa phosphorylation. Celle-ci se fait aux dépens du **phosphoenolpyruvate (PEP)** sans consommation d'ATP. Il est à noter que ces systèmes sont également associés au réseau plus global de régulation de l'utilisation des sources de carbone que constitue la répression catabolique.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est de déterminer les différences métaboliques de l'utilisation du maltose entre *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis*, deux bactéries à Gram+ à faible taux GC. En première partie, la synthèse bibliographique essaiera de présenter les processus de dégradation de l'amidon produisant soit du glucose, du maltose ou des maltodextrines, puis, les mécanismes de la répression catabolique développés chez les bactéries en général seront décortiqués, surtout au niveau du transport des sources de carbone

à l'intérieur de la cellule et enfin, de décrire les connaissances actuelles des voies métaboliques impliquées dans l'utilisation du maltose chez *B. subtilis*, mais présentera aussi certains éléments établis en particulier chez la bactérie lactique *E. faecalis*.

La partie expérimentale présente un état des lieux de matériel et méthodes biochimiques, génomiques et post génomiques réalisés au cours de cette étude. En troisième partie, résultats et discussion font apparaître la spécificité des voies métaboliques décrites lors d'études précédentes. Il s'agira de désigner les éléments-clés de chacune des voies, mais aussi de mettre en exergue les nouveaux éléments impliqués dans le métabolisme du maltose. Ceci nous a amené à proposer un nouveau modèle dans l'utilisation du maltose chez *E. faecalis*. Pour clore ce manuscrit, une conclusion générale reprendra les principaux résultats obtenus.

Première partie :
Revue Bibliographique

1. L'amidon : structure et dégradation

Dans le monde végétal, l'amidon est synonyme de réserve énergétique. En effet, qu'il s'agisse de légumineuses, de céréales ou de tubercules, la source d'énergie est toujours l'amidon. Il est considéré comme le polymère naturel le plus abondant après la cellulose [1] [2]. L'amidon est un sucre polysaccharide de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$ qui est issu de la photosynthèse [3]. Il s'agit principalement d'un mélange de deux familles d'homopolymères d' α -D-glucopyranose de conformation $4C_1$ (Fig. 1) liés soit par des liaisons α -(1-4) soit par des liaisons α -(1-6) l'Amylose et l'Amylopectine. Ces deux polymères ne diffèrent que par le nombre de branchements α -(1-6) présents et par leur structure primaire [1]. Le premier homopolymère, l'amylose, est une macromolécule essentiellement linéaire. Le second, l'amylopectine, est très fortement ramifié [4].

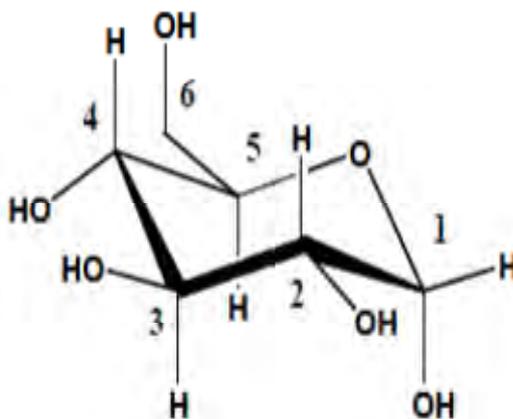


Figure 1 : α -D-glucose de conformation $4C_1$ (thermodynamiquement la plus stable) [1].

2. Composition chimique

2.1. L'amylose

L'amylose est le constituant le moins abondant; il représente 5 à 30% de l'amidon. Sa molécule est la plus simple et la plus petite [3] [5]. C'est un polysaccharide linéaire formé par l'enchaînement de molécules de D-glucose reliées entre elles par des liaisons de type α -(1,4) et comportant une unité réductrice en bout de chaîne (Fig. 2). On peut noter aussi des liaisons α -(1,6) (<1%) qui génèrent des ramifications [4]. Les chaînes d'amylose ont un Degré de Polymérisation (DP) dépendant de l'origine botanique, qui en moyenne est de 500 mais sous ce nombre se cache une très grande polydispersité avec des chaînes pouvant aller de 300 à 10^4 unités glucoses [1]. Les chaînes d'amylose adoptent une conformation en simple ou double hélice par rotation autour de la liaison α -(1,4).

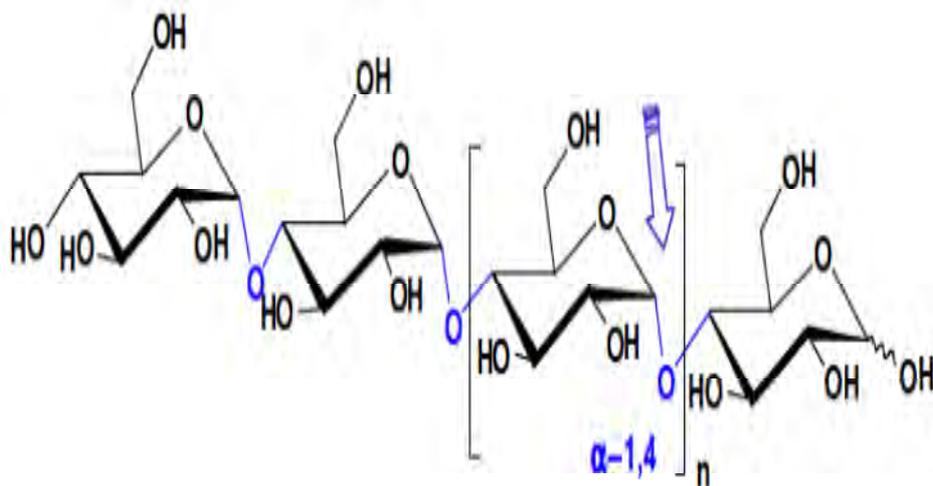


Figure 2 : chaîne d'amylose [1].

2.2. L'amylopectine

L'amylopectine est le composant majoritaire de l'amidon puisqu'il représente en moyenne 70 à 80 % de l'amidon sec. Cette macromolécule est, tout comme l'amylose, un homopolymère constitué de glucose majoritairement liés en α -(1-4) mais comptant 5 à 6 % de liaisons α -(1-6) [4]. Ces ramifications qui se branchent sur une fonction $-\text{CH}_2\text{OH}$ [3] se produisent toutes les 25 à 70 unités glucosyl environ ce qui lui confère une structure primaire ramifiée [4]. La structure de la macromolécule d'amylopectine est présentée sur la fig. 3 ci-dessous :

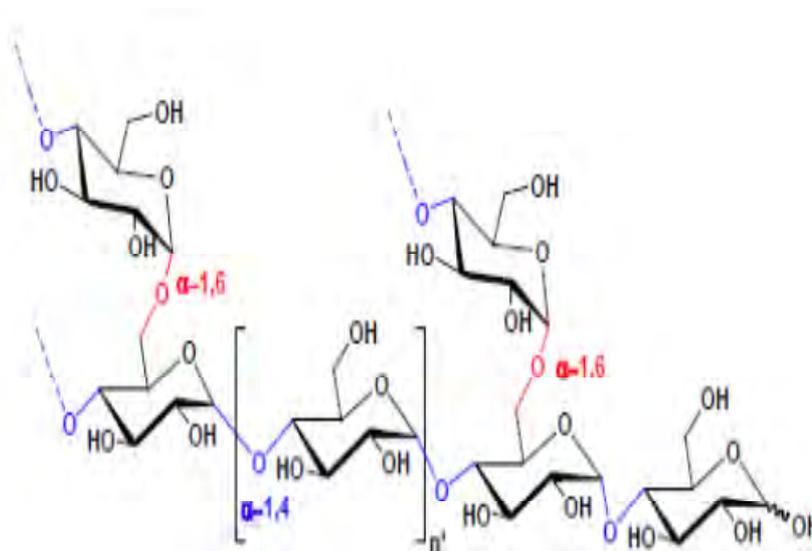


Figure 3 : Amylopectine avec les branchements α -(1-6) [1].

3. Dégradation de l'amidon

L'amidon est un polymère dont la structure est complexe et pour cela il nécessite la combinaison de plusieurs enzymes (endoamylase et exoamylase) pour sa dégradation en oligosaccharide et en sucres simples [6]. Ces enzymes peuvent être répartis essentiellement en quatre groupes: endo-amylases, exoamylases, des enzymes débranchantes et des transférases : Le processus de conversion de l'amidon est présenté dans la fig. 4 :

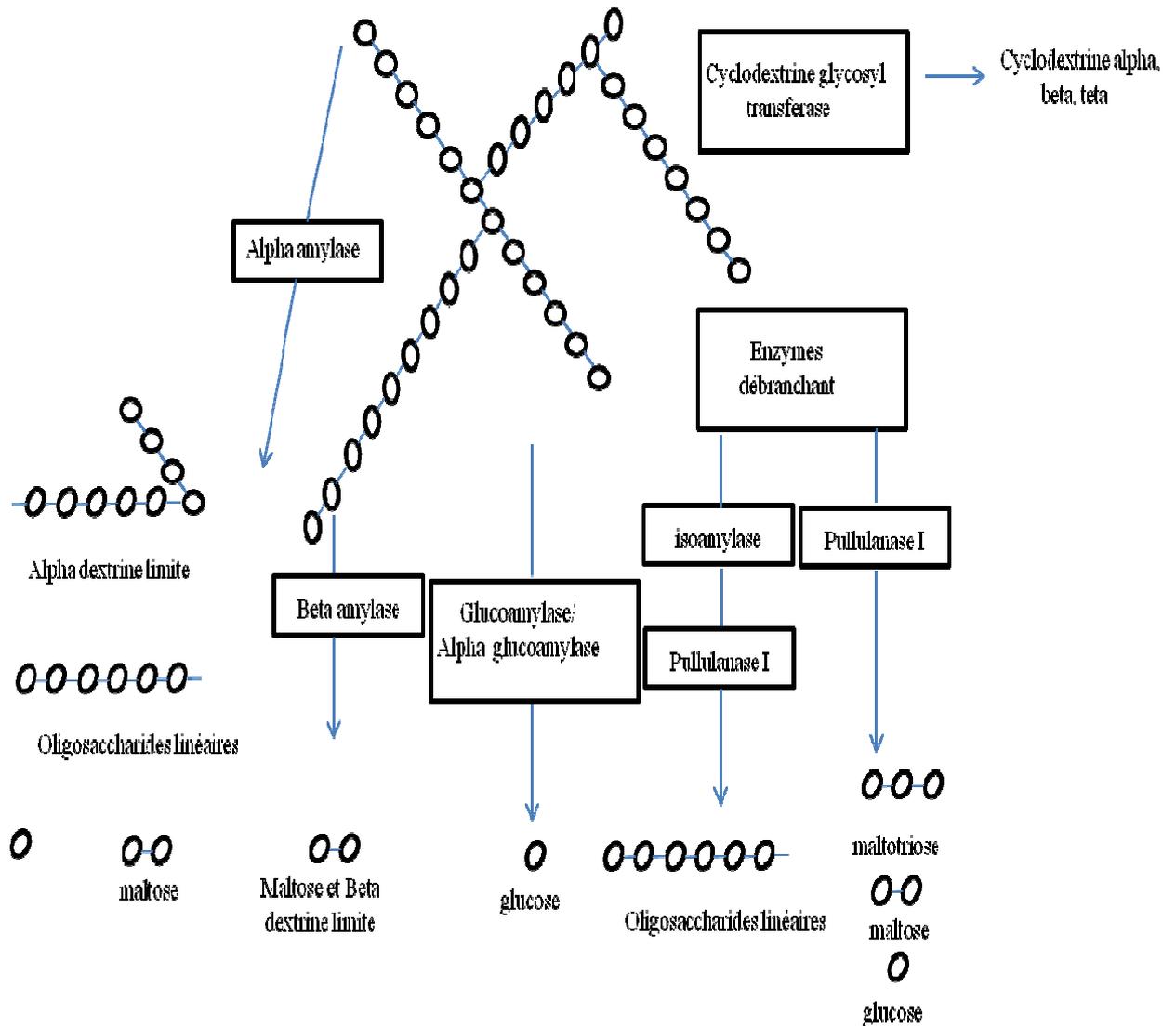


Figure 4 : Les différentes enzymes impliquées dans la conversion de l'amidon.

Les Endo-amylases hydrolysent de façon aléatoire des liaisons à l'intérieur des chaînes polysaccharidiques, générant de nouvelles chaînes plus courtes et libérant ainsi de nouvelles extrémités. Les α -amylase (EC 3.2.1.1) sont capable de cliver les ponts glycosidiques α -1,4 qui sont présentent dans les régions internes des chaines de l'amylose et de l'amylopectine.

Cela conduit à la formation d'oligosaccharide ramifié, linéaire et des α -dextrines limite [6] [7]. Environ 90% des glucides libérés par hydrolyse de l'amylose et l'amylopectine par l'alpha amylase sont des disaccharides: des molécules de maltose. Le reste de l'hydrolysats comprend un peu de glucose et, dans le cas de l'amylopectine, des dextrines limites. Ces enzymes sont largement répandues chez les microorganismes que ce soit chez les bactéries ou les archaea [8].

Les enzymes appartenant au deuxième groupe, les exoamylases hydrolysent de façon progressive les chaînes à partir d'une extrémité, libérant ainsi des mono ou disaccharides. Les exoamylases tel que les glucoamylases (EC 3.2.1.3) et les α -glucosidases (EC 3.2.1.20) coupent à la fois les liaisons α -1,4 et α -1,6 des résidus glucose qui sont présent à l'extrémité non réduite des chaînes de l'amylose et de l'amylopectine. Les produits libérés sont uniquement du glucose (aussi bien pour la glucoamylase que pour l' α -glucosidase). D'un autre côté les β -amylases (EC 3.2.1.2) clivent exclusivement les ponts α -1,4 et produisent du maltose et des β -dextrine limite [9] [10] [11] [12]. Les β -amylases et les glucoamylases ont également été trouvés chez une grande variété de microorganismes [13].

Le troisième groupe d'enzymes de conversion de l'amidon sont les enzymes débranchantes. Les enzymes de débranchement catalysent la réaction d'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -1,6 qui sont présentent dans les chaînes d'amylopectines et/ou le glycogène. [6]. En fonction de la spécificité du substrat ces enzymes appartiennent aux groupes de pullulanases, isoamylases ou les R-enzymes [6]. Il existe deux types de pullulanases, les pullulanases de type I (EC 3.2.1.41) agissent sur les liaisons α -1,6 présent dans les pullulan, les α -glucan linéaires qui sont constitués essentiellement avec des unités maltotriosyl et connecté par des liaisons α -1,6; elles libèrent principalement des molécules de maltotriose. Les pullulanases de type II aussi dénommé amylopullulanases sont largement utilisés dans l'industrie de transformation de l'amidon. Elles ont une grande capacité de débranchement et de clivage des liaisons α -(1,6) et α -(1,4). Les produits de débranchements du pullulan par ces enzymes est le maltotriose. Les pullulanases de type I et II sont incapable de dégrader les cyclodextrine [11] [14] [15] [13].

Il existe un autre type d'enzyme qui requiert comme substrat un oligosaccharide issue de la dégradation par une transglucosylase (4- α -glucanotransferase, EC 2.4.1.25), libérant un résidu glucose qui est lié à un tétrasaccharide par des liaisons 1-6. L' amylo-1,6-glucosidase hydrolyse uniquement les branchements α -1,6 avec une seule molécule de glucose comme point de ramification. Le substrat qui est attaqué par cette enzyme est un penta saccharide, l' α -

glucosyl maltotetraose qui va libérer du glucose et du maltotetraose. Elles sont présentes chez les animaux et les levures [8].

Le quatrième groupe d'enzymes qui dégradent l'amidon sont les glycosyltransférases de cyclodextrine (CGTases, EC 2.4.1.19). Elles produisent des cyclodextrines à partir de l'amidon, les anneaux qui sont constitués de 6, 7 ou 8 unités glucose sont liés par des liaisons α -(1,4). Les CGTases catalysent la réaction de transfert de glycosyl au niveau intra et intermoléculaire [8].

4. Les systèmes de transport des sucres chez les microorganismes

La première étape dans le catabolisme d'une source de carbone exogène est généralement le transport de la molécule à travers une membrane cellulaire [16]. Ainsi, l'entrée de ces solutés nécessite la présence de systèmes de transport localisés au niveau de la membrane. Chez les bactéries, quatre types de systèmes de transport existent : diffusion facilitée, transport primaire ou secondaire et translocation groupée [17] [18].

4.1. La diffusion facilitée

La diffusion facilitée est un processus qui n'utilise pas d'énergie. Une protéine, le facilitateur, catalyse l'égalisation rapide des concentrations d'une substance si elles sont différentes à l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ce transport peut donc fonctionner dans les deux sens permettant l'import et l'export des substrats. Le système le mieux connu de la diffusion facilitée et l'entrée du glycérol catalysée chez la plupart des bactéries par le facilitateur GlpF. Le glycérol intracellulaire est rapidement phosphorylé en glycérol-3-P qui n'est pas un substrat pour GlpF, ainsi permettant un flux net du glycérol dans la cellule.

4.2. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) constituent l'une des plus vastes familles de protéines retrouvée dans tout le règne vivant [19] [20]. On les rencontre chez toutes les espèces, de la bactérie à l'homme en passant par les plantes 5 % du génome d'*E. coli* code pour des transporteurs ABC [20] [21]. Ces transporteurs utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'import ou l'export unidirectionnel d'une variété considérable de substrats, des ions aux macromolécules [22] [23]. Ils sont des transporteurs primaires parce qu'ils utilisent directement l'énergie venant de l'hydrolyse de l'ATP pour la translocation de leurs substrats [24].

Ils sont souvent organisés en quatre sous-unités qui parfois sont fusionnées en une seule protéine : deux sous-unités différentes transmembranaires (DTM ou TMD pour

transmembrane domains) et deux sous-unités identiques cytoplasmiques qui lient et hydrolysent les nucléotides (DLN ou NBD pour *nucleotide binding domains*). Les NBD sont hydrophiles et interagissent avec les boucles intracellulaires des TMD [19] [25]. Ils comprennent trois motifs caractérisant la « cassette » de fixation de l'ATP: le motif LSGGQ, qui constitue la « signature » spécifique des transporteurs ABC [26] [27]. Mais aussi les motifs A et B de Walker communs à toutes les protéines fixant des nucléosides triphosphates.

On distingue parmi les ABC transporteurs deux grandes classes : d'une part les systèmes dédiés à l'export que l'on retrouve chez les procaryotes et les eucaryotes et d'autre part les systèmes dédiés à l'import, présents uniquement chez les procaryotes [19]. Ces derniers possèdent une protéine de fixation spécifique solute binding protein (SBP) qui est responsable de la capture du substrat [19]. Les solutes binding proteins sont localisées dans le périplasme chez les protéobactéries et ancrées sur le côté extracellulaire de la membrane chez les firmicutes.

Chez *E. coli*, le système MalEFGK2 est responsable du transport du maltose et des maltodextrines, il reste à l'heure actuelle l'un des systèmes de transport ABC les plus étudiés [28]. Les gènes codant les protéines impliqués dans la synthèse de ce complexe sont au nombre de cinq. Le transporteur est constitué d'un récepteur périplasmique MalE. Il s'agit d'une protéine liant le maltose et les maltodextrines avec une forte affinité [29]. Cette protéine va délivrer le substrat au niveau du canal de translocation qui est constitué par les sous-unités hydrophobes MalF et MalG. La sous-unité ATPase MalK qui est située sur le côté cytoplasmique de la membrane est impliquée dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport [30] [31]. En outre, *E. coli* est équipé d'une protéine trimérique (LamB ou maltoporin) qui est située dans la membrane externe. Elle facilite la diffusion de maltose et de maltodextrines (à de faible concentration) dans le périplasme [32].

4.3. Les systèmes de transport secondaire

Les systèmes de transport secondaire sont constitués de protéines qui sont associées à la membrane, les perméases. Ce système est basé sur la théorie chimiosmotique de Mitchell (1973) [33]. D'après ce concept, ces transporteurs utilisent l'énergie électrostatique fournie par un gradient d'ions ou de solutés créé de part et d'autre de la membrane. Le plus souvent, l'énergie provient de la force proton motrice (gradient de H⁺) ou du gradient d'ions sodium (Na⁺) allant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Dans ce cas, le transport du sucre est

couplé au mouvement de protons le long du gradient électrochimique, il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il peut s'effectuer contre le gradient de concentration du substrat.

Trois modes de transport secondaire sont généralement décrits chez les bactéries :

- **Symport** : Le symport est aussi appelé co-transport étant donné que deux ligands différents doivent d'abord se fixer au transporteur avant d'être tous deux transportés de façon simultanée au travers de la membrane. Dans ce type de système le substrat étant généralement transloqué dans la cellule avec un proton ou un ion sodium, dans le même sens. Un exemple bien connu est le H⁺/lactose symporteur LacY chez *E. coli*.

- **Antiport ou contre-transport soluté/soluté** : un soluté est transporté dans le sens de son gradient de concentration, l'autre est transporté dans le sens opposé à son gradient de concentration. Un exemple est LacS de *Streptococcus thermophilus*, qui catalyse le lactose/galactose antiport.

- **Antiport ou contre-transport soluté/cation** : Le gradient ionique fournit l'énergie nécessaire à l'expulsion de soluté hors du cytoplasme [18].

4.4. Le PEP: Carbohydre Phosphotransférase System (PTS)

Ce système de transport a été découvert chez *Escherichia coli* il y a 50 ans, en 1964 [34]. Depuis, il a été mis en évidence chez de très nombreuses bactéries, aussi bien parmi les bactéries à Gram négatif que parmi les bactéries à Gram positif [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41]. Des études révèlent que, chez ces bactéries, le PTS est le système prédominant, dédié au transport des sucres, principalement des hexoses et des hexitols ainsi que des nombreux disaccharides [16] [41].

Le PTS est impliqué dans le transport de divers hydrates de carbone chez les bactéries [36]. C'est le seul transporteur primaire actuellement connu et classifié dans la TCDB (transporter classification database) utilisant le PEP comme source d'énergie pour le transport [42] [43]. Il s'agit d'une translocation groupée permettant de façon concomitante l'entrée du sucre dans la cellule ainsi que sa phosphorylation [36] [43] [44]. En plus de sa fonction première qui est le transport et la phosphorylation des sucres, le système PTS est impliqué dans de nombreux mécanismes de régulation cellulaire, tels que le contrôle de l'activité d'enzymes et de transporteurs (PTS et non-PTS), la régulation de la transcription, la coordination des métabolismes du carbone, de l'azote et du phosphate, la chimiotaxie, la mise en réserve de l'énergie, ainsi que la formation de biofilms, la virulence de certaines bactérie pathogènes et plusieurs autres [45] [46] [47]. Le nombre de PTS fonctionnels semble être en

lien avec le style de vie des divers organismes. En effet, les bactéries pouvant vivre dans plusieurs niches écologiques vont généralement posséder plusieurs systèmes PTS, alors que les symbiotes, les endosymbiotes, les agents pathogènes et les parasites intracellulaires obligatoires possèdent généralement peu ou pas de PTS. Le système PTS est particulièrement important pour les bactéries anaérobies strictes ou facultatives qui dépendent presque exclusivement du métabolisme des sucres via la glycolyse pour la génération de l'énergie [43]. Le transport et la phosphorylation des substrats par le PTS sont réalisés via une cascade de phosphorylation en cinq étapes (Fig. 5) [45].

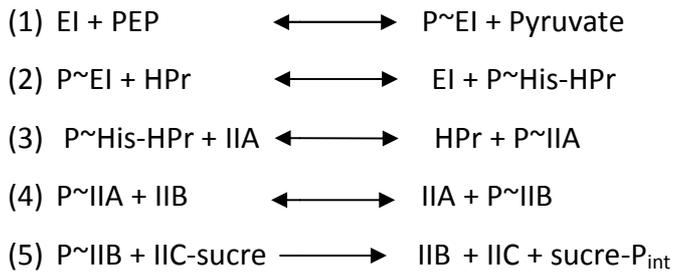


Figure 5: Cascade de phosphorylation du PTS. Les flèches à double sens indiquent les quatre réactions réversibles. Seule la dernière étape (5) est irréversible.

Le processus commence avec l'autophosphorylation de l'enzyme I (EI) aux dépens du PEP, formant ainsi l'intermédiaire P~EI, suivie du transfert du groupement phosphorylé de P~EI sur un résidu His de la protéine HPr (heat-stable histidine-containing phosphocarrier protein), ce qui génère la forme P~His-HPr [48]. Les protéines EI et HPr sont les composantes non-spécifiques du PTS, puisqu'elles sont normalement communes à tous les systèmes PTS. P~His-HPr transfère ensuite son groupement phosphorylé à différents complexes d'enzyme II (EII) qui sont impliqués dans le transport d'un seul ou d'un groupe de substrats. Ces protéines sont appelées composantes spécifiques du PTS (Fig. 6) [36] [49].

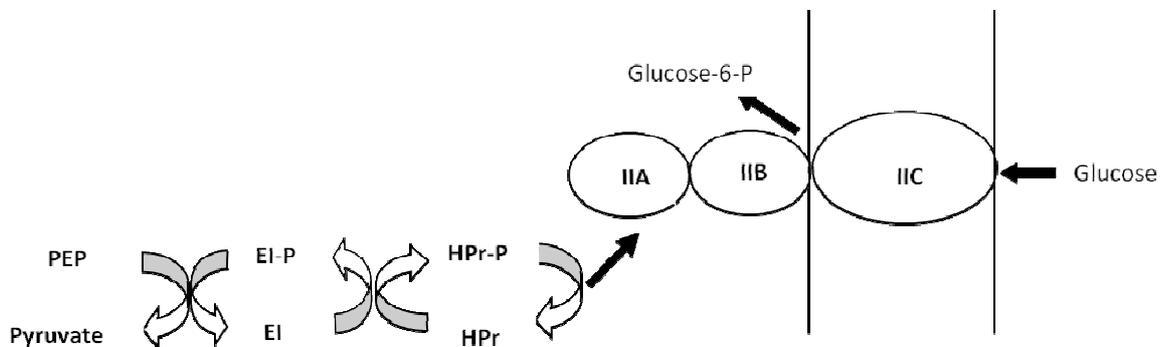


Figure 6 : Le transport du glucose par le PTS chez *Bacillus subtilis* [36].

Chaque PTS spécifique pour un sucre est constituée de trois (IIA, B, C) ou quatre (IIA, B, C, D) domaines ou protéines selon le système [18] [43] [50]. Ces différentes sous-unités peuvent faire partie d'une même protéine ou se retrouver sur des polypeptides distincts [30]. Plusieurs configurations sont possibles (Fig. 7), mais il y a des configurations qui n'ont pas encore été observées. Le domaine IIA, qui contient le premier site de phosphorylation, reçoit le groupement phosphoryle de P~His-HPr et le transfère à IIB. Le sucre se fixe à IIC à la surface externe de la membrane plasmique et traverse la membrane par le canal formé par IIC (ou IIC/IID [PTS-Man]). Finalement, P-IIB phosphoryle le sucre qui est relargué sous forme de sucre-P dans la cellule. À l'exception du transport et de la phosphorylation subséquente du sucre, toutes les réactions de phosphorylation du PTS sont réversibles [43] [51].

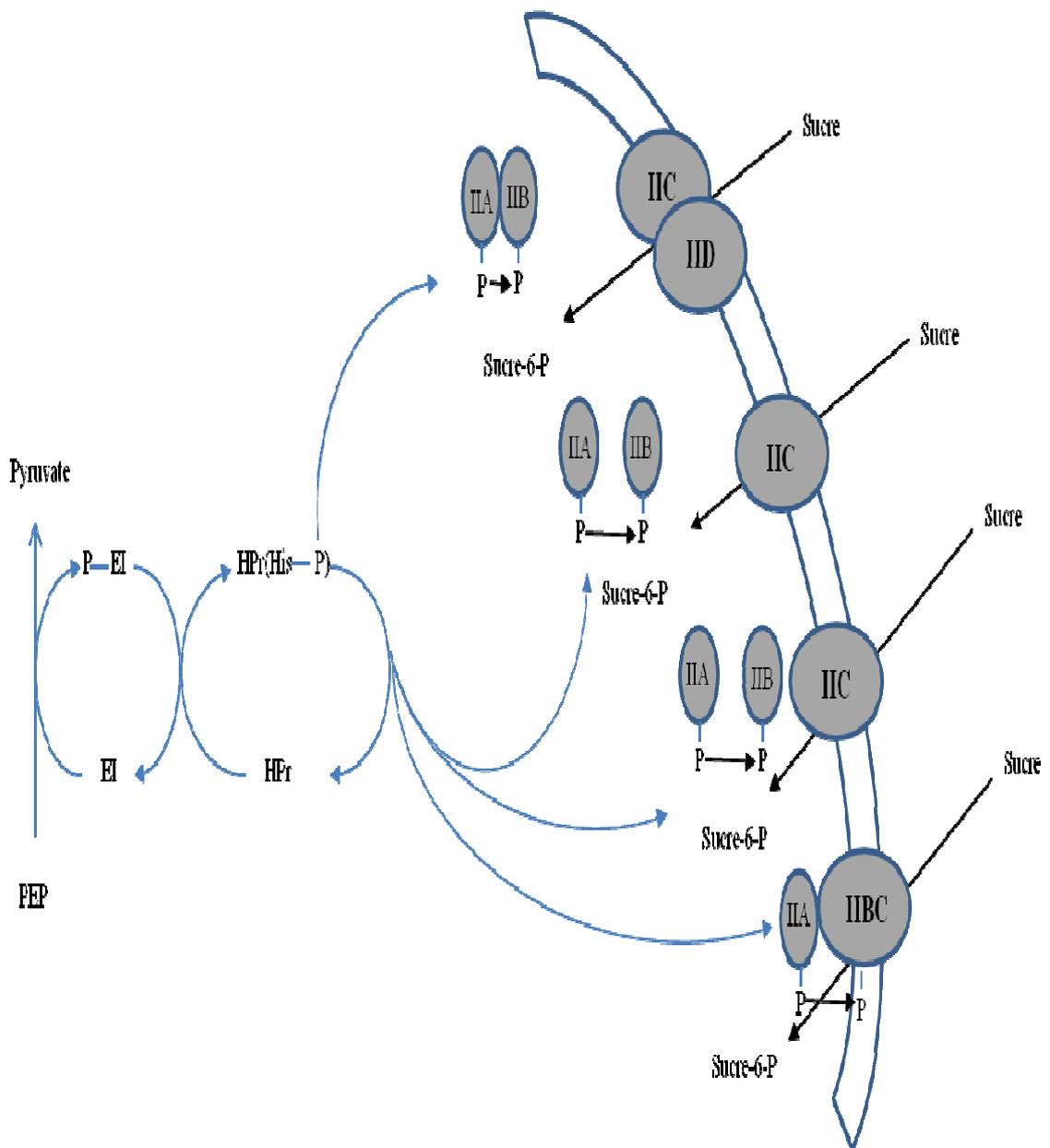


Figure 7 : Configuration des EII du PTS [43].

5. La Régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone

5.1. La répression catabolique

L'observation d'un phénomène de régulation dans l'utilisation des sucres et son analyse ont été faites pour la première fois chez *Bacillus subtilis* par Jacques Monod [52]. Il a observé que lors de la croissance en présence de glucose et de sorbitol dans le milieu de culture, deux phases de croissance étaient distinguables, la première plus rapide que la seconde et séparées par un temps de latence, ce phénomène a été nommé diauxie. Les bactéries s'adaptent à leur environnement en régulant parmi autres l'expression des gènes du métabolisme du carbone en fonction de la disponibilité en sucre dans le milieu extérieur [53]. Lorsque les bactéries sont soumises à un mélange de sources carbonées, elles vont métaboliser le substrat qui va entraîner le meilleur rendement pour la croissance, établissant ainsi une utilisation hiérarchique des sucres présents. Ainsi, elles ont développé des mécanismes leur permettant de ressentir l'état nutritionnel du milieu et d'ajuster leur capacité catabolique par l'intermédiaire de régulateurs transcriptionnels qui contrôlent l'expression des gènes intervenants dans les voies de catabolismes annexes: c'est ce qu'on appelle la répression catabolique RC (carbon catabolite repression) [45] [48] [54]. Souvent, le sucre le plus efficace pour la répression de certaines enzymes du catabolisme est le glucose, ce phénomène est parfois appelé « effet glucose » [54] [55].

5.2. La répression catabolique chez les bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs

Le mécanisme de RC diffère entre les firmicutes et les protéobactéries. Il fait intervenir des composants différents : chez les firmicutes, la RC est médiée par HPr, HPrK/P, CcpA (Catabolite control protein A) et les sites *cre* (catabolite responsive element), alors que chez les entérobactéries, elle met en œuvre l'EIIA^{Glc} et le complexe AMPc-Crp (Fig. 8) [56] [57]. Ce mécanisme de répression, qui est en fait un processus de régulation positive, a d'abord été identifié chez *E. coli*. La (CRP) forme un complexe avec l'AMPc, qui permet de moduler l'expression d'un grand nombre d'opérons impliqués dans le catabolisme du carbone. Ce complexe interagit avec un site de liaison spécifique dans la région promotrice de ces gènes, ce qui, dans la plupart de cas, conduit à leur activation transcriptionnelle [58]. La concentration cytoplasmique de l'AMPc, qui est synthétisé par l'adénylate cyclase, est un élément déterminant de ce mécanisme [59]. Contrairement à *E. coli*, les bactéries Gram positives à faible teneur en GC sont incapables de synthétiser l'AMPc et ne possèdent pas de CRP. La CCR implique une régulation négative de la transcription et les mécanismes moléculaires sont différents [59]. Chez *B. subtilis* et dans des conditions aérobies l'AMPc

n'est pas présente en quantités détectables de plus l'addition d'AMPC exogène n'affecte pas la RC [60] [61]. En outre, aucun CAP n'a été identifié dans les bactéries Gram positive. La conséquence de la RC chez les firmicutes est une régulation négative de la transcription [62].

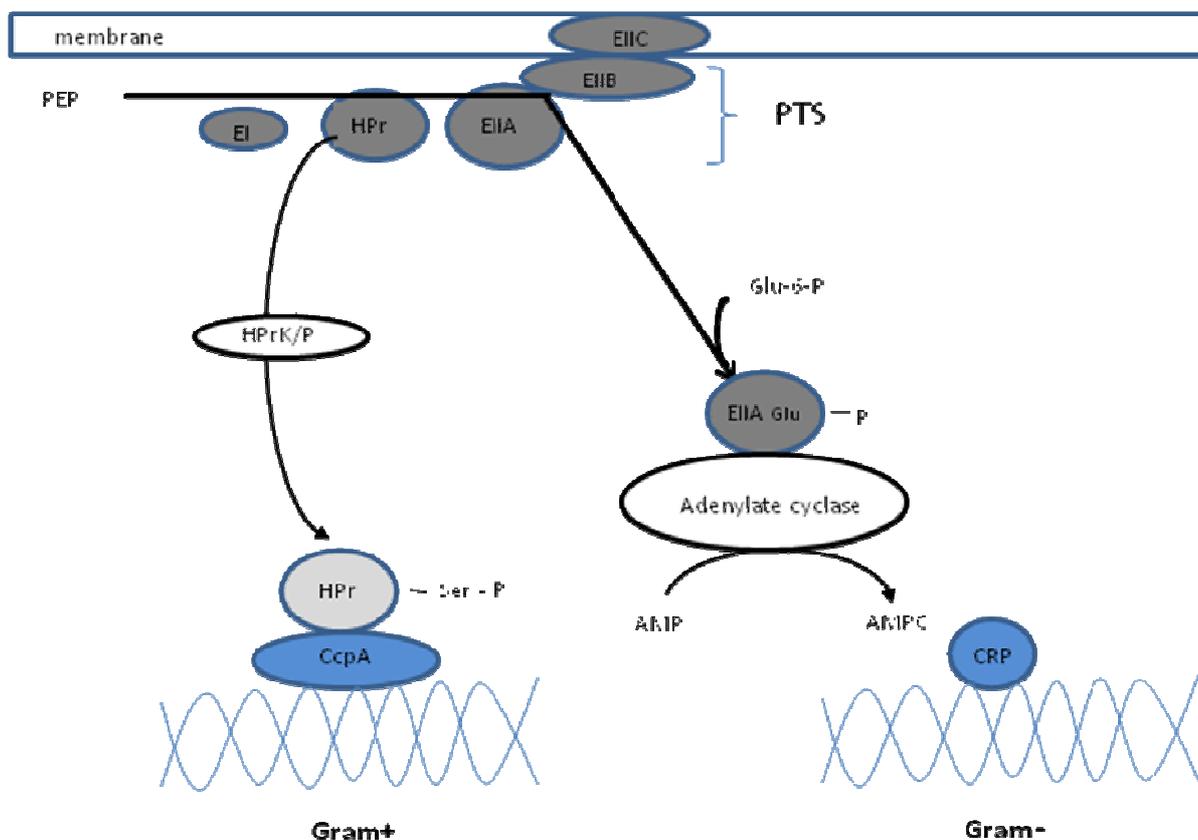


Figure 8 : RC des bactéries à Gram positifs et à Gram négatif [56].

5.3. La répression catabolique médiée par CcpA et HPr

Les protéines HPr, HPrK/P (HPr kinase/phosphorylase) et CcpA sont impliquées dans le « sensing » de l'état physiologique cellulaire et dans la régulation du catabolisme [63]. La protéine CcpA est le principal régulateur de la RC dans de nombreuses bactéries Gram positif à bas % GC [64]. La protéine CcpA pourrait jouer un rôle similaire à celui de son homologue, FruR des entérobactéries, qui est un régulateur pléiotrope du catabolisme du carbone central [65]. Elle peut agir comme un répresseur de la répression catabolique (CCR) et comme un activateur catabolique (CCA) [64] [66]. La protéine CcpA est exprimée de façon constitutive indépendamment de la disponibilité dans le milieu des hydrates de carbone préférés, ce qui implique que cette régulation a besoin d'autres facteurs qui sont nécessaires pour que CcpA puisse exercer sa fonction pléiotrope [66]. Un mutant de *B. subtilis* déficient pour le *ccpA* présentait un arrêt de croissance sur un milieu minimum avec du glucose comme seule source de carbone. La croissance du mutant a été restaurée par l'ajout de citrate ou d'autres

intermédiaires du cycle de TCA [67]. Ces résultats indiquent que CcpA pourrait influencer spécifiquement le cycle de TCA ou la partie inférieure de la glycolyse [68].

La protéine HPr reflète via son état de phosphorylation l'état nutritionnel de la cellule [69]. Chez les firmicutes, le mécanisme du choix de la source de carbone débute avec l'incorporation d'un sucre, généralement le glucose, via le PTS, suivie de sa dégradation par la voie métabolique de la glycolyse. Cette incorporation est assurée à l'aide de la protéine HPr qui permet un lien entre ces deux systèmes bactériens majeurs : PTS et CCR. La phosphorylation différentielle de HPr en histidine (His15) P~His-HPr et/ou en sérine (Ser46) P~Ser-HPr représente la clé déterminante dans le métabolisme carboné chez la plupart des firmicutes. HPr, seulement dans sa version phosphorylé (P~Ser), peut se lier à CcpA in vitro. Ces 2 formes différentes de HPr ne sont pas présentes au même moment parce que la croissance sur glucose diminue le taux de P~His-HPr (utilisé pour la phosphorylation du glucose) et augmente le taux de P~Ser-HPr [42] [43] [44].

Lorsque des sucres sont métabolisés via le PTS, certains intermédiaires glycolytiques, comme le FBP, voient leur concentration intracellulaire augmenter. Le FBP va stimuler l'activité kinase de l'HPrK/P entraînant la formation de P~Ser-HPr qui est indispensable à la mise en place de la RC (fig. 9). Etant donné que P~Ser-HPr est un mauvais substrat de l'EI, le taux de consommation du sucre par le PTS va diminuer, la concentration en FBP également, entraînant une déphosphorylation de la protéine HPr [44] [54]. Ainsi, P~Ser-HPr est présent dans des cellules à activité glycolytique élevée, par exemple lorsque le glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisable sont disponibles, alors que P~Ser-HPr est déphosphorylé dans des conditions de carence [45]. P~Ser-HPr agit comme co-répresseur (RC) ou co-activateur (AC) de la transcription avec CcpA [70] [71] [72].

La phosphorylation ATP-dépendante de la Ser-46 dans HPr joue un rôle clé dans la RC de plusieurs opérons cataboliques chez *B. subtilis* [73]. Une enzyme partiellement purifiée d'*Enterococcus faecalis* a montré une activité de déphosphorylation de P~Ser-HPr [74]. Mais quand l'HPr kinase de *B. subtilis* a été identifié et purifié à homogénéité il s'est avéré que cette enzyme possède les deux activités antagonistes : HPr kinase et P~Ser-HPr phosphorylase. En fait, HPrK/P utilise Pi pour la déphosphorylation de P~Ser-HPr et par conséquent ne fonctionne pas comme phosphatase, mais comme phosphorylase. Des concentrations élevées en ATP ont permis de renverser l'activité phosphorylase de l'HPrK/P chez *E. faecalis*, alors que l'ATP n'a eu aucun effet sur l'activité de déphosphorylation de P~Ser-HPr par l'HPrK/P de *B. subtilis* [75]. A l'instar des firmicutes la protéine HPr de *E.*

faecalis peut être phosphorylée au niveau de l'histidine-15 par l'intermédiaire de PEP et EI et / ou à la sérine-46 par ATP et HprK/P [54].

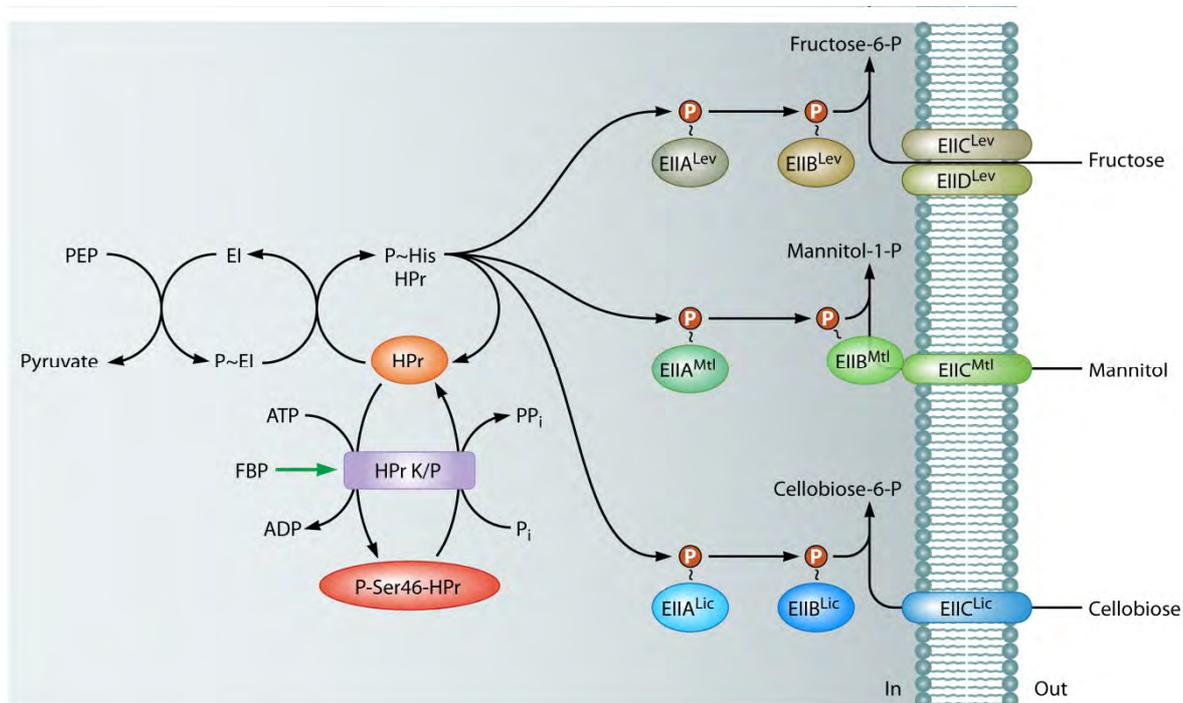


Figure 9 : Rôle du FBP dans la mise en place de la régulation catabolique par l'intermédiaire de P~Ser-HPr [76].

5.4. Mécanisme de la répression catabolique médiée par CcpA et HPr

La protéine CcpA joue un rôle central dans la répression de plusieurs gènes cataboliques [18]. Elle a été caractérisée chez *B. subtilis* comme un facteur de la répression du gène *amyE* (amylase) par le glucose [77]. HPr (Ser-P) interagit avec la protéine CcpA, formant un complexe (Figure 6) [53]. CcpA: P~Ser-HPr ou CcpA: P~Ser-Crh régulent l'expression d'environ 10 % du génome chez *B. subtilis*, soit 300 à 400 gènes [78]. L'ensemble des études par mutagenèse établissant la séquence *cre* dans la région régulatrice des gènes/opérons *amyE* (α -amylase), *acsA* (acétyl-CoenzymeA synthétase), *hutPHUIGM* (transport et utilisation de l'histidine) et *levDEFG* (métabolisme du fructose et de ses polymères) de *B. subtilis* a permis de définir le consensus suivant: TGWAARC | GYTWNCW (le symbole | représentant l'axe de symétrie du palindrome ; W correspond à A ou T, R à A ou G et Y à C ou T). Ce consensus est un peu plus précis que celui défini en 1990 par Weickert et Chambliss, TGWNANC | GNTNWCA, qui considéraient seulement les résultats de mutagenèse du site *cre* devant le gène *amyE* [56]. Le complexe CcpA: P~Ser-HPr est stabilisé par le FBP [79] et se fixe sur les sites *cre* provoquant ainsi la répression, l'avortement ou

l'activation de la transcription du gène selon que le site *cre* est dans, en aval ou en amont du promoteur (Fig. 10) [80] [81].

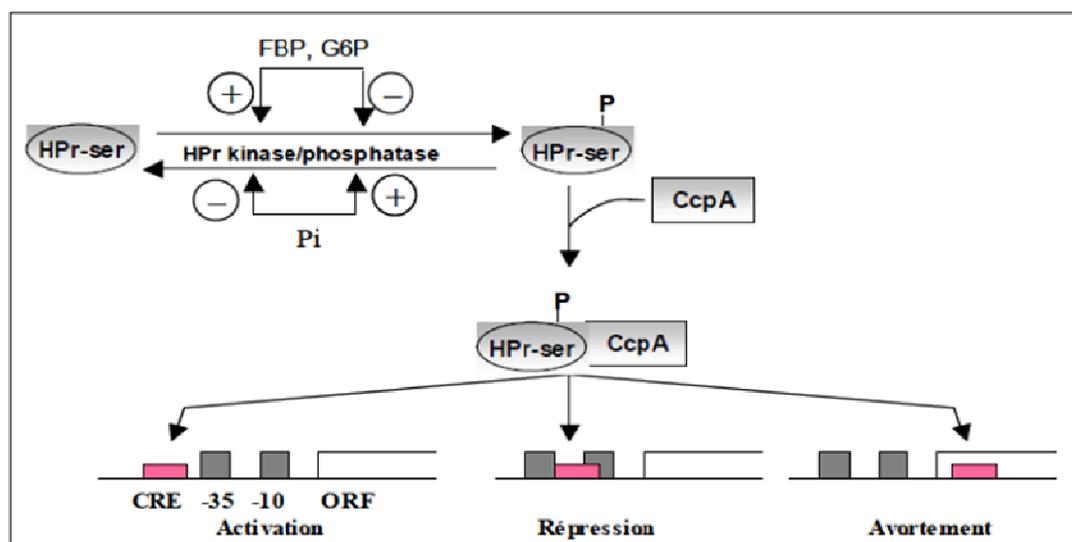


Figure 10 : Régulation des gènes par CcpA [45].

Lorsque les séquences *cre* sont situées en amont du promoteur, l'expression des gènes de l'opéron est activée (c'est l'activation catabolique) comme dans le cas de *ackA* et *pta* alors que lorsqu'elles sont situées en aval, l'expression des gènes de l'opéron est inhibée (c'est la répression catabolique) [63] [66] [80]. Ce mécanisme de répression transcriptionnel roadblock a été proposé pour les gènes/opérons *xyl*, *ara*, *gnt*, *sigL* et *acsA* de *B. subtilis* [64] [66]. Luesink et son équipe ont mis en évidence chez *L. lactis*, un contrôle négatif de l'expression de l'opéron *gal*, responsable de l'assimilation du galactose, par CcpA, alors qu'elle active l'opéron *las* codant pour des enzymes glycolytiques [82]. L'opéron *las* contient les gènes pour trois enzymes glycolytiques: la phosphofructokinase, la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase [18] [63]. Les travaux de Fujita ont montré que dans le cas de l'opéron gluconate "gnt", celui-ci est soumis à un mécanisme de répression catabolique indépendant de AMPc et qu'il est tributaire d'une séquence *cre* dans la région promotrice de l'opéron *gnt*. [83] [84] [85]. Une étude RMN a révélé que deux monomères de la protéine P-Ser-HPr se lient à un dimère de CcpA pour former un complexe avec le site *cre* de l'ADN [70]. La structure du complexe CcpA:P-Ser-HPr a été également déterminé à partir des cristaux [72].

L'expression de *ccpA* semble autorégulée *via* un site *cre* situé dans sa région promotrice [86] [87]. Il a été découvert que la présence d'une séquence *cre* en amont ou dans la région promotrice, ou à l'intérieur d'un gène n'implique pas nécessairement une régulation par CcpA [66].

5.4.1. La protéine CcpA

CcpA a été identifiée chez de nombreux firmicutes, notamment *Bacillus megaterium*, *L. casei*, *L. lactis* et *E. faecalis*. La levée de la RC dans les souches mutées pour ces gènes suggère une conservation du mécanisme de RC chez les firmicutes [56]. CcpA est un dimère qui se lie à l'ADN. Son activité est stimulée par la formation de complexes avec P~Ser-HPr ou P~Ser-Crh ; Crh est un paralogue de la protéine HPr. CcpA est une protéine de 38 KDa, appartenant à la famille des répresseurs/activateurs, LacI/GalR [66] [88]. La partie N-terminale de CcpA renferme un motif hélice-tour-hélice spécifique des protéines se liant à l'ADN tandis que la partie C-terminale renferme le domaine de fixation du co-effecteur P-Ser-HPr [70] [89][90]. Trois régions apparaissent très conservées. Deux d'entre elles sont dans les 100 premiers résidus, et correspondent au domaine de fixation à l'ADN. La troisième se trouve dans les 50 derniers résidus et correspond à l'hélice C-terminale. Des analyses de mutants montrent aussi que ces derniers résidus sont impliqués dans la reconnaissance de P~Ser-HPr [91]. Une analyse de séquence des protéines CcpA les définit comme une sous-famille de la famille LacI/GalR. Ainsi, LacI, fixé sous forme Apo à l'ADN (état fermé), voit son affinité pour ce dernier baisser lorsque le lactose se lie à LacI (état ouvert). Le lactose permet la dissociation de LacI de l'ADN libérant ainsi le promoteur pour la transcription des gènes [92]. De même, GalR se dissocie de l'ADN lorsqu'il fixe le galactose [91]. CcpA est le seul régulateur transcriptionnel de cette famille à être activé par une protéine [82]. La fixation du corépresseur P~Ser-HPr permet d'obtenir une affinité pour l'ADN similaire à celle de LacI ou GalR [93]. Suite à cette étude, CcpA a été identifié dans un grand nombre de firmicutes, y compris une variété de LAB [94].

Chez *E. faecalis* l'analyse Northern blot du gène CcpA a révélé une transcription d'un fragment unique d'environ 1,2 kb, indiquant que le transcrit est exprimée en un ARNm monocistronique [63]. L'analyse transcriptionnel d'un mutant CcpA en présence d'un mélange de glucose et de galactose a permis d'observer une levé partiel de la transcription du gène *galk*. Ce phénomène pourrait être corrélé avec la présence d'une séquence *cre* putative dans la région promotrice de l'opéron *galkETR*. Le gène *ccpA* de *E. faecalis* peut aussi rétablir la répression du glucose d'un gène de fusion *ynaJ9-lacZ* dans un mutant *ccpA* de *B. subtilis*. Ces

données démontrent l'implication de CcpA dans la RC chez *E. faecalis*. L'inactivation du gène *ccpA* a entraîné une réduction du taux de croissance sur différents sucres, un phénomène qui est aussi observé chez d'autres bactéries [95] [96] [97]. Cela suggère que, en plus de son rôle dans la CR, il pourrait être impliqué dans d'autres processus de régulation. En effet, CcpA est responsable de l'activation transcriptionnelle médiée par le glucose des gènes *alsS*, *ackA*, et certaines enzymes de la glycolyse chez *B. subtilis* [98] [99] [100]. Chez *E. faecalis* il existe un site potentiel *cre* dans la région promotrice de la LDH qui pourrait être impliquée dans l'activation transcriptionnelle et qui est régulé via CcpA. Chez *E. faecalis* un mutant *ccpA* présente une faible capacité glycolytique en présence de glucose et l'inactivation du gène *ldh* serait un des facteurs expliquant le retard de croissance [63].

5.4.2. Les protéines HPr et Crh

HPr est une petite protéine globulaire et monomérique d'environ 85-90 acides aminés relativement stable à la chaleur, très soluble et généralement présente en quantités importantes dans le cytoplasme. La structure tridimensionnelle de HPr et/ou HPr-P a été déterminée par diffraction des rayons X et/ou RMN pour la protéine de *E. coli*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. carnosus*, *L. lactis* et *Mycoplasma capricolum*. Chez les bacilles, il existe un paralogue de la protéine HPr composée de 85 résidus d'acides aminés la protéine Crh ("catabolite repression HPr") [101]. Il est clairement établi que Crh est une protéine qui est propre aux quelques bacilli (les genres *Bacillus*, *Geobacillus* et *Oceanobacillus*), cette protéine n'a pas été identifiée dans les génomes de *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes* et *L. lactis*. Ces deux protéines de *B. subtilis* présentent 45 % d'identité de séquence en acide aminée. Mais Crh contient une glutamine en position 15 à la place de l'histidine d'HPr et ne peut alors pas être phosphorylée par l'EI; Crh n'intervient donc pas dans le transport via le PTS. Néanmoins, la protéine est phosphorylée au niveau de Ser-46 par l'HPrK/P [48] [101] [102]. La contribution des deux protéines P~Ser-HPr et P~Ser-Crh à la RC diffère. P~Ser-Crh ne substitue que partiellement P~Ser-HPr alors que P~Ser-HPr peut remplacer P~Ser-Crh complètement dans la RC : Les travaux de Seidel ont montré que CcpA a plus d'affinité pour P~Ser-HPr que pour P~Ser-Crh et qu'il faut quatre fois plus de P~Ser-Crh pour observer le même effet qu'avec P~Ser-HPr [92]. Il semble toutefois que certains opérons de *B. subtilis* soient reconnus plus spécifiquement par le complexe CcpA: P~Ser-Crh [101]. En effet, la RC médiée par le succinate/glutamate passe exclusivement par Crh et non par HPr

5.4.3. Rôle des petites molécules dans la régulation de l'activité de CcpA

Le FBP, tout comme le G6P, augmente l'affinité de CcpA pour P~Ser-HPr. Le FBP diminuerait la quantité de P~Ser-HPr nécessaire en solution pour fixer efficacement P~Ser-HPr à CcpA et donc à l'ADN, et à obtenir une RC complète. De plus, les données de Bertram ont montré que un faible niveau d'expression de l'HPrK/P est suffisant à une RC complète chez *B. subtilis* et que le contrôle de l'HPrK/P dépend de la présence des petits effecteurs, le FBP notamment [45] [92]. Le NADP quant à lui n'augmente qu'un peu l'affinité de CcpA pour l'ADN mais l'augmente nettement lorsqu'il est combiné à P~Ser-HPr (Tableau 1). L'effet le plus marquant du NADP n'est pas sur l'affinité pour l'ADN mais sur l'inhibition de la transcription. Alors que P~Ser-HPr lié à CcpA inhibe 10 fois plus la transcription que CcpA seule, la combinaison de CcpA et du NADP l'inhibe 120 fois plus. Le FBP n'a pas d'effet inhibiteur de la transcription. Contrairement à P~Ser-HPr, aucun effet des petites molécules n'a été observé sur la fixation de P~Ser-Crh à CcpA [92].

Tableau 1 : Affinité de CcpA, LacI et GalR pour l'ADN.

	KD
CcpA	28 nM
LacI	0,2 nM
GalR	1,3 nM
CcpA + PserHPr	2,8 nM 0,6 nM
CcpA + FBP	11 nM
CcpA + NADP	17 nM
CcpA + PserHPr + FBP	0,09 nM
CcpA + PserHPr + NADP	0,22 nM

6. *Bacillus subtilis* un modèle d'étude

B. subtilis fait partie des bactéries gram positives à faible pourcentage en guanine et en cytosine (%GC) dans leur génome [103]. Elle appartient au groupe des firmicutes qui actuellement comportent cinq classes : les *Bacilli* (comprenant entre autres les genres *Bacillus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*), les *Clostridia*, les *Erysipelotrichiae*, les *Negativicutes* et les *Thermolithobacteriae* (Fig. 11). On peut noter un lien phylogénique étroit entre *B. subtilis* et les bactéries lactiques telles que *L. lactis*, utilisé pour la fermentation dans l'industrie alimentaire [104]. *B. subtilis* est considéré comme la

bactérie modèle des firmicutes, mais aussi comme l'un des organismes les plus étudiés et les mieux « compris ». Seule *E. coli* et *S. typhimurium* ont fait l'objet d'autant d'études [104] [105]. Historiquement, en 1961, la découverte de la transformabilité naturelle de cette bactérie non pathogène a facilité son étude génétique. La pertinence de cette bactérie pour la recherche industrielle et biomédicale en raison du système de sécrétion efficace de ces bactéries, les espèces de *Bacillus* sont largement utilisées dans les industries biotechnologiques [106]. Sa capacité à sporuler a été étudiée comme un modèle simple pour comprendre les mécanismes de la différenciation cellulaire [66] [107].

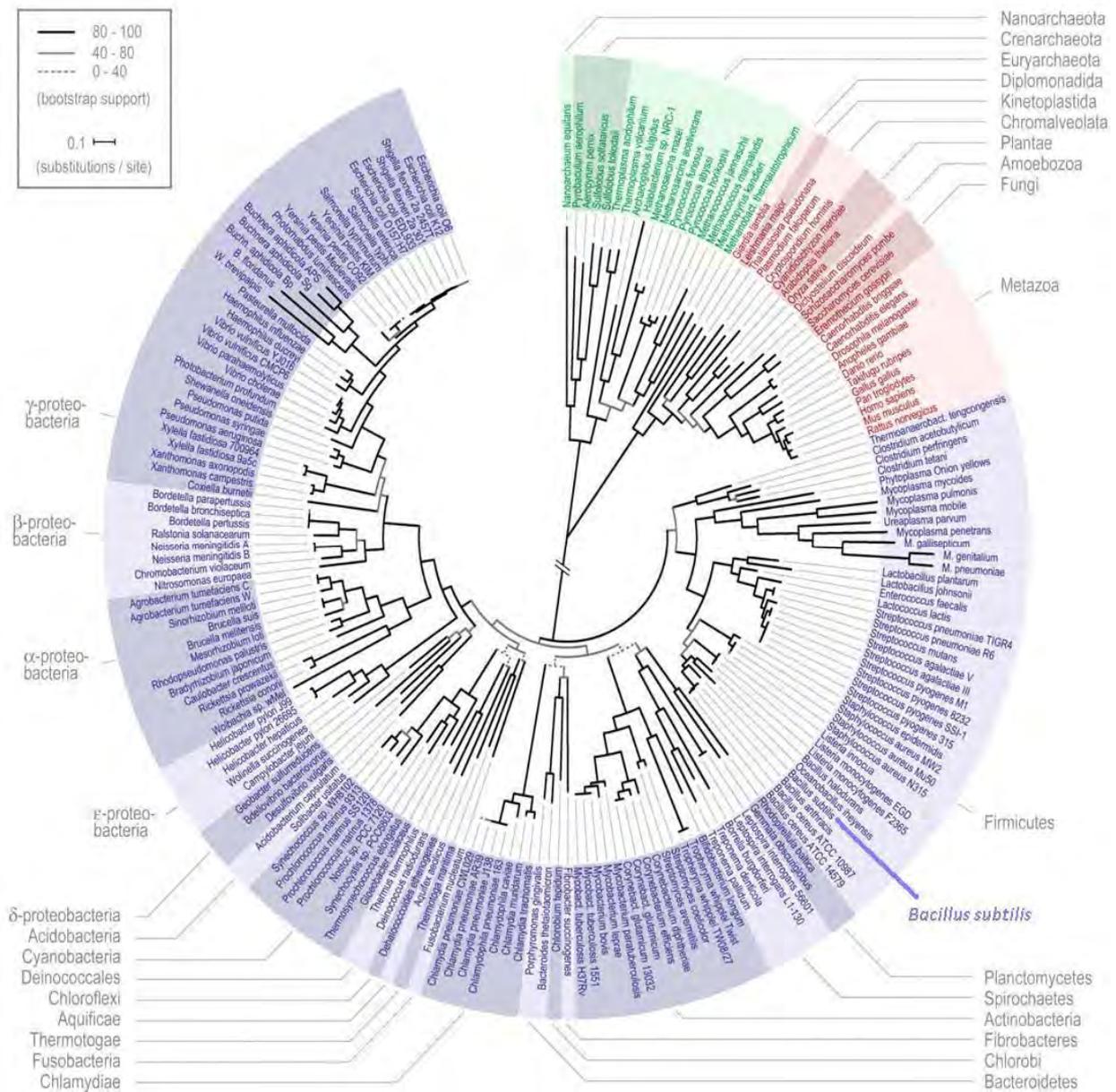


Figure 11: Phylogénie globale de 191 espèces dont le génome est séquencé. Phylogénie basée sur un alignement de la concaténation de 31 protéines universelles. Les Eubactéries sont représentées en bleu, les Eucaryotes en rouge et les Archées en vert. La position de *B. subtilis* dans cette phylogénie est indiquée avec une barre en bleu [104].

Ces différentes propriétés ainsi que sa proximité génétique avec des bactéries dangereuses pour l'homme, telles que *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* ou encore *Listeria monocytogenes* en ont fait un excellent modèle pour l'étude des firmicutes en général [108]. Dès 1997, ce fut la première bactérie à Gram positif dont l'intégralité du chromosome était séquencé. L'analyse bioinformatique de cette séquence d'environ 4 millions de nucléotides a permis de dénombrer quelques 4200 gènes [109] [110] [111]. Parmi eux, 60 % codent des protéines dont la ou les fonctions étaient reconnues de façon plus ou moins précise [66] [107].

7. Le métabolisme énergétique chez *B. subtilis*

L'habitat naturel le plus courant de *B. subtilis* est le sol. Cet habitat naturel contient une grande variété de glucides incluant de nombreux polysaccharides issus des plantes, des animaux et des microorganismes [108]. Après dégradation dans le milieu par les enzymes extracellulaires qui sont produites par la multitude de bactéries et champignons du sol, les petits résidus libérés seront transportés et métabolisés. *B. subtilis* sécrète un grand nombre d'enzymes ayant la capacité de dégrader ces polysaccharides (ex : amidon), tels que α -amylase, la pullulanase, l'endo- β -1,4-mannanase, levanase, endoglucanase et la xylanase, qui permettent à l'organisme de décomposer les polysaccharides en entités plus petites : glucose, maltose, maltotriose et maltodextrines [112] [113] [114]. *B. subtilis* est capable d'utiliser aussi différents types de glucides: mono, di, oligosaccharides, des sucres aminés et leurs dérivés N-acetyl, des sucres contenant des opines, des glyconiques, des glycariques et des acides glucoroniques et des dérivés de sucres polyol (linéaire ou cycliques).

B. subtilis héberge les enzymes glycolytiques qui sont nécessaires pour la conversion de molécules de sucre à partir du glucose-6-P (G6P) en pyruvate [115]. Le G6P est généré lors de l'absorption du glucose qui est médiée par le système PTS et par le métabolisme de certains mono- et disaccharides [116]. Il sera ensuite converti en fructose-6-phosphate (F6P). L'étape suivante sera la conversion du F6P en fructose 1,6-biphosphate (FBP) qui est ensuite clivé en deux molécules (C-3), le dihydroxyactéone phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate. Le Glycéraldéhyde-3-P est transformé en PEP par une série d'enzymes. Dans la dernière étape, le pyruvate est généré à partir du PEP conduisant à un gain net de deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH. Le Pyruvate entre alors dans le cycle de Krebs [115]. Les sucres tels que le D-fructose, le D-mannitol, le sorbitol, le myo-inositol, le glucosamine et le glycérol sont transformés catalytiquement en divers intermédiaires de la glycolyse. Les pentoses y compris l'arabinose, le ribose et xylose sont métabolisés par la voie

des pentoses phosphates (PPP). Comme *B. subtilis* est dépourvue de la voie d'Entner Doudoroff, le Gluconate est également métabolisé par le PPP. Cette voie est également utilisée par différentes bactéries comme *E. faecalis* pour cataboliser le gluconate [115].

8. Le PTS chez *B. subtilis*

Chez *B. subtilis* et *E. coli*, les transporteurs PTS ne représentent, respectivement que 6 % et 7 % de l'ensemble des transporteurs membranaires [117]. Il n'y a aucune protéine PTS décrite chez les eucaryotes, par ailleurs, il semble que ce soit un système spécifique aux bactéries et aux archaea [107]. Ainsi, parmi les 200 espèces d'archaea pour lesquelles la séquence du génome a été déterminée, plus de 40 contiennent la protéine HPr, qui est un composant dits non-spécifique du PTS. La majeure partie des archaea renfermant cette protéine appartiennent au genre *Haloferax* [76]. On se basant sur la phylogénie des protéines IIC, il a été déduit sept familles de PTS: la famille Glucose "Glc" (incluant les glucoside), la famille Fructose "Fru" (incluant le mannitol), la famille Lactose "lac" (incluant cellobiose et N,N-diacetylchitobiose), la famille Galacticol "Gat", la famille Glucitol "Gut", la famille Mannose "Man" et la famille L-ascorbate "Asc" [118]. Tous les firmicutes (ordre des *bacillales* et *lactobacillales* ainsi que la classe des *Clostridia*) possèdent les protéines qui sont impliquées dans le système PTS à savoir l'EI, l'HPr et l'HPrK/P ainsi que les perméases de la famille Glc, Fru et Lac. Exception faite pour *Clostridium tetani* qui possède uniquement le système Glc, alors que *Clostridium perfringens* utilise le système Glc et Fru. Ces bactéries sont dépourvues de système Lac. D'un autre côté, l'abondance du système Man est observée particulièrement chez les *Lactobacilli* et *E. faecalis* qui font partie de la microflore intestinale normale ainsi que chez certains membres d'*Enterobacteriaceae* [118].

Les deux gènes *ptsI* et *ptsH* qui codent respectivement pour EI et HPr sont regroupés chez la majorité des firmicutes dans le même opéron, l'opéron *ptsHI*. Chez *B. subtilis* et *B. anthracis*, cette paire de gènes est précédé par un gène codant une EIIABC spécifique aux sucres non-identifiés [66]. L'expression de l'opéron *ptsHI* est constitutive, ceci reflète la nécessité des enzymes "dite général" du PTS pour transporter une multitude de sucres variés et leurs implications dans de nombreux processus de régulation [69]. Chez *B. subtilis* on trouve le gène *ptsG*, codant pour la EII^{Glc}, en amont du l'opéron *ptsHI*. Il y a un promoteur en amont de *ptsHI* et un autre en amont de *ptsG*. Le dernier est activé par la présence du glucose et permet la synthèse de l'ARNm comprenant *ptsGHI* [119] [120]. De plus le génome de *B. subtilis* code 16 complexes EII, ces perméases sont spécifiques aux sucres qu'elles

Protéines PTS	Domaines structuraux et site de phosphorylation	Domaines/ sous unités	Nombres de résidus	Sucres transportés
Classe glucose/ sucrose				
Sous classe glucose				
PtsG		IICBA	669	Glucose
GamP (YbfS)		IICBA	631	Glucosamine
NagP (YffF)		IICB	452	N-acetylglucosamine
MalP (GlvC)		IICB	527	Maltose
YpqE		IIA	168	Inconnu
YyzE		IIA	76	Inconnu
Sous classe sucrose				
BglP		IIBCA	609	Aryl-β-glucoside
YbbF		IIBC	466	Inconnu
TreP		IIBC	470	Tréhalose
SacP		IIBC	460	Sucrose
SacX		IIBC	459	Sucrose
Classe lactose				
LicA, LicB, LicC		IIA IIB IIC	110, 102, 452	Oligo-β-glucosides
YdhN, YdhM, YdhO		IIA IIB IIC	110, 102, 442	Oligo-β-mannosides
YwbA		IIC	444	Inconnu
Classe fructose/ mannitol				
FruA		IIABC	635	Fructose
MtlA, MtlF		IICB IIA	478, 143	Mannitol
YjdD (ManP)		IIBCA	589	Mannose
Classe mannose				
LevD, LevE, LevF, LevG		IIA IIB	146, 163	Fructose Mannose

Figure 12 : Systèmes de transport PTS chez *B. subtilis* [121].

transportent et comprennent au moins un représentant de chacune des principales catégories du PTS (Fig. 12). Pour la plupart de ces complexes leur substrat spécifique est connu. Environ la moitié des complexes EII renferment les trois domaines, ou les protéines, EIIA, EIIB et le domaine transmembranaire EIIC (le complexe supplémentaire EIID est présent uniquement pour le Lev-PTS de la classe mannose). Il est à noter, chez *B subtilis* la plus grande partie des 10 complexes EII de la classe glucose / saccharose ne contiennent pas leurs propre EIIA [121]. Pour parfaire leur chaîne de transfert du groupe phosphoryle ils doivent soit utiliser le domaine EIIA du PtsG ou des aryl- β -glucosides (*bglP*) ou bien encore les EIIA^{Glc}-like protéines codées par les gènes monocystroniques *ypqE* et *yyzE* [121]. Une enzyme EIIA peut donc fonctionner avec différentes enzymes EIIB. YpqE est une EIIA^{Glc}-like protein de 168 résidus, c'est un paralogue dont la fonction est inconnue. Elle intervient dans la cascade de phosphorylation des domaines EIIB appartenant aux deux PTS spécifique du sucrose. YyzE est la seconde IIAGlc-like protéine, c'est un homologue tronqué de EIIA. Le produit du gène *yyzE* ne possède pas les deux parties N-terminale (70 résidus) et C-terminal (30 résidus) qui sont orthologues au produit du gène *crr* des bactéries entériques [47]. Aucune donnée expérimentale ne confirme ou n'infirme le rôle de cette protéine dans le PTS. Il existe un autre gène *ywbA*, codant une protéine homologue à une perméase EIIC de la classe lactose, qui est dépourvu des deux domaines EIIA et EIIB. Actuellement il reste à découvrir si le mode de fonctionnement de cette perméase nécessite l'utilisation des EIIA et EIIB appartenant à l'une des PTSs de la famille lactose, LicA et LicB respectivement YdhN et YdhM.

9. Le métabolisme du maltose chez *B. subtilis*

Le transport du maltose chez les firmicutes se produit soit via le PTS, comme il a été rapporté, pour *B. subtilis* [122] et certain *Streptococci* [123] [124] [125] et par un système non PTS comme dans le cas de *L. casei*, ou le maltose est transporté par un système de type ABC transporteur [126]. En 1997, à l'issue du séquençage du génome de *B. subtilis*, Sekiguchi et son équipe ont déterminé la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN "12,4 Kb" qui est proche de la région 76 [127]. Cela a permis de révéler l'existence de deux ORF. Les deux protéines respectivement montrent des similarités avec une 6-phospho- β -glucosidase (GlvA) et un IICB spécifique pour maltose (GlvC/GlvB) d'*E. coli* [127] [128]. Localisé au milieu du locus *glv* de *B. subtilis* une troisième ORF, *glvR*, coderait un régulateur transcriptionnel (fig. 13) [109] [111] [129] [122]. Ces trois gènes sont transcrits sous la forme d'un polycistron à partir d'un promoteur situé en amont du gène *glvA* [129].

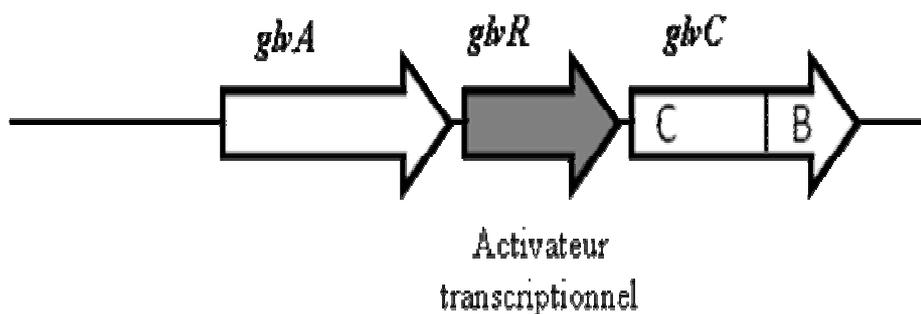


Figure13 : Représentation schématique de l'opéron *glv* chez *B. subtilis* [129].

9.1. Implication du PTS dans l'utilisation du maltose chez *B. subtilis*

Il a été démontré que chez une souche *B. subtilis* déficiente en enzyme EI, la perméation du maltose est complètement abolie. Ces résultats démontrent que le transport de ce substrat est assuré par le PTS. La coexpression des enzymes IICB^{Mal} et IICBA^{Glc} (PtsG) en présence du maltose pourrait s'expliquer par la nécessité d'utiliser le domaine EIIA de PtsG pour le transfert du groupement phosphorylé vers le domaine IICB^{Mal} [130] [131]. Pour tester si le groupe phosphorylé requis pour le transport est fourni par PtsG, un mutant *ptsG* a été construit et sa capacité à utiliser le maltose a été testée. Toutefois, le transport du maltose par le mutant est même élevé par rapport à la souche sauvage; PtsG n'est pas nécessaire pour le transport du maltose, ce qui confirme les observations antérieures obtenues par Reizer et son équipe; par contre il pourrait avoir une influence sur la régulation du transport du maltose [122]. En effet, outre leur implication dans le transport des sucres-PTS, les EII et plus particulièrement EIIA et EIIB, sont impliquées dans de nombreuses voies de régulation. Ces fonctions sont liées principalement à la phosphorylation des régulateurs transcriptionnels : les activateurs transcriptionnels comme LevR et LicR, ou des antiterminateurs comme SacT, SacY, GlcT et LicT, par la P~His-HPr ou la P~His-EIIA ou la P~Cys-EIIB. La phosphorylation des régulateurs de la transcription à partir de la P~His-HPr et P~His-EIIA se fait sur leurs domaines conservés dits PRD (PTS Regulation Domain) ou leurs domaines ressemblant aux composants IIA ou IIB du PTS, et peut activer ou inactiver la protéine cible, selon le résidu histidine ou cystéine modifié. Non seulement les régulateurs transcriptionnels sont contrôlés par la phosphorylation PTS dépendante, mais la glycérol-kinase d'*E. faecalis*, *Enterococcus casseliflavus* et *B. subtilis*, une enzyme qui oriente le glycérol vers la glycolyse, est aussi activée par une phosphorylation PTS-dépendante (P~His-HPr-dépendante) [107].

9.2. L'organisation des gènes du métabolisme du maltose chez *B. subtilis*

Le métabolisme du maltose chez *B. subtilis* est constitué de deux opérons, le premier, l'opéron *glv* contient une perméase EII PTS-dépendant spécifique au maltose et le deuxième opéron appartient au système de transport de type ABC.

9.2.1. Structure et organisation de l'opéron *glv*

9.2.1.1. Le gène *glvA*

GlvA est un polypeptide constitué de 449 résidus d'acides aminés [129]. L'ORF 1 code une protéine qui présente une grande similarité par rapport à la protéine *glvG* d'*E. coli* (Sp : *glvg_E coli* 212 AA), qui est probablement une 6-phospho- β -glucosidase (EC 3.2.1.86) [132] et par rapport au gène *celF* d'*E. coli* dont le produit est aussi une 6-phospho- β -glucosidase (SP : *celf_E coli*, 450 aa) [133]. Le gène *malH*, qui code une 6-phospho- α -glucosidase, permet la croissance de *Fusobacterium mortiferum* sur une grande variété d' α -glucosides y compris le maltose, l' α -méthyl glucoside, le tréhalose, le palatinose et le turanose [134]. Ce gène a été récemment cloné, séquencé et exprimé dans *E. coli*. La séquence d'acides aminés déduite de *MalH* présente une identité de 73% (88% de similarité) avec celle déduite de la séquence nucléotidique de *glvA* chez *B. subtilis* [135]. Contrairement à ce qui a été supposé, ce gène coderait une phospho- α -glucosidase plutôt qu'une phospho- β -glucosidase [135] [136].

Les travaux de Thompson ont confirmé que GlvA est une nouvelle 6-phospho- α -glucosidase qui utilise le maltose-6-phosphate comme substrat. Cette enzyme est affectée à la famille 4 de la superfamille des glycosylhydrolase, membres 20, banque de données de protéines séquence SWISS-PROT [<http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>] [129]. Contrairement à d'autres phosphoglycosylhydrolase, la protéine GlvA de *B. subtilis* nécessite pour son activité les ions divalents (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , or Ni^{2+}) et le NAD(H) [137] [138] [139] [140]. La présence du Mn^{2+} favorise une structure tétramérique active de la 6-phospho- α -glucosidase. La présence d'un agent chélatant comme l'EDTA entraîne une dissociation du tétramère en une forme dimérique non active [135]. Cette enzyme est capable d'hydrolyser spécifiquement le maltose-6-phosphate (6-*O*-phosphoryl- α -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranose) et le tréhalose-6-phosphate (6-*O*-phosphoryl- α -D-glucopyranosyl-(1-1)-D-glucopyranose) pour libérer du glucose-6-P et du glucose. La tréhalose-6-phosphate phosphoglucohydrolase (EC 3.2.1.93) catalyse l'hydrolyse du tréhalose-6-phosphate en formant ces mêmes produits. Cette enzyme est synthétisée par le gène *treA* de *B. subtilis* et *treC* de *E. coli* [135].

9.2.1.2. Le gene *glvC*

GlvC est le IICB du PTS spécifique du maltose constitué de 527 résidus d'acides aminés. Ses 12 segments transmembranaires (domaine IIC) forment un canal de translocation et le domaine IIB catalyse la phosphorylation du substrat durant la traversée de la membrane. Le maltose-6-phosphate qui est libéré à l'intérieur de la cellule est hydrolysé par voie intracellulaire en glucose-6-phosphate et glucose par GlvA [129] [127]. L'analyse des séquences protéiques a révélé que la région N-terminal et C-terminal de GlvC présente respectivement des similarités significatives avec les protéines GlvC (66,3% d'identité sur 368 résidus d'AA) et GlvB de *E. coli*. GlvC de *E. coli* est un IIC du PTS et GlvB un IIB [132]. Chez *E. coli*, les gènes *glvC*, *glvB* et *glvG* ainsi ordonnés, semblent formés un opéron. Il est fort probable que chez *B. subtilis* ces deux protéines du PTS (domaine IIC et IIB) ont fusionné tout en sauvegardant leurs fonctions. Ces événements de fusion de gènes ont été observés pour d'autres protéines, ex : *E. coli* IIBC Fructose et *Xanthomonas campestris* EII Fructose [39] [132] [141] [142]. De plus sur la base de leurs séquences, la région C-terminale de GlvC présente 30,9 % d'identité (sur 68 résidus) avec la séquence N-terminal du produit du gène *bglP* de *B. subtilis* qui est un IIBCA spécifique pour les β -glucosides (SP: ptba_bacsu, 609 aa) [127].

En tenant compte de l'organisation des domaines et de la forte similarité des séquences avec les perméases PTS-dépendant, GlvC a été affilié à la famille de glucose/maltose plutôt que celle de la famille saccharose/ β -glucoside qui inclue les perméases spécifiques au sucrose (SacP) et au trehalose (TreP) [47]. En outre, la souche GP110 qui est muté pour le gène *glvC* pousse normalement sur toutes les sources de carbone testées, à l'exception de maltose. Sur la base de ces résultats il a été proposé que *glvC* code pour une perméase PTS-dépendant qui est spécifique au maltose et le gène a été requalifié *malP* [47]. Des mutations simples ayant ciblé les gènes *mdxE* ou *mdxF-mdxG* et *yvdH-yvdI* codant des composants des ABC transporteurs ne présentent aucun effet sur le transport du maltose. En revanche, chez un simple mutant *malP* ou dans un double mutant *mdxE malP* ou *malP mdxF-mdxG*, aucune absorption de maltose n'était détectable après une croissance dans le milieu Luria-Bertani en présence de 1% de maltose. Ces données démontrent que l'absorption du maltose est dépendante de MalP et elle est indépendante de MdxE, de MdxF et de MdxG [122].

9.2.1.3. Le gene *glvR*

Chez *B. subtilis*, l'opéron *glv* nécessite un facteur positif (GlvR) pour son expression [129]. La protéine GlvR est un polypeptide constitué de 254 résidus d'acides aminés, et sa séquence d'acides aminés présente une grande similitude avec celles des membres de la famille RpiR / YebK / YfhH (SWISS-PROT). RpiR est impliqué dans la régulation et l'expression de *rpiB* de *E. coli*. Une analyse bioinformatique des membres de cette famille révèle une signature au niveau de la région N-terminal ; (résidus d'acides aminés 1 à 106; logiciel Pfam; Sanger Centre) qui correspond à un domaine de liaison à l'ADN de type *Helix-Turn-Helix* (HTH) qui est une caractéristique de nombreux régulateurs d'expression [129]. GlvR présente un domaine (SIS) dans la région C-terminale (résidus 107 à 243; logiciel Pfam) qui est semblable aux isomérases qui sont spécifiques aux sucres phosphorylés [143]. Ces domaines sont également présents dans les protéines qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de sucres phosphorylés. Il est donc probable que le maltose-6-phosphate se lie à GlvR qui va exercer un effet positif sur la transcription de l'opéron *glvARC*. La séquence de GlvR montre aussi une similarité assez importante avec YfhH de *E. coli* (SP: yfhH_E coli, 282 aa) dont le gène forme un opéron avec *yfhL* [129].

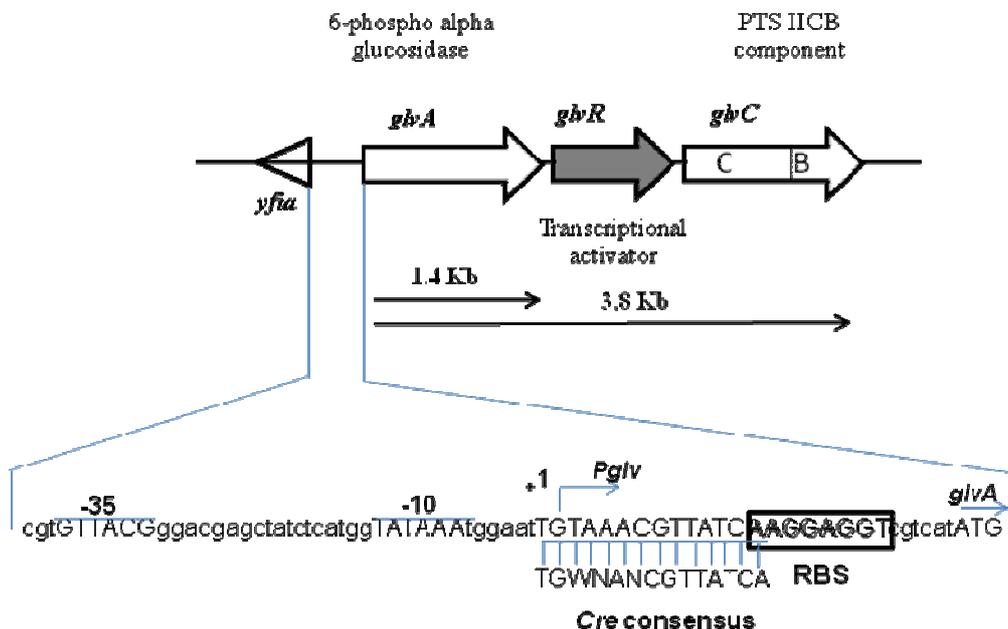


Figure 14 : Détermination du site d'initiation de la transcription de l'opéron *glv* [129].

Afin d'analyser la régulation de l'opéron *glv*, Yamamoto et ses collaborateurs ont réalisé une fusion transcriptionnelle *glvR-lacZ* avec le plasmide pMUTIN. Dans ce mutant, le gène *lacZ* codant la β -galactosidase est sous le contrôle du promoteur *glv* et *glvR* est sous

contrôle du promoteur *Pspac*. L'expression du gène *lacZ* dans ce mutant augmente considérablement en présence de l'IPTG et du maltose. Ces données indiquent que GlvR est un élément de control positive qui active la transcription des gènes codant GlvA et GlvC et que le maltose est un inducteur de l'expression de l'opéron *glv* [129]. Par la suite, il a été établi que la séquence *cre* précédant l'opéron *glv* de *B. subtilis* (TGTAACGTTATCA) est totalement identique à la séquence consensus. Cette séquence est située just en amant du site de fixation des ribosomes de l'opéron *glv*. Cette séquence est probablement importante pour la RC (Fig. 14). En effet, un changement dans la séquence central de *cre* (CG-à-AT) dans la souche AMGLVCR empêche également la RC du gène *lacZ* en présence du citrate et du glucose (Fig. 14). Ces données confirment que la RC de l'opéron *glv* est directement régulée via CcpA et la séquence *cre* [129].

9.2.2. Transport et utilisation du maltose et des maltodextrines par le système ABC

B. subtilis contient au moins 37 ORF qui codent pour des "protéine affine" (SBP pour Solute Binding Protein) putatives qui fixent l'alloctrite avec une haute affinité. [109] [110] [144]. La spécificité de ces nombreux transporteurs demeure encore inconnue. Trois d'entre eux, YesO, YyfK et MdxE présentent une homologie significative avec les protéines qui se lient au maltose et au maltodextrine [109] [110]. Récemment, il a été démontré que YyfK interagit avec les maltodextrines linéaires et cycliques [145]. Par homologie de séquences aux gènes codant pour les SBP la séquence ADN de YyfK (renommée CycB) coderait une protéine homologue à CymE de *Klebsiella oxytoca* et MalE de *E. coli*, tout deux capable d'interagir avec les cyclodextrines. Par ailleurs, Tangney et son équipe avaient montré que dans un contexte où le PTS du maltose est inactif, une culture de *B. subtilis* pousse en présence du maltose comme seule source de carbone [146]. Cette étude a mis en évidence la présence d'une maltose phosphorylase et une glucokinase. Ces résultats suggèrent que le maltose qui est accumulé dans le cytoplasme est dégradé par la maltose phosphorylase. Par conséquent un système de type ABC qui est auxiliaire au système PTS interviendrait dans l'utilisation du maltose [147]. Le transport du maltose par l'ABC transporteur MalKEFG a été caractérisé chez *L. casei* et *L. acidophilus* [126] [148]. Ce transporteur ABC est homologue aux protéines qui sont impliquées dans le transport des maltodextrines chez *B. subtilis* et il présente une faible affinité pour le transport du maltose [129]. De plus, plusieurs glucanases intracellulaires sont cotranscrites avec *malKEFG*, cela indique que la fonction principale de se système est le transport des oligosaccharides [149].

9.2.3. Description du système ABC chez *B. subtilis*

Les études de Schönert ont montré que la protéine mdxE avait une forte affinité (de l'ordre du micromolaire) pour les maltodextrines, principalement pour le maltotriose et une faible affinité pour le maltose (de l'ordre du millimolaire). L'analyse comparative de l'affinité de MdxE de *B. subtilis* ($K_d = 1\text{mM}$ pour le maltose) avec les binding proteins qui sont spécifiques au maltose chez différents microorganismes : *E. coli* ($K_d = 1,6\ \mu\text{M}$ pour le maltose) ou pour *Aeromonas hydrophila* ($K_d = 6\ \mu\text{M}$ pour le maltose) a permis de suggérer que chez *B. subtilis*, le produit du gène *mdxE* est plutôt une maltodextrines binding protein. Par conséquent, chez *B. subtilis* l'ABC transporteur ne transporte pas ou seulement avec faible efficacité le maltose [150].

La prédiction des produits de gènes appartenant à une séquence d'ADN qui représente un cluster (*yvdE* à *yvdM*) est présentée dans le schéma (fig. 15). Ils existent des similarités entre ces acides aminés et les protéines qui sont impliquées dans l'utilisation du maltose et de maltodextrines [150]. En se basant sur la similarité des séquences des aa qui sont déduites à partir de ces ORF, les gènes ont été annotés comme codant respectivement pour : un régulateur transcriptionnel (*yvdE*), une protéine SBP (*mdxE* synonyme *yvdG*), une MSC (*mdxF* synonyme *yvdH* et *mdxG* synonyme *yvdI*) d'un transporteur ABC, une neopullulanase (*yvdF*) et une maltose phosphorylase (*yvdK*). La fonction de *Yvdj* demeure inconnue, par contre elle présente un motif de liaison ATP/GTP [151] [122].

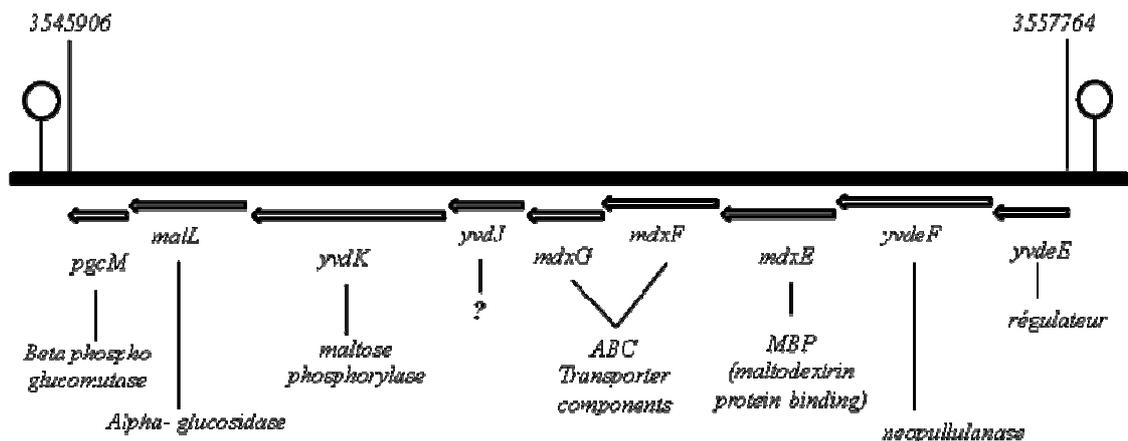


Figure 15: Organisation génétique du système de transport de type ABC spécifique aux maltodextrines chez *B. subtilis* [129].

9.2.3.1. Le gène *malL* (*yvdL*) et MAase (*YvdF*)

Chez *B. subtilis*, l'enzyme MalL a été décrite comme une sucrose-maltase-isomaltase à large spectre d'action sur différents types de substrat [150] [152]. Sa séquence d'acides

aminés présente une forte similarité avec plusieurs α -glucosidases. Les homologies des séquences de MalL, MalN et AmyX ainsi que l'amylopullulanase de bifidobactéries suggèrent que ces enzymes peuvent également hydrolyser les oligosaccharides avec des liaisons glucosidiques α -(1-4) et α -(1-6) [153] [148]. Sa structure est très proche de l'alpha glucosidase (MalA) de *Staphylococcus xylosus*. La protéine MalA est une α -1-4 glucosidase qui est incapable de cliver le substrat isomaltose [154].

La disruption du gène *malL* entraîne une perte complète de l'induction de l'enzyme α -glucosidase par le maltose [150]. Cette activité α -glucosidique est détectée uniquement dans les cellules qui ont poussé dans un milieu contenant du maltose, de l'amylose, de l'amidon ou du glycogène [150] [129]. MalL est soumise à la RC en présence du glucose et du fructose. La RC par le glucose de l'expression de cette enzyme demeure maintenue chez une souche mutée pour le gène *ccpA* et/ou *ptsHI* qui permet d'exprimer la protéine HPr-S46A [147]. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les maltodextrines ainsi que divers disaccharides tels que le maltose, le saccharose et l'isomaltose.

Chez *B. subtilis* MalL peut hydrolyser les maltodextrines qui ont un DP de 6 par contre cette activité est significativement réduite envers ceux ayant un DP de 7. D'un autre côté les maltoheptaose G7 ainsi que les maltopentaose (G5) et les maltohexaose (G6), peuvent aussi être attaqués par une MAase (YvdF) qui est présente dans le périplasme. Cela permet à la bactérie d'utiliser efficacement les maltooligosaccharides de différentes longueurs rendant ainsi le transport plus efficace [155].

Les CD sont hydrolysés par une MAase après leurs absorptions via une perméase Cyc de type ABC transporteur. La MAase (YvdF) chez *B. subtilis* 168 et son homologue chez *B. subtilis* SUH4-2 partagent 99% d'identité aussi bien aux niveaux de la séquence nucléotidiques que celle en acides aminés. La MAase (EC 3.2.1.133) agit sur différents substrats telque les cyclodextrines (CD) les maltooligosaccharides, les pullulan, l'amidon et le glycogène [156]. Elle appartient à la famille 13 des glycosides hydrolases tout comme les cyclodextrinase (EC 3.2.1.54), les (EC 3.2.1.135) et la R-47 amylase II de *Thermoactinomyces vulgaris* [155]. La transcription à partir du promoteur *PyvdE* est induite uniquement si le substrat spécifique est présent dans le milieu de croissance comme le maltose, l'amidon et les CD. Par contre cette transcription est réprimée en présence du glucose, du fructose, du sucrose ou du glycérol comme seule source de carbone [155].

9.2.3.2. La maltose phosphorylase et la β - phosphoglucomutase

Chez *B. subtilis*, l'apparition du β -glucose-1-phosphate à partir de maltodextrines suggère l'existence d'une phosphorylase de maltodextrine. Une telle enzyme putative a été identifiée par des comparaisons de séquences et a été récemment caractérisé comme une maltose phosphorylase [157] [158]. La formation de β -glucose-1-phosphate a été détecté chez *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Neisseria meningitidis* et *L. lactis* [159]. Le produit de la dernière ORF présente des similitudes avec la PgcM. Elle contient un motif putatif conservé de liaison de métal (FDLDGV) qui est observée dans l'ensemble de ces enzymes [109] [111] [129]. Il a été montré que le gène *pgcM* coderait une β -phosphoglucomutase/glucose-1-phosphate phosphodismutase qui transforme β -glucose-1-phosphate en β -glucose-6-phosphate [129].

9.2.3.3. La MdxE (maltodextrin binding protein)

Les données obtenues par Schönert et son équipe ont aussi démontré que les maltodextrines ayant un degré de polymérisation (DP) de 3 à 7 (G3 à G7) sont captés par la protéine MdxE (maltodextrin-binding protein, YvdG) et après transporté par les deux protéines membranaires (MdxF et MdxG) avec l'aide de l'ATPase MsmX de l'ABC transporteur (fig.15) [155]. La séquence de MdxE montre 37% d'identité avec la CBP (cyclodextrin-binding protein, aussi appelée CycB ou YvfK) de *B. subtilis* [145]. Il a été rapporté que la protéine CycB présente une spécificité envers les maltodextrine (DP 4-5) et les cyclodextrine naturelles: K (alpha), L (bêta) et Q (teta), la plus forte affinité est observée pour les Q-cyclodextrin [145]. MalE et CycB de *B. subtilis* montrent aussi entre 40 et 44% d'identité avec la protéine putative MalE de *L. acidophilus* NCFM [160] [161] [162].

La protéine MdxE présente des affinités micromolaires pour les maltodextrines (par exemple, maltohexaose; $K_d = 3 \mu\text{M}$), par contre son affinité pour le maltose est très faible ($K_d = 1 \text{ mM}$) ce qui justifie que l'ancien nom YvdG a été changé en MdxE [122]. L'énergie qui est nécessaire pour réaliser le transport des maltodextrines provient de MsmX. Le génome de *B. subtilis* coderait potentiellement trois ATPase qui sont présumés impliqué dans l'import de substrat via un système ABC. Ces ATPase qui sont *ylmA*, *yusV* et *msmX* semblent être organisés en opérons monocistroniques.

Aucune absorption de maltotriose n'a été détectée chez des mutants *malP mdxE*, *malP mdxE-mdxG* ou chez un double mutant *malP msmX*. Ceci laisse penser que MdxE, MdxF, MdxG et MsmX sont les constituants du transporteur ABC par lequel le transport du

maltotriose est effectué (fig. 15). Comme dans le cas du transport du maltose, le transport du maltotriose est soumis à la répression catabolite par le glucose [122]. Fait intéressant, le groupe de gènes *yvdE-pgcM* contient une séquence *cre* dans la région en amont de *mdxE* et présente dans le temps le même profil d'expression que l'opéron *glv*, ce qui suggère que CcpA est également impliquée dans la régulation de l'utilisation de maltodextrine [66].

9.3. Modèle de la voie métabolique du maltose chez *B. subtilis*

Les données soulevés précédemment ont permis de proposer un modèle pour l'utilisation de l'amidon chez *B. subtilis* (fig. 16). Ainsi, sous l'action d'une α -amylase (AmyE), ces polysaccharides sont hydrolysés en maltose et maltodextrines. Le maltose après transport et phosphorylation par le PTS est libéré dans le milieu intracellulaire sous forme de maltose-6-P [47]. Ce dernier est scindé en glucose et glucose-6-P par MalA, une 6-phospho- α -glucosidase NAD-dépendante [135]. Les maltodextrines empruntent un système de transport de type ABC qui leur est spécifique. Ce système de transport est composé de quatre sous unités MdxE, MdxF, MdxG, et MsmX qui font pénétrer les maltodextrines sous forme de sucres libres sans aucune modification. La dégradation des maltodextrines à l'intérieur de la cellule est réalisée grâce à l'action concertée de plusieurs enzymes entre autre une neopullulanase (codé par le gène *YvdF*), une maltose phosphorylase (codé par le gène *yvdK*) et une glucosidase (codé par le gène *malL*) [149] [151]. Cette activité enzymatique va entraîner la libération du glucose et du glucose-1-P [122] [156]. Le glucose-1-P servira de substrat pour la β -phosphoglucomutase PgcM qui va le convertir en glucose-6-P [163]. L'hydrolyse du maltose-6-P par MalA ainsi que l'hydrolyse du maltose, maltotriose, maltotétraose, maltopentaose et maltohexaose par MalL produisent du glucose cytoplasmique non phosphorylé [152]. Le glucose est finalement phosphorylé via une glucose kinase GlcK ATP-dépendante pour former du glucose-6-P et rejoint ainsi la voie de la glycolyse [116] [164]. Comme décrit avant, l'opéron *glv* est sous le contrôle d'un régulateur transcriptionnel GlvR. Par contre la régulation de l'expression de l'opéron maltodextrines demeure encore mal connue, mais il semblerait qu'elle soit contrôlée par YvdeE. Récemment, Gopal et son équipe ont démontré que chez *Listeria monocytogenes*, la protéine Lmo2128 qui est un orthologue de la protéine YvdE, serait impliquée dans la régulation transcriptionnelle du système d'absorption du maltose et de maltodextrine. La protéine Lmo2128 agirait en tant qu'élément de contrôle positif [150]. L'interaction du domaine IIA^{Glc} de la protéine PtsG avec le domaine IIB^{Mal} de MalP, afin de permettre le transfert d'un groupement phosphorylé vers le maltose, n'a pas encore été mise en évidence. Une complémentation similaire a été observée pour les

PTSs spécifiques du sucrose et du tréhalose, qui eux aussi manquent une propre EIIA [130] [131]. Ces PTS utilisent également le domaine IIA^{Glc} de la protéine PtsG permettant le transport du glucose pour la phosphorylation de leur domaine EIIB.

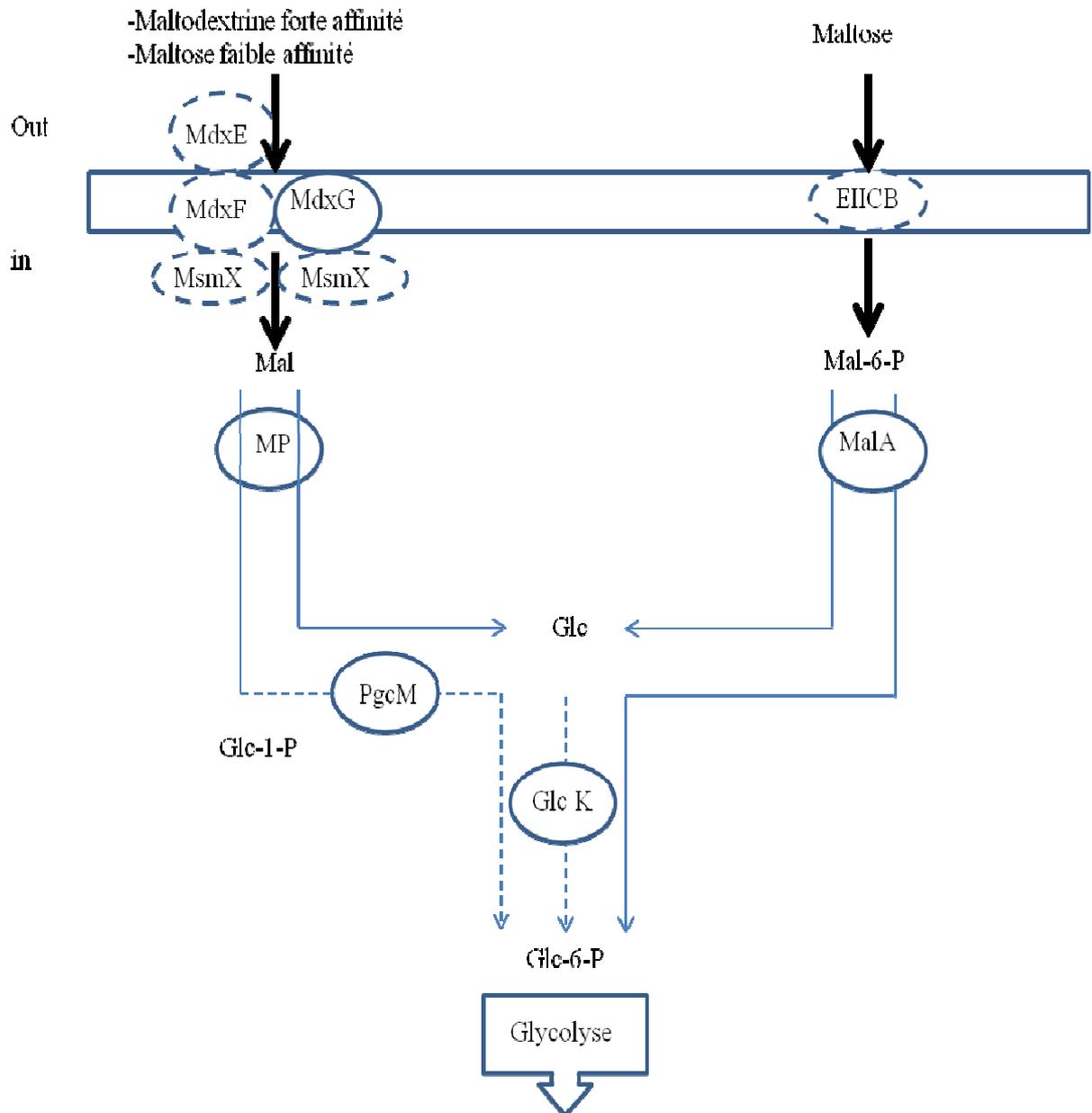


Figure 16 : Modèle schématique de l'utilisation de l'amidon chez *B. subtilis* (inspiré de Schonert et collaborateurs) [122].

10. Le métabolisme du maltose chez *Enterococcus. faecalis*

10.1. Caractéristiques de *E. faecalis*

Orla-Jensen en 1919 définit les bactéries lactiques comme un groupe de bactéries à Gram positif, non mobiles, asporogènes et fermentant les hydrates de carbone et certains alcools en lactate. Phylogéniquement elles appartiennent à la division des firmicutes, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et sont regroupées en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* (Fig. 17) [45] [165].

Domaine : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Bacillaceae

Genre : Bacillus

Espece : Bacillus subtilis

Famille : Listeriaceae

Genre : Listeria

Espece : Listeria monocytogene

Famille : Staphylococcaceae

Genre : Staphylococcus

Espece : Staphylococcus aureus

Ordre : Lactobacillales

Famille : Enterococcaceae

Genre : Enterococcus

Espece : Enterococcus faecalis

Famille : Lactobacillaceae

Genre : Lactobacillus

Espece : Lactobacillus casei

Famille : Leuconostocaceae

Famille : Streptococcaceae

Genre : Lactococcus

Espece : Lactococcus lactis

Genre : Streptococcus

Espece : Streptococcus salivarius

Figure 17 : Organisation taxonomique de quelques bactéries à Gram positifs du phylum des firmicutes.

E. faecalis est une bactérie lactique à gram-positive et à faible teneur en GC. Anciennement connu sous le nom de *Streptococcus faecalis*. Elle colonise les voies gastro-intestinales de divers hôtes [166] [167]. Uniquement *E. faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium*, et *Enterococcus durans* peuvent coloniser l'intestin humain, les autres sont présents dans le tractus gastro intestinal des animaux (*Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*) ou vivant sur les plantes (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii*) [168]. La plupart des souches de l'espèce *E. faecalis* sont commensaux et inoffensifs. Ils peuvent être bénéfiques pour la santé (probiotique), ils peuvent être trouvés naturellement dans les matières premières, et ils peuvent être utilisés dans les cultures starter pour les aliments fermentés. D'autres souches sont des pathogènes opportunistes [169].

E. faecalis peut causer des maladies chez les personnes immunodéficientes et elle est souvent l'agent causal des infections nosocomiales [166]. La capacité d'*E. faecalis* à former des biofilms contribue probablement à sa pathogénicité et joue un rôle dans la persistance et le transfert horizontal de gènes [166]. L'institut de recherche génomique (TIGR) a déterminé la séquence complète du génome de la souche *E. faecalis* V583. Une version préliminaire de la séquence est disponible sur le site Web TIGR (<http://www.tigr.org>) [166]. La séquence « shot gun » du génome de la souche utilisé durant ma thèse (TX4000, également nommée JH2-2) est disponible sur le site NCBI : (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/304651752>).

10.2. Le Métabolisme du maltose chez les bactéries lactiques

Dans l'intestin, la principale source de carbone et d'énergie pour les bactéries provient de l'amidon. Ce polymère est clivé dans la cavité duodénale par l' α -amylase pancréatique en glucose, en maltose et en oligosaccharides qui seront absorbés dans l'intestin grêle. En revanche des quantités considérables d'amidon peuvent échapper à cette l'hydrolyse et seront accessible aux bactéries du côlon [170] [171]. Dans le gros intestin, l'amidon est hydrolysé par des bactéries appartenant à plusieurs genres dont les *Bifidobactéries*, les *Bacteroides*, les *Clostridium*s, les *fusobactéries*, les *Streptocoques*, les *Propionibactéries* et les *Butyrivibria*. Les produits de l'hydrolyse de l'amidon comprennent le glucose, le maltose, le maltotriose et le maltotétraose, qui peuvent ensuite être utilisées par d'autres bactéries [172].

Le métabolisme du maltose chez les firmicutes, le cas des bactéries lactiques ex: *Streptococcus bovis*, *L. lactis*, *Lactobacillus sanfrancensis* et *E. faecalis* [157] [172] [173] ou chez *B. subtilis*, une bactérie qui forme des endospores a été largement étudié et procède par différentes voies qui ne ressemble pas à celle présente chez *E. coli* [112]. Trois voies différentes ont été rapportées pour l'utilisation du maltose chez les bactéries lactiques (fig.

18).

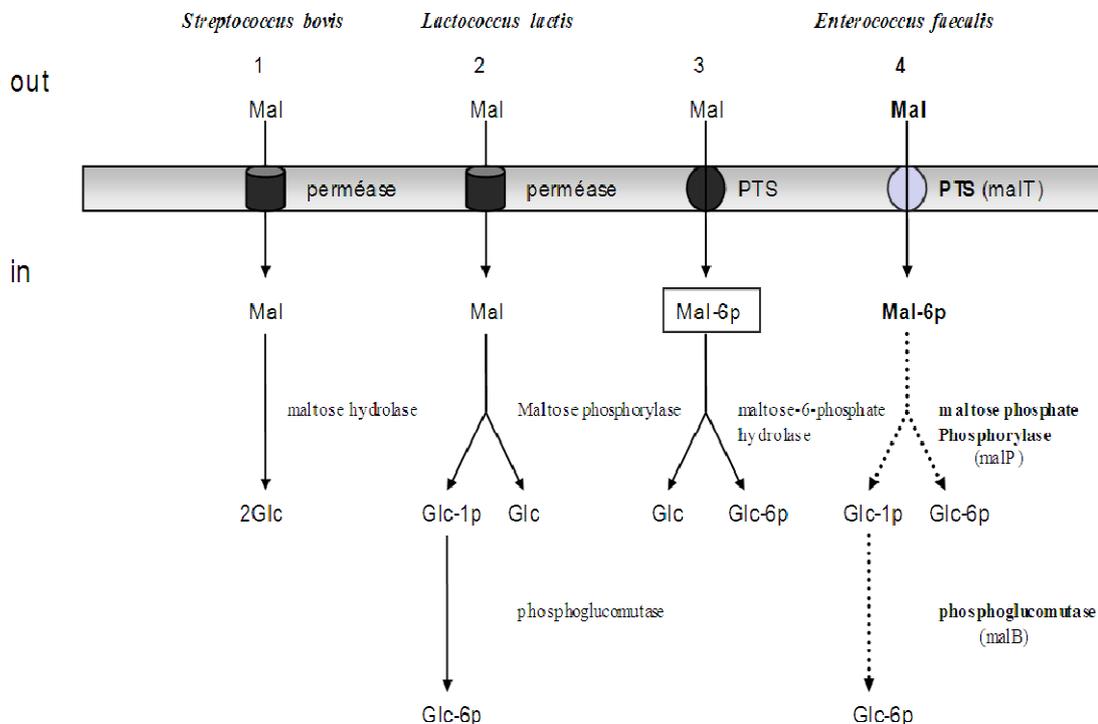


Figure 18 : Les différentes voies métaboliques impliquées dans l'utilisation du maltose chez les bactéries lactiques [172].

La première voie a été observé chez *S. bovis*, le maltose pénètre dans les cellules en utilisant une perméase, il est ensuite clivé par une maltose hydrolase (MH) en deux molécules de glucose [174] [175]. La deuxième voie a été démontrée chez *L. lactis* qui utilise également une perméase pour l'assimilation du maltose [176]. Le maltose est clivé par l'intermédiaire d'une maltose phosphorylase en glucose plus glucose-1-phosphate. Par la suite une phosphoglucomutase convertie le glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate [157] [177] [175]. La dernière voie fait intervenir un PTS dans le transport du maltose qui est libéré à l'intérieur de la cellule sous forme de maltose-6'-P. Le maltose-6'-P sera ensuite dégradé par une maltose-6-phosphate hydrolase en glucose-1-P plus glucose-6-P. Une phosphoglucomutase convertie Le glucose-1-P en glucose-6-P en glucose-1-P plus glucose-6-P [172] [178]. Une phosphoglucomutase convertie Le glucose-1-P en glucose-6-P.

10.2.1. Description de la voie métabolique du maltose chez *E. faecalis*.

E. faecalis peut exprimer les enzymes de l'ensemble des trois grandes voies cataboliques des glucides à savoir, la voie Embden-Meyerhof-Parnass (EMP) ou glycolyse, la voie d'Entner-Doudoroff, et la voie des pentoses mono-phosphate. Le transport d'un grand nombre de glucides qui sont métabolisés par les entérocoques est médiée par le PTS. Il s'agit notamment de D-glucose, de D-fructose, de lactose, de maltose, de D-mannose, de tréhalose, de sucrose, de mannitol et de N-acétyl glucosamine [179]. Les résultats de Le Breton indiquent que chez *E. faecalis*, le transport du maltose à travers la membrane cellulaire met en jeu un PTS (fig. 18). Le maltose est capté par le domaine IIC de la protéine membranaire MalT (EF0958). Le maltose apparaît dans la cellule sous forme de maltose-6'-P qui sera clivé par une maltose-6'-P phosphorylase. Cette enzyme est codée par le gène situé en amont du gène *malT* (EF0957). La maltose-6'-P phosphorylase pourrait convertir le maltose-6'-P en glucose-6-P et glucose-1-P, qui est transformé en glucose-6-P par une phosphoglucomutase MalB qui est codée par le second gène de l'opéron *malPBMR*.

10.2.2. Organisation génétique de l'opéron *malMBPR*

Les travaux de Le Breton ont permis d'identifier les gènes impliqués dans l'absorption et l'utilisation du maltose chez *E. faecalis* JH2-2. Ces gènes correspondent à la région EF0954-EF0958 dans le génome de la souche V583 [180]. Les gènes *malP* (EF0957) et *malT* (EF0958) sont situés à proximité de l'un et de l'autre et ils sont transcrits dans des directions opposées. L'analyse de l'ADN autour de ces deux gènes a mis en évidence la présence de 3 autres ORF immédiatement en aval de *malP* [*malB* (EF0956), *malM* (EF0955) et *malR* (EF0954)] et de deux autres gènes (EF0959 et EF0960) de fonction inconnue en aval de *malT* [172].

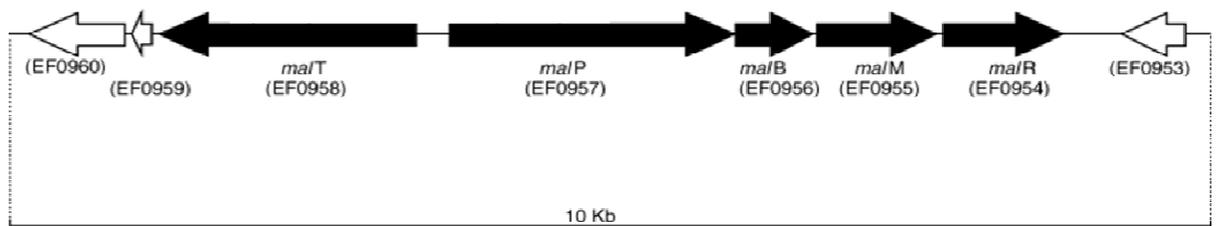


Figure 19 : Organisation génétique de l'opéron *malPBMR* chez *E. faecalis* [172].

L'analyse transcriptionnelle avec une sonde DNA correspondant à une région interne du gène *malT* a révélé la formation d'un ARNm de 2,5 kb. Ceci démontre que l'ARNm du *malT* est monocistronique. D'un autre côté, l'hybridation avec une sonde correspondant à une région d'ADN interne du gène *malP* révèle la transcription d'un ARNm de 5,2 kb, correspondant à la taille des 4 gènes *malPBMR* suggérant une co-transcription de ces gènes. (Fig. 19). Cet ARNm est plus fortement exprimé quand les bactéries ont poussé dans un milieu supplémenté avec du maltose par rapport au glucose [172] [180].

10.2.2.1. Le gène *malP*

La traduction du gène *malP* révèle qu'il code pour une protéine de 765 aa correspondant à une masse moléculaire de 88 kDa et présentant des homologies avec des maltose phosphorylases (MP) d'autres organismes. L'analyse de la séquence a assigné la maltose phosphorylase dans la famille 65 des glycosides hydrolase (GH65) [159]. Dans cette famille est incluse la MP de *L. brevis* qui catalyse la conversion du maltose avec une inversion de la configuration anomérique du carbone C1 pour donner du β -glucose-1-P et du glucose : maltose + Pi = β -D-glucose-1-P + glucose. Inversion de la configuration est également catalysée par les enzymes tréhalose phosphorylase (EC 2.4.1.64), kojibiose phosphorylase (EC 2.4.1.230) et une α,α -trehalase (EC 3.2.1.28) (<http://www.cazy.org>) [160]. Une recherche BLAST avec les séquences déduites des gènes *malB*, *malM* et *malR* a permis d'établir que ces protéines ressemblent respectivement à des β -phosphoglucomutases (β -PGM), l'aldose 1-epimerase (mutarotase), et un régulateur transcriptionnel. Pour MalB la plus forte homologie est observé avec la β -PGM de *L. Lactis* (64% identité et 78% similarité) et pour MalR avec le répresseur transcriptionnel de l'opéron maltose de *S pyogenes M1* (42% identité et 59% similarité) [181] [182]. La plus faible homologie est observé pour MalM, qui ressemble à l'aldose 1-epimerase de *L. lactis* (39% identité et 56% similarité) [180].

10.2.2.2. Le gène *malT*

Le gène *malT* code pour une protéine de 722 aa correspondant à une masse moléculaire de 78 kDa, elle présente une forte homologie avec des IICBA du PTS de la famille glucose. Forte homologie est observé avec une IICBA^{Glc} de *S. carnosus* qui est capable de compléter un mutant $\Delta ptsG$ (EIICB^{Glc}) de *E. coli*. Ce mutant va ainsi recouvrir la capacité de fermenter le glucose [172]. MalT montre une très forte homologie (64% d'identité) avec une EIICBA de *S. mutans* appelé PtsG, mais qui a été également identifié comme transporteur du maltose et par conséquent renommé MalT [129] [180] [182]. De plus

chez *S. mutans* MalT semble être impliqué dans le transport de maltotriose et maltotetraose, parce que le mutant *malT* pousse moins efficace en présence de ces deux maltodextrines [183].

10.2.2.3. Le gène *malR*

Le nom MalR est utilisé pour de régulateurs des différentes familles avec des fonctions différentes. Chez *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Clostridium butyricum*, *Streptomyces coelicolor*, et *S. lividans*, le métabolisme du maltose est soumis à une régulation négative par une protéine MalR de la famille LacI-GalR [173] [183]. Les membres de la famille LacI-GalR ont été montrés être des répresseurs transcriptionnels. Par contre chez *S. xylosus*, il a été observé que la protéine MalR agissait comme un élément de contrôle positif et que celle-ci ciblé le système de translocation du maltose, comme dans le cas de *L. lactis* [183] [184]. Chez *S. coelicolor* la disruption du gène *malR* aurait un effet de dérégulation catabolique par le glucose et donne lieu à une transcription constitutive du gène *malE* [183] [185].

Chez *E. faecalis*, la protéine MalR montre une homologie significative (29% identité et 50% similarité) avec CcpA, qui est impliqué dans la RC [186]. Ce régulateur transcriptionnel putative nommé bopD (biofilm on plastic surfaces) est indispensable pour la formation du biofilm [186]. Il serait impliqué dans les infections à entérocoques. Aussi, il pourrait jouer un rôle important pour intégrer des signaux nutritionnels, tel que la disponibilité de certains glucides, dans la voie de transduction du signal contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm [180] [186]. Les travaux de O'Toole ont montré que Crc (pour global carbon metabolism regulator) a une fonction similaire à BopD, fait partie d'une voie de transduction du signal nécessaire à la production du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* [187]. Le phénotype d'un mutant *crc* crée par O'Toole et al, présente une motilité déficiente des contractions du pili qui est provoqué par une diminution de la transcription du PilA [188]. La faible expression de *bopD* entraîne une dérégulation de la maltose phosphorylase (*bopA*) et dans une moindre mesure du gène de transport de sucre "*malT*" lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu contenant du maltose. Ce levé de l'inhibition peut conduire à une plus grande efficacité dans le transport et l'utilisation du maltose ainsi que le renforcement de la capacité de formation de biofilm [180]. Dans le mutant *malT*, la captation du glucose était presque inchangée (une valeur représentant 97,8% du taux observé pour la souche sauvage a été obtenu), tandis que celle du maltose a été presque complètement abolie (le taux d'absorption du maltose pour le mutant *malT* ne représentait que 2,9% de celle de la souche sauvage) montrant que chez *E. faecalis*, le maltose

est principalement transporté par un système utilisant l'enzyme EII (MaltT) du PTS [181]. Il est clairement établi que “*bopD*” est un élément de control négatif. En absence du maltose il est susceptible de réprimer à la fois l'opéron *bopABC*, et le transcrit divergent *maltT* [128] [180].

Chez *S. lividans* la région intergénique *malR-malE* porte deux sites de reconnaissance sur lesquelles se fixe la protéine MalRSI histidine-tagged. Le maltopentaose qui joue le rôle de l'effecteur a pour effet de relarguer cette protéine [185]. Chez *S. pneumoniae* l'effet du maltose sur les bandes shift a montré que la protéine MalR est libérée de son opérateur en présence du maltose [185]. Chez *S. pneumoniae* le régulateur transcriptionnel MalR se lie avec une grande affinité à un seul opérateur (CGCAAACGTTTGCGT) en amont des gènes codant une amyloamylase (MalM) et une phosphorylase de maltodextrine (MalP) et avec une plus faible affinité pour un autre opérateur situé en amont de l'opéron *malXCD* codant un ABC transporteur [185].

10.2.3. Rôle probable de la phosphoglucomutase dans le métabolisme du tréhalose chez *E. faecalis*

Un tiers des bactéries lactiques qui ont un faible % G/C et qui appartiennent à la sous branche de *Clostridium*, principalement *L. lactis* et *E. faecalis*, ont la capacité de fermenter le tréhalose [189]. Chez *L. lactis*, l'enzyme, β -phosphoglucomutase (β -PGM), qui catalyse la conversion réversible de β -D-glucose-1-P (D-G1P) en glucose-6-P, est essentielle dans le catabolisme à la fois du maltose et du tréhalose [190] [191]. Chez *L. lactis*, l'expression du gène β -PGM est induit par la présence du maltose ou du tréhalose dans le milieu de culture par contre la présence du glucose ou du lactose entraîne une RC [173]. Chez *L. lactis*, le gène de la β -PGM est localisé en aval du gène *trePP*, qui code pour une tréhalose-6'-P phosphorylase [175]. La même configuration est trouvée chez *E. faecalis*. Il existe ainsi une ORF en aval du gène *trePP* qui présente une homologie de séquence d'acides aminés de 78% avec la β -PGM de *L. lactis* (numéro d'accèsion GenBank™ CAA94734). Une colocalisation des gènes *trePP* et *pgm* a également été observé chez *Clostridium difficile* (contig 1496, Sanger Center) [190].

De plus, Andersson et Radström ont détectés deux activités TrePP et β -PGM chez *E. faecalis*. L'arbre phylogénétique fait apparaître *E. faecalis* et *L. lactis* dans le même groupe de micro-organismes qui hébergent des protéines hypothétiques qui sont similaires à TrePP. Dans le génome de *E. faecalis* existe une séquence d'ADN dont la séquence protéique est très proche de celle de TrePP (57% de similarité) [191]. Le Breton et collaborateurs ont proposé

que la voie d'utilisation du maltose chez *E. faecalis* est semblable à celle qui est impliqué dans le métabolisme du tréhalose chez *L. lactis*. Ils ont aussi proposé, que MalP ne correspond pas à une maltose phosphorylase (MP) mais plutôt à une maltose-6-P phosphorylase capable de cliver le maltose-6'-P + Pi en glucose-1-P + glucose-6-P. Par exemple chez *L. lactis* la tréhalose-6-P phosphorylase (TrePP) clive le tréhalose-6'-P en β -glucose-1-P plus glucose-6-P [172].

Donc il a été proposé que chez *E. faecalis* JH2-2 le maltose-6-P serait clivé de manière similaire par l'enzyme MalP (aussi appelé Map), dont le gène est orienté dans le sens opposé du gène de transport *maltT* [172]. En effet la croissance de *E. faecalis* sur du maltose conduit à l'induction de l'opéron *mal*. Cependant le tréhalose est un disaccharide qui est composé de deux molécules de glucose non réducteur et symétrique qui sont liés par une liaison glucosidique α -(1-1). La phosphorolyse de ce disaccharide phosphorylé conduit à la libération du glucose-1-P et du glucose-6-P [190]. En revanche le maltose contient une liaison glucosidique α -(1-4). La phosphorolyse du maltose-6'-P devrait se traduire par la libération du glucose-1,6-bisphosphate et du glucose ou, si le groupement phosphoryl durant la phosphorolyse est transféré vers la partie glucose réducteur, glucose-6-P et glucose-4-P seront formés. Hors le glucose-4-P n'est pas un intermédiaire métabolique qui a été référencé. Par contre le glucose-1-6-bisphosphate est uniquement requis comme cofacteur lors de la réaction enzymatique impliquant la phosphoglucomutase. Il est très peu probable que MalP transfère le groupement phosphoryl au position 6 de la partie du glucose réducteur (formation du maltose-6-P en place de maltose-6'-P). La phosphorolyse du maltose-6-P générerait du glucose-6-P et du glucose-1-P. Finalement il est possible que le maltose ne soit pas phosphorylé au cours de son transport par le PTS, comme été observé pour le transport du fucosyl- α -1,3-N-acetylglucosamine par un PTS de *L. casei* [191]. Le maltose arrivant dans la cellule en forme non-phosphorylée pourrait être clivé par MalP. A la lumière de ces incertitudes, nous avons entamé des recherches en utilisant des méthodes génétiques et biochimiques pour décrypter les voies métaboliques impliquées dans l'utilisation du maltose chez *E. faecalis*.

Deuxième partie :
Matériels et Méthodes

1. Souches utilisées

1.1. Les souches bactériennes

Les souches d'*E. coli* utilisées pour les clonages, transformations, expressions des gènes et productions de protéines sont la souche NM522 [192]. La souche sauvage *B. subtilis* qui est utilisé dans ce travail est une dérivée de la souche 168 dite de « Marburg », qui est prototrophe au tryptophane, la BSB168. Les différentes souches de *B. subtilis* ainsi que leurs mutants dérivés sont représentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Différentes souches et plasmide utilisés.

Name of Stain	Relevant characteristics	Reference or source
<i>E. faecalis</i> JH2-2 (TX4000)	Fus ^r Rif ^r ; plasmide libre dans la souche sauvage	[193]
JH-malP	JH2-2 avec pGhost8: insertion <i>malP</i>	Ce travail*
AB01	JH2-2 avec pUCB30bis: insertion <i>mapP</i>	Ce travail*
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	Laboratory stock
AM01	168 <i>malA</i> mutant deleté	Ce travail*
AM02	AM01 <i>yvdI</i> ::pMUTIN-I	Ce travail*
<i>E. coli</i>		
NM522	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM) (r_k⁻ m_k⁻)</i> [F' <i>proAB lacI^qZ ΔGM15</i>]; expression des proteines His-tagged	[192]
EC101	Kan ^r <i>supE thi (lacproAB) (F' traD36 proAB lacI^q ZDM15) repA</i> , used as host for pGhost8 constructs	[177]
Plasmides		
pGhost8	Origine replication thermosensitive, (Tet ^R)	[194]
pGh-malP	pGhost8 portant un fragment interne de <i>malP</i> de 594 bp	Ce travail*

pUCB30bis	Vecteur suicide <i>E. faecalis</i>	[195]
pUCB30bis-mapP	pUCB30bis portant un fragment interne de mapP 450 bp	Ce travail*
pUC18		
pUC-P		Ce travail
pAC7		[196]
pAC7-PptsH	pAC7 portant le promoteur <i>ptsH</i> et SD box de <i>B. subtilis</i>	Ce travail
pAC7-PptsH-malP	Expression du gène <i>mapP</i> à partir du promoteur <i>ptsH</i> de <i>B. subtilis</i>	Ce travail
pMUTIN4		[197]
pMUTIN-yvdl	pMUTIN4 portant un fragment interne de <i>yvdl</i> 494 bp de <i>B. subtilis</i>	Ce travail
pMAD	Origine de replication thermosensitive, (Erm ^R)	[198]
pMAD-malA	pMAD portant des fragments en amont et en aval de <i>malA</i> de <i>B. subtilis</i>	Ce travail
pQE30	vecteur expression His-tag	Quiagen
pQE30-malP	pQE30 portant l'allèle codant His-tagged maltose phosphorylase	Ce travail
pQE30-mapP	pQE30 portant l'allèle codant His-tagged maltose-6'-P phosphatase	Ce travail

Travail réalisé par *A. Hartke, Université de Caen, *Alexa Bourand, MICALIS, Grignon, ou *V. S. Blancato et G. Repizo de l'institut de biologie moleculaire et cellulaire de Rosario (Argentine).

1.2. Plasmides

Le plasmide qui a été utilisé pour réaliser les constructions génétiques nécessaires pour l'obtention des mutants par délétion chez *B. subtilis* est le pMAD [198]. Ce plasmide intégratif thermosensible, permet sur boites contenant du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), un criblage bleu/blanc (rapide) des bactéries qui ont perdu le plasmide facilitant ainsi la sélection des clones durant la construction des mutants potentiels (Fig. 20).

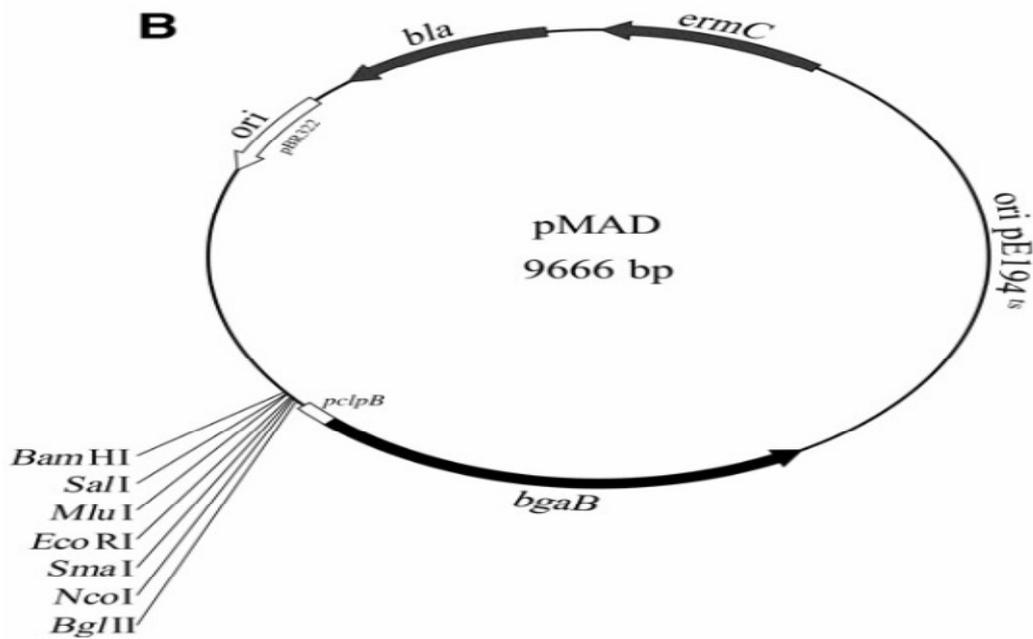


Figure 20 : Représentation schématique du vecteur pMAD [199].

Les vecteurs permettant la surexpression des différents gènes codant MapP et MalP avec His-tag ont été construits à partir du plasmide pQE30 (Qiagen) (fig. 21).

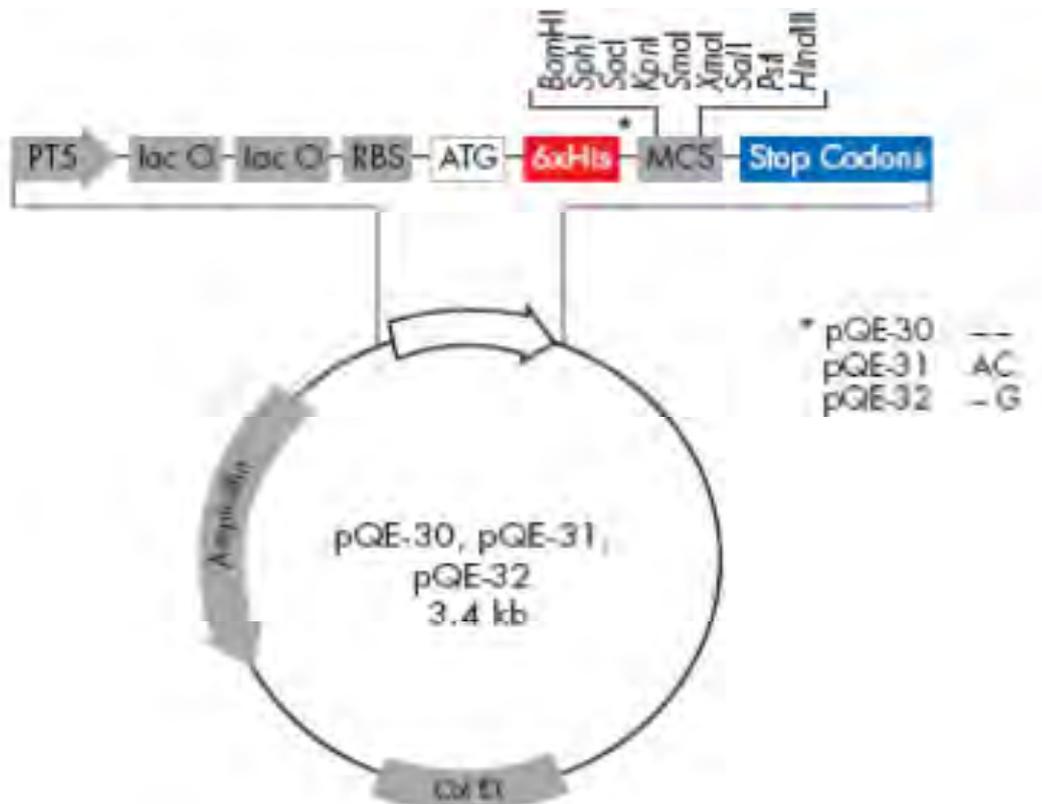


Figure 21 : Représentation schématique du plasmide pQE30.

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

1.3. Les conditions de croissance

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 2. Les souches de *E. faecalis* ont été cultivées régulièrement à 37 ° C et sans agitation. La croissance s'est déroulée dans des flacons Erlenmeyer scellés de 100 ml remplies de 20 à 50 ml de milieu Luria-Bertani (LB; Difco, New Jersey, Etats-Unis), contenant 0,5% de glucose. Les courbes de croissance ont été obtenues avec un milieu M17MOPS appauvri en source de carbone, qui a été préparé comme décrit précédemment [200]. Il a été complété avec soit 0,5% de glucose ou 0,5% de maltose. L'érythromycine et la tétracycline ont été ajoutés respectivement, dans le cas échéant, à des concentrations de 150 mg ml⁻¹ et 5 μ g ml⁻¹. Les souches de *B. subtilis* ont été cultivées en conditions aérobies à 37 ° C dans du milieu LB ou dans des milieux minimum salés, contenant 0,005% de tryptophane [201], et complété avec 0,5% de glucose ou 0,5% de maltose. Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes: 5 μ g ml⁻¹ de kanamycine et 0,3 μ g ml⁻¹ d'érythromycine. La transformation naturelle de *B. subtilis* a été effectuée en suivant le mode opératoire publié [202]. Les souches de *E. coli* ont été cultivées en aérobiose dans un milieu LB à 37 ° C et transformées par électroporation avec un appareil Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories). La croissance aérobie de *B. subtilis* et *E. coli* a été réalisée sous agitation à 250 tours par minute et le suivie de la croissance a été réalisé par la mesure de la DO600 avec un spectrophotomètre Novaspec II.

1.4. Conservation des souches

Les souches d'*E. coli*, sont conservées par congélation à -80°C, à partir de cultures en phase exponentielle de croissance obtenues en LB additionnées de glycérol (15%), avec l'antibiotique adéquat. D'autre part, les souches de *B. subtilis*, sont stockées sous forme de spores et conservées à 4°C

2. Méthode d'exploration du matériel génétique

2.1. Extraction de l'ADN chromosomique de *B. subtilis*

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant le Kit « GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit » (Sigma- Aldrich). Dans 1,5 ml de milieu LB les bactéries sont cultivées pendant une nuit sous agitation à 37 °C. La culture est centrifugée en 2 min à 13000 g, et le culot obtenu est utilisé selon les recommandations du fournisseur pour extraire l'ADN génomique. Le Kit GenElute se combine l'avantage d'un système à base de silice avec des micro-colonnes en éliminant le besoin de résines chères, la précipitation d'alcool et des composés biologiques organiques dangereux comme le phénol et chloroforme. Les bactéries sont lysées dans des agents chaotropiques pour assurer la dénaturation minutieuse des macromolécules.

2.2. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée à partir de souches d'*E. coli*. Une culture de 10 ml de la souche est réalisée sur la nuit en milieu LB contenant de l'antibiotique approprié. 4 ml de cette culture sont centrifugés à 7000 rpm pendant 5 min. L'extraction est ensuite réalisée selon le protocole pour le « Qiaprep-spin miniprep Kit ». L'ADN extrait est conservé à 4°C ou à -20°C.

2.3. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Deux types de PCR ont été appliqués dans ce travail: une PCR sur ADN génomique pour amplification des fragments utilisés lors des clonages et une PCR sur colonies (génomique et plasmidique) pour vérification des clones positifs. Le mélange réactionnel d'amplification (volume final : 50 µL) est composé de 5 µL de tampon de PCR concentré 10 X (NEB cutter), 25 µM de chaque dNTP, 1 µM de chaque amorce, d'ADN génomique et de la DNA polymérase. La polymérase utilisée est l'enzyme Pfu purifiée au sein du laboratoire à partir de la souche d'*E. coli* BL21 fournie par Franz Narberhaus (Université de Bochum, Allemagne ; la souche a été construite par Torsten Waldminghaus, Norvège).

Les amorces ont été dessinées à partir du génome des souches utilisées, disponible dans les banques de données NCBI. Les réactions ont été effectuées dans un thermocycler MasterCycler Gradient (Eppendorf). Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le programme comporte une dénaturation de 5 min à 95°C. L'amplification se compose de 30 à 35 cycles de: i) dénaturation de l'ADN, 30 secondes à

95°C; ii) alignement des amorces, 30 secondes à la température d'alignement (50°C à 62°C);
iii) élongation à 72°C à partir des amorces pendant 1 à 2 minutes (1 minute par kb).

2.4. Electrophorèse d'ADN

La qualité et la taille des produits de PCR, les ADN génomiques et plasmidiques ainsi que les produits de digestion sont analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Ces gels sont préparés à partir de tampon TAE 0,5X (Tris 20 mM, acétate 50 mM, EDTA 0,5 mM ; pH 8,3). La concentration en agarose des gels varie de 0,5 à 1,5% suivant la taille des fragments d'ADN considérés. Pour permettre la visualisation de l'ADN sous UV (365 nm), du bromure d'ethidium (BET) à 0,5mg/ml est ajoutée. Avant qu'un volume d'échantillon à analyser (5 µL) ne soit déposé dans les puits, il est additionné de 5 µL du tampon d'électrophorèse (glycérol 50%, bleu de bromophenol 0,25%). Ensuite il est soumis à une migration électrophorétique horizontale. Les paramètres de migration (voltage, ampérage) sont adaptés en fonction de la taille du gel et de la résolution désirée.

2.5. Purification de L'ADN

Après séparation sur gel d'agarose, la partie du gèle contenant le fragment d'ADN correspondant à la taille attendue est découpé sous lumière UV de faible énergie puis coupé et déposés dans un tube Eppendorf. La purification est réalisée selon le protocole du Kit « Wizard^R SV Gel and PCR clean-Up System » de PROMEGA, qui utilise le principe d'adsorption spécifique de l'ADN sur une membrane de silice après dissolution de l'agarose à 55°C, les fragments ont été purifiés avant les ligations. Ce kit permet aussi de purifier directement en solution les fragments d'ADN obtenus par PCR ou par digestion par des enzymes de restriction. La taille et la quantité du fragment de l'ADN purifié sont estimées par comparaison avec la co-migration d'un marqueur de taille de poids moléculaire « 1 kb + ladder » (Invitrogen).

2.6. Digestion et ligation

Les enzymes de restriction utilisées sont fournies par New England Biolabs, Les réactions de restriction sont réalisées dans les milieux réactionnels suivants :

- tampon de restriction 10X 5 µL
- ADN plasmidique ou fragment PCR 0,5 à 5 µg
- endonucléase 1 µL
- H₂O q.s.p. 50 µL

Les enzymes sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs. En général, le milieu est incubé 2 heures à 37°C. Lorsque cela a été nécessaire, l'enzyme de restriction a été inactivée par la chaleur ou éliminée par une purification de l'ADN sur une colonne QIAquick (Qiagen) qui permet d'éliminer les enzymes, les sels et les oligonucléotides libérés lors de la coupure. La ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur est assurée par la DNA ligase du phage T4 « Invitrogene, Promega », qui crée un pont phosphodiester entre le groupement phosphate de l'extrémité 5' et le groupement hydroxyl de l'extrémité 3' de l'ADN. Dans le milieu réactionnel sont ajoutés 0,1 volume de tampon ligase concentré 10 fois, 1 à 2 unités de T4 DNA ligase, l'ADN vecteur et l'ADN insert (dans des proportions de l'ordre de 1/5 à 1/10) (50 ng de vecteur) et H₂O q.s.p. 20µl. La réaction est réalisée à 4°C pendant une nuit, ou 2 heures à température ambiante. Le milieu de ligation est ensuite utilisé pour transformer des bactéries compétentes selon le protocole décrit précédemment.

3. Construction des mutants et des vecteurs

Les différentes amorces utilisées dans ce travail et les sites des enzymes de restriction (soulignés) sont répertoriés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées dans cette étude.

Name	Sequence	Restriction site
EfMalP_Up	AAAGGATCCATGAAACAAATCAAAC	BamHI pQE30
EfMalP_Lo	AGGGGTACCTTAAACATGAACTTCTTC	KpnI
Ef0960BamF	GGGGGATCCATGAATCTTTTAAACAATCAATAC	BamHI pQE30
Ef0960SalR	GCGCGTCGACTTATTTTAGTTGAATGAGTAAGCC	Sall
mapPForBam	GGGGGATCCATGAATCTTTTAAACAATCAATACTC	BamHI
mapPRevSac	TGAGAGCTCAGCGCTTTTCTTATTTTAGTTGAATGAG	SacI
EfMalPmut_U	CATAAGCTTTCGCACCATTTCTGTG	HindIII
EfMalPmut_L	GGGAATTCTGTTGTGCCTACATATACAC	EcoRI
VerifMalP	CCCATCTAAATCAAACAAAACG	dans pgm
MapPBamF	AGAGGATCCATTAATAAATAATTAGAGGAG	mutant BamHI
MapPEcoR	TAGGAATTCATAGGCAAAACCTGTACAG	EcoRI

EfmapPconf	CCGATAGTCAGTGATCATTGTC	dans mapP
PU	TGTAACGACGGCCAGT	-
PR	CAGGAAACAGCTATGACC	-
malA1ForBam	AGTGGATCCAGTGACTACATCATTGCAAGC	BamHI
malA1RevKpn	CTGAGGTACCAGTTCTTCGAGCTGCATATCAGATC	KpnI
VerifMalAFor	GGGATCGAAGACCGGATGGCGC	-
VerifMalARev	GGCCAGCGCGTCGATTCCAAGG	-
yvdIForHind	CATCAAGCTTCCGTGTGGGAATTCGGCG	HindIII
yvdIRevBam	ATAAGGATCCAAAGCGCTTGTACCGCGAGC	BamHI
ptsHPromForEco	GAGGAATTCAAGATATTGTGAAGATTGAAA	EcoRI
ptsHPromRevBam	CATGGATCCCATTCTCTTTAACTTAAAG	BamHI

3.1. Construction d'une souche de *E. faecalis* défectueuse pour le gène *malP*

Un mutant déficient pour la maltose phosphorylase a été construit par simple recombinaison homologue, en transformant la souche *E. faecalis* JH2-2 avec le vecteur thermosensible pGhost8 [200] portant un fragment interne du gène à muter. Pour cela, un fragment interne du gène *malP* a été amplifié par PCR en utilisant l'ADN chromosomique de *E. faecalis* JH2-2 comme matrice et la paire d'amorces EfMalPmut_U / EfMalPmut_L (Tableau 3). L'amplimère a été digéré avec des enzymes de restriction appropriées (HindIII et EcoRI) et ligaturé dans pGhost8 coupé avec les mêmes enzymes.

Le plasmide résultant a été appelé pGH - MalP et utilisé pour transformer *E. coli* EC101 (Tableau 2). Le plasmide pGH - MalP purifié a été électroporé dans *E. faecalis* JH2-2 en suivant le protocole de Friesenegger [203]. L'intégration du plasmide dans le génome a été forcée selon le protocole de Maguin [194]. Les transformants sont cultivés pendant une nuit à la température permissive de 30 ° C dans du milieu LB contenant du glucose et de la tétracycline 5 µg ml⁻¹ pour le maintien de la pression de sélection. Cette culture a été utilisée pour inoculer le milieu de culture (dilution 1:500) qui a été incubée à la température restrictive (37 ° C), empêchant ainsi la réplication du plasmide.

Lorsque la culture a atteint une DO₆₀₀ de 0,5, des dilutions en série ont été étalées sur milieu LB solide contenant du glucose et de l'antibiotique et incubées à 37 ° C. Un seul clone

a été isolé et l'interruption de MalP a été confirmée par son phénotype de maltose négatif et par PCR. Le mutant *malP* déficient a été appelé JH-malP (Tableau 2).

3.2. Construction d'un mutant *E. faecalis mapP*

Un mutant déficient en maltose-6'-P phosphatase a été construit, en interrompant le gène *E. faecalis mapP*, par simple recombinaison en utilisant le vecteur suicide pUCB30bis [200] (Tableau 2). Un fragment interne du gène *mapP* a été amplifié en utilisant l'ADN chromosomique de *E. faecalis* JH2-2 comme matrice et la paire d'amorces MapPBamF / MapPEcoR (tableau 3). L'amplimère a été digéré avec les enzymes de restriction BamHI et EcoRI et ligaturé dans pUCB30bis qui a été coupé avec les mêmes enzymes. Le plasmide résultant a été utilisé pour transformer *E. faecalis* JH2-2 par électroporation [208] et un clone résistant à l'érythromycine a été isolé et appelé AB01 (Tableau 2). L'intégration correcte du plasmide a été vérifiée par PCR en utilisant l'oligo EfmapPconf en combinaison avec un primer du vecteurs (Tableau 3).

3.3. Construction d'un mutant *B. subtilis* déléte pour le gène *malA*

Afin de construire un mutant *malA* de *B. subtilis* nous avons amplifié par PCR un fragment de 2150 pb couvrant la totalité du gène *malA* et une portion des régions qui se trouve en amont et en aval du même gène. Pour cela nous avons utilisé comme matrice l'ADN chromosomique de *B. subtilis* et la paire d'amorce malAForBam et malAREvKpn (tableau 3). Le produit de PCR a été coupé avec BamHI et KpnI et cloné dans le plamide pUC18 lui même coupé avec les mêmes enzymes. Le plasmide obtenu a été digéré avec l'enzyme de restriction ClaI, qui a conduit à l'excision d'un fragment de 328 pb qui est localisé au milieu du gène *malA* et a également introduit un décalage dans le cadre de lecture (frame shift). L'insert ainsi raccourcie du pUC18 a été coupé avec BamHI et KpnI et cloné dans le vecteur pMAD [198] qui a été digéré avec les mêmes enzymes. Le plasmide résultant a été utilisé pour transformer la souche sauvage *B. subtilis* 168.

Le plasmide pMAD contient une origine de répllication pE194ts Gram+ thermosensible qui permet la répllication du plasmide seulement à des températures inférieures à 32°C. Afin d'obtenir un mutant *malA* par double recombinaison nous avons suivi le protocole décrit précédemment [199]. La délétion correcte et l'insertion d'une mutation, par décalage du cadre de lecture dans le gène *malA*, a été confirmé en effectuant une amplification PCR avec la paire d'amorces VerifMalAFor et VerifMalAREv dans une des souches isolées (Tableau 3).

Ceci a conduit à l'amplification d'un fragment de 589 pb à la place du fragment de 1012 pb qui est obtenu avec la souche sauvage 168. Cette souche a été appelée AM01.

3.4. Construction d'un double mutant de *B. subtilis mala mdxE*

Chez *B. subtilis*, dans le but d'inactiver l'un des composants membranaires du transporteur de maltodextrines, qui permet aussi l'absorption du maltose avec une faible affinité, un fragment d'ADN interne du gène *mdxE* a été amplifié par PCR avec des amorces *mdxE* ForHind et *mdxE* RevBam. L'amplimère a été digéré avec HindIII et BamHI et cloné dans le vecteur pMUTIN4 [197] qui est coupé à son tour par le couple enzymes fournissant ainsi pMUTIN-*mdxE*. Le mutant *B. subtilis* AM01 a été transformé par ce plasmide pour obtenir le double mutant AM02 (*mala mdxE*) (Tableau 2), dans lequel la transcription des gènes en aval du gène *mdxE* interrompu est sous le contrôle du promoteur Pspac qui est inductible par l'IPTG. La bonne intégration du plasmide a été confirmée par PCR.

3.5. Complémentation du mutant de *B. subtilis mala-mdxE* avec *E. faecalis* MapP

Afin de placer le gène *mapP* d'*E. faecalis* sous le contrôle du promoteur constitutif *ptsH* de *B. subtilis*, le promoteur P*ptsH* et la boîte Shine Dalgarno ont été amplifiés avec des amorces spécifiques *ptsHPromForEco* et *ptsHPromRevBam* contenant les sites de restriction EcoRI / BamHI, puis cloné dans le vecteur pAC7 pour fournir le plasmide pAC7-P*ptsH*. Par la suite, le gène de *E. faecalis* *mapP* a été amplifié en utilisant des amorces *mapPForBam* et *mapPRevSac* et inséré dans les sites BamHI / SacI du vecteur pAC7-P*ptsH* pour générer le plasmide pAC7-P*ptsH*-MapP (Tableau 2). Ensuite, ce plasmide a été inséré par double recombinaison homologue dans le locus *amyE* du chromosome de *B. subtilis* 168. En effet pAC7 porte deux fragments de la région *amyE* permettant une double recombinaison. Les transformants ayant intégré par recombinaison homologue le gène de résistance à la kanamycine ont été sélectionnés. L'insertion dans le locus *amyE* a été confirmée par un phénotype amylase-négatif de cellules étalées sur gélose LB contenant de l'amidon soluble [204].

4. Methodes concernant les cellules

4.1. Préparation de cellules compétentes d'*E. coli*

Une préculture de la souche d'intérêt réalisée sur la nuit est utilisée pour ensemercer 500 mL de milieu LB (dilution 1/100) contenant les antibiotiques adéquats. Les bactéries sont ensuite cultivées à 37°C sous agitation. La croissance bactérienne est suivie jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ d'environ 0,4 – 0,6. La culture est gardée sur la glace pendant 15 à 30

min puis centrifugée pendant 15 min à 5000 rpm à 4 °C. Le culot est repris dans 500 ml puis dans 250 ml d'eau froide stérile puis centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm. Le culot est resuspendu dans 20 ml de glycérol 10% froid, puis centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm. Le culot est ensuite repris dans un volume final de 2 ml de glycérol 10%. Des aliquots de 100 µl sont conservés à -80°C.

4.2. Électroporation de cellules compétentes d'*E.coli*

Cette technique permet d'introduire un fragment d'ADN exogène dans une cellule bactérienne par un choc électrique. La succession de lavage permet d'éliminer toute trace de sels qui pourraient diminuer la résistance électrique du milieu et créer un arc électrique. Dans un tube Eppendorf stérile préalablement mis dans la glace, 0,5 µl d'ADN plasmidique ou 5 µl du produit de ligation est mélangé avec 50 µl de cellules électrocompétentes. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation froide (distance des électrodes est de 0.2 cm), puis déposé dans la glace pendant quelques minutes. Le plasmide transformant pénètre dans la cellule grâce à un choc électrique très bref mais d'une grande intensité à l'aide du Gene Pulser (Bio-Rad : 2,5 kV, 25 µF, 100 Ω). Après électroporation les cellules sont immédiatement resuspendues dans 1 ml de LB puis incubées 1 h à 37°C, pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide. Les cultures (10 µl, 100 µl et 200 µl) sont ensuite étalées sur gélose LB contenant l'antibiotique approprié, le plus souvent c'est de l'ampicilline à 100 µg/ml. Les transformants apparaissent après 24 à 48 h d'incubation à 37 °C.

4.3. Préparation des cellules compétentes de *B. subtilis*

Ensemencer à partir d'une préculture de nuit de *B. subtilis*, 2ml de MG1 et incuber à 37°C avec agitation (170 rpm) pendant 4 h 30 min ou 5 h jusqu'à ce que la culture soit trouble. Diluer 10 fois dans du MG2 (mettre 100 µl de la culture MG1 dans 1ml de MG2), et incuber pendant 1 h 30 min à 37°C avec une forte agitation. Aliquoter la culture MG2 en raison de 200 µl par tube Eppendorf et utiliser directement pour la transformation ou suivre le protocole pour congeler les cellules compétentes.

4.4. Transformation des cellules compétentes de *B. subtilis*

La transformation de *B. subtilis* utilise sa compétence naturelle en début de phase stationnaire. *B. subtilis* est rendue compétente lors d'une croissance en milieu minimum enrichi MG1 (composition décrit dans le paragraphe suivant), suivie d'une dilution dans un milieu carencé MG2. Dans un tube Eppendorf, mettre 200 µl de cellules compétentes plus 1

ou 5 μ l d'ADN et incuber pendant 20 à 30 min au bain marie à 37°C. Pour les transformations avec de l'ADN chromosomique ajoutées différentes quantités d'ADN (1 ou 2 μ l d'ADN pur, 1 ou 2 μ l d'ADN dilué 10 fois, 1 ou 2 μ l d'ADN dilué 100 fois) puis étaler les 200 μ l sur une gélose LB contenant l'antibiotique adéquat, et incuber à 37°C.

4.5. Milieux Minimums pour préparer des cellules compétentes de *B. subtilis*

MM 1x: (NH₄)₂SO₄ 20 g/l, citrate de sodium (trisodique) 10g/l, K₂HPO₄ 140g/l, KH₂PO₄ 60g/l, MgSO₄ x 7 H₂O 2,0 g/l, pH7

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

MG1: 19 ml MG, 0,1 ml hydrolysate de caséines 5 %, 0,4 ml extrait de levure 5%, 0,2 ml tryptophane 2.5 mg/ml, 0.2 ml auxotrophes éventuelles 5 mg/ml

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

MG3: 4 ml H₂O, 500 μ l MM 1x, 50 μ l EGTA 100 mM, 100 μ l MgCl₂ 1 M (rajouté extemporanément)

Tous les milieux (MG1, MG2 et MG3) sont préparés puis conservés à -20°C. Lors de la préparation des cellules compétentes, décongeler les milieux en les mettant à 4°C.

5. Criblage des transformants ou mutants

5.1. Résistance aux antibiotiques

Des transformants obtenus avec des plasmides portant un gène de résistance ont été sélectionnés en faisant pousser les bactéries sur LB contenant l'antibiotique approprié.

5.2. Test de criblage bleu/blanc

Le criblage bleu/blanc est utilisé lorsque le plasmide réplcatif utilisé porte le gène codant pour le fragment α de la β -galactosidase ou lorsque le plasmide intégratif utilisé contient le gène *bgaB* qui code pour la β -galactosidase de la bactérie *Geobacillus stearothermophilus* (comme le plasmide pMAD). Le test bleu/blanc avec le fragment α est communément utilisé pour vérifier la présence ou non d'un insert dans le site de clonage. En revanche, le criblage bleu/blanc avec des plasmides portant le gène *bgaB* est utilisé pour la construction de mutants par délétion de gène (fig. 22) afin de vérifier la présence et/ou l'absence du vecteur et il permet aussi d'identifier des transformants contenant des plasmides avec insertion [205].

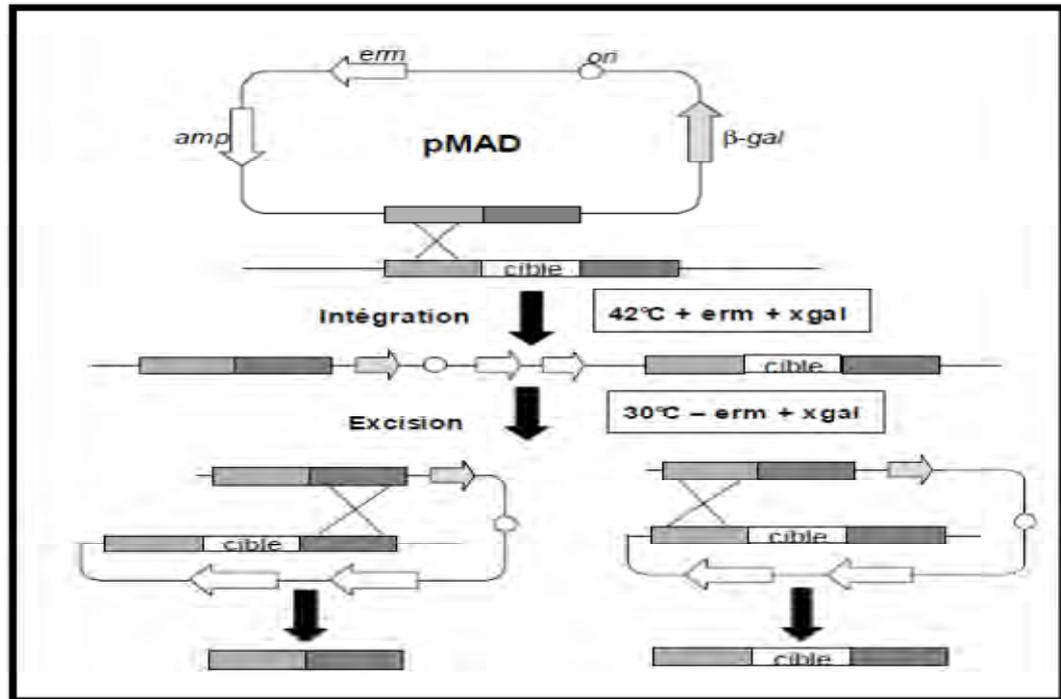


Figure 22 : Protocol de mutagenese par le vecteur pMAD [205].

5.3. Vérification des clones par PCR

Les PCR sur colonies ont été réalisées pour identifier les mutants recherchés. Cette méthode consiste à utiliser les amorces de clonage ou des amorces situées à l'extérieur des sites de clonage du plasmide ou de l'ADN chromosomique. Par la suite, une électrophorèse sur gel d'agarose permettra de cribler les clones positifs qui ont intégré le gène d'intérêt.

5.4. Vérification des clones par séquençage

Les différents produits de PCR portant les probables mutations recherchées ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genomics. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences présentes dans les banques de données suivantes :

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/geblast.cgi?gi=5513>

6. Methodes concernant les proteines

6.1. Purification de la maltose-phosphorylase et de la maltose-6-P phosphatase de *E. faecalis* fusionnées à 6 résidus histidyles

Afin de purifier la maltose-phosphorylase et la maltose-6'-P phosphatase, les gènes codants MalP et MapP ont été amplifiés par PCR en utilisant comme matrice l'ADN chromosomique de *E. faecalis* JH2-2 et les deux couples d'amorces respectivement

EfMalP_Up / EfMalP_Lo et Ef0960BamF / Ef0960SalR, (tableau 3). Les amplimères ont été coupés avec les enzymes de restriction appropriées (BamHI / KpnI ou BamHI / SalI) et clonés dans le vecteur d'expression pQE30 His-tag qui est digéré avec les mêmes enzymes. La séquence correcte des deux gènes a été confirmée par séquençage de l'ADN et la purification des protéines His-tag a été réalisée comme décrit précédemment [206].

6.2. Production de MapP et MalP-histidine-tagged dans *E. coli* NM522 et leurs purification

De 500 à 1000 mL de milieu LB, contenant les antibiotiques appropriés, sontensemencés à partir d'une préculture saturée de bactéries NM522 transformées par les plasmides (pQE30), exprimant les protéines d'intérêt. La croissance bactérienne est réalisée sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne une OD600 comprise entre 0,5 et 0,6. Lorsque cette absorbance est atteinte, 1,5 mL de la culture sont alors prélevés, centrifugés à 13000 g pendant 1 minute et le culot obtenu est conservé dans la glace. La culture est alors additionnée d'IPTG à une concentration finale de 0,5 ou 1 mM et l'incubation est poursuivie sous agitation selon la protéine à purifier entre 20°C et 37°C, pendant 3 heures.

6.3. Purification de protéines par chromatographie d'affinité

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

6.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford [207]. Une courbe étalon est réalisé avec différentes concentrations connues de BSA (Bovine Serum Albumin) et de la solution « Protein Assay » 1X. Les échantillons protéique (de 2 à 10 μ L) sont mélangées avec 1 ml de solution de « Protein Assay » 1X. 10 μ L des différents extraits protéiques sont également mélangés dans 1 ml de solution de « Protein Assay » 1X. L'absorbance des échantillons « Protein Assay + BSA » et « Protein Assay + extraits protéiques » est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre. La concentration de la protéine d'intérêt est obtenue par comparaison au courbe étalon.

6.5. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide SDS

L'électrophorèse d'un mélange des protéines sur gel de SDS/polyacrylamide permet leur séparation en fonction de leur poids moléculaire. La concentration en polyacrylamide du gel est choisie selon la taille attendue de protéines à séparer et est normalementt entre 10 et 15%. Les protéines sont traitées en conditions dénaturantes (SDS 0,1% et le β -mercaptoéthanol 1%), selon la méthode de Laemmli [208]. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Ce traitement permet la dissociation des sous-unités des protéines oligomériques. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits du gel, le tout est déposé dans le bac d'électrophorèse dans lequel est ajouté du tampon de migration (Tris 0,025 M, glycine 0,2 M, SDS 0,1%). La migration est effectuée jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol présent dans le tampon Laemmli.

6.6. Coloration des protéines

Les gels d'électrophorèse sont colorés au bleu de Coomassie. Le gel de polyacrylamide est plongé pendant 1 à 2 h sous agitations, dans un bain de coloration de composition : 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie (Brillant blue R, Sigma), d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 7% (v/v). Puis décoloré dans une solution de décoloration constituée d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v).

7. Dosages spectrophotométriques des activités de la maltose phosphorylase et de la maltose-6'-P phosphatase

L'activité de l'enzyme maltose phosphorylase a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'une réaction couplée faisant intervenir l'hexokinase et la glucose-6-P déshydrogénase qui utilise comme cofacteur du NADP/NADP(H). Dans ce test bi-enzymatique le glucose, formé à partir du maltose par la maltose phosphorylase, est transformé en glucose-6-P par

l'intermédiaire de l'hexokinase plus de l'ATP. La seconde réaction permet l'oxydation du glucose-6-P en 6-phosphogluconate par une glucose-6-phosphate déshydrogénase. La formation du NADPH, qui accompagne cette oxydation, a été mesurée à 340nm permettant ainsi de déterminer la vitesse de la formation du glucose initial par la maltose phosphorylase.

Pour déterminer l'activité de l'enzyme maltose phosphorylase, nous avons utilisé le « glucose assay reagent » (30 mg ml⁻¹) de Sigma-Aldrich. Le suivi de la formation du NADPH a été effectué avec un spectrophotomètre Kontron Bio-Tek à l'aide du programme AutoRate. Le mélange réactionnel contenait 500 µl du glucose assay reagent, 500 µl de tampon phosphate 50 mM, pH 7,0, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de maltose et 20 µl de la maltose phosphorylase purifié (1,2 mg ml⁻¹). Lorsque le substrat maltose a été remplacé par le maltose-6'-P dans le mélange réactionnel, aucune augmentation de l'absorption à 340 nm n'a été observée. Cependant, lorsque 40 µl de la maltose-6'-P phosphatase (MapP, 0,8 mg ml⁻¹) a été ajoutée au mélange réactionnel, contenant du maltose-6'-P, une augmentation de l'absorption à 340 nm a été observée qui était similaire à celle obtenue avec le maltose et la maltose-phosphorylase.

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la MapP, les conditions de dosage ont été optimisées. Ainsi le glucose assay reagent a été remplacé avec 5 µg de la glucose deshydrogenase NAD-dépendant (Sigma). Le mélange réactionnel contient maintenant 30 mM de NAD pour un volume total de 450 µl. Une gamme de concentration croissante du substrat maltose-6'-P variant de 0,22 à 30 mM a été réalisée. Ce système de dosage réagit plus vite à la formation du glucose permettant ainsi une détermination plus précise des paramètres cinétiques de la MapP. La vitesse de la dephosphorylation du maltose-6'-P a été déterminée à partir de l'équation suivante : $v = [E] \cdot k_{cat} \cdot [S] / (K_M + [S])$ où v est la vitesse de la réduction du NAD en NADH, $[E]$ est la concentration de MapP, $[S]$ est la concentration du maltose-6'-P (ou maltose), k_{cat} et K_M sont les constantes cinétiques de l'enzyme à déterminer.

8. Détection de l'activité dephosphorylante de MapP par le test du vert de malachite

Le phosphate inorganique en solution qui est produit au cours de l'activité catalytique de la MapP est quantifié par la méthode colorimétrique au vert de malachite [209]. Les expériences de déphosphorylation ont été réalisées dans des mélanges d'essai de 650 µl contenant 50 mM de Tris / HCl à pH 7,4, 5 mM de MgCl₂ et 2 mM de substrat (sucres phosphorylé). Le réactif est composé d'ammonium molybdate, de vert de malachite et de Tween-20, le tout à très bas pH. Le mélange a une coloration initiale orangée. La présence de phosphate inorganique libéré dans le milieu d'incubation suite à la réaction enzymatique

permet d'obtenir une coloration verte. La réaction débute avec l'ajout de MapP et les échantillons ont été mis en incubation à 37 ° C pendant des périodes de temps diverses. Pour chaque composé phosphorylé la quantité de MapP (allant de 40 µg à 4 mg) a été ajustée de telle sorte qu'elle conduit à la formation de quantité de phosphate détectable après un temps d'incubation de 6 minutes. Des aliquotes de 100 µl ont été prélevés après 0, 1,5, 3, 6, 10 et 20 min d'incubation et immédiatement mélangées avec 25 µl du réactif vert de malachite. La réaction est arrêtée lorsque le réactif colorimétrique est ajouté au mélange. Les échantillons ont été conservés pendant 20 min à température ambiante avant de rajouter 375 µl d'eau. Par la suite la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm. Dans le Tableau 5, les activités mesurées au dépend des différents composés phosphorylés sont exprimées en fonction de l'activité mesurée pour le maltose-6'-P, qui correspond au standard de 100%.

9 Analyse par spectrométrie de masse des composés phosphorylés traités avec MapP

Des solutions, contenant les divers sucres phosphorylés et les dérivés de sucres, énumérés dans le tableau 2, à une concentration de 2 M ont été préparées. 5 µl de ces solutions ont été ajoutés soit à 40 µl de la MapP purifiée (0,8 mg ml⁻¹, dialysées contre 20 mM de bicarbonate ammonium) ou à 40 µl de bicarbonate d'ammonium 20 mM et incubées pendant 2 h à 37°C. Les échantillons ont ensuite été lyophilisés et remis en suspension dans 20 µl d'eau avant que des aliquots de 1 µl ne soient analysés par spectrométrie de masse.

10 Études de transport du maltose avec le maltose-[14C] *

Des tests de transport avec le [¹⁴C]-maltose ont été réalisés comme décrit précédemment [210]. Les cellules de la souche sauvage *E. faecalis* JH2-2 et les mutants *malP* et *mapP* ont été cultivées dans 25 ml de milieu LB contenant 0,5 % de maltose jusqu'à l'obtention d'une DO600 de 0,5. Les cellules ont été centrifugées et lavées deux fois avec du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, contenant du MgCl₂ 10 mM. Les cellules ont été remises en suspension dans un volume de 50 mM de tampon Tris-maléate, pH 7,2, contenant 5 mM de Mg Cl₂ pour atteindre une densité cellulaire qui correspond à une DO600 de 10. Pour le dosage du maltose transporté, 50 µl de la suspension cellulaire a été diluée avec 0,5 ml du tampon de transport (le tampon de remise en suspension contenait 1% de peptone) et pré-incubé 1 min à 37°C.

La réaction de transport a été démarrée par addition de 60 µl d'une solution de [¹⁴C]-maltose qui est composé de 50 µl de maltose à 0,5 mM plus 6 µl [¹⁴C]-maltose (0,1 mCi ml⁻¹) (correspondant à 1,33 x 10⁶ cpm). La concentration finale du maltose dans le mélange

d'essai est de 55 μM . Des aliquotes de 100 μl ont été retirés après 0,33, 0,66, 1,5, 2,5 et 5 min et mélangés avec 5 ml de tampon de remise en suspension à froid avant d'être filtrés par des filtres NC45 de 25 mm de diamètre et avec des pores de 0,45 μm de taille (Schleicher und Schuell, Dassel, Allemagne) et on les lave deux fois avec 5 ml de tampon de remise en suspension. Les filtres ont été séchés et la radioactivité retenue a été déterminée par comptage à scintillation liquide.

11 Séparation et caractérisation des composés radioactifs chargés négativement accumulés pendant l'absorption du [^{14}C]-maltose *

La souche sauvage de *E. faecalis* et les deux mutants ont été cultivées comme décrit ci-dessus et un mélange d'essai de 275 μl de [^{14}C]-maltose a été préparé pour chaque souche. Les cellules ont été incubées pendant 5 min en présence de [^{14}C]-maltose avant que des aliquotes de 100 μl soit prélevés et filtrés à travers un filtre avec des pores de 0,45 μm de taille. Un autre aliquote de 60 μl a été rapidement centrifugé et le surnageant et le culot cellulaire ont été séparés. Les cellules ont été remises en suspension dans 100 μl d'eau bouillante. Les surnageants et les extraits cellulaires ont été chargés sur une colonne échangeuse d'anions Dowex AG1-X8 de 1 ml qui a été lavée trois fois avec 2 ml d'eau afin d'éliminer les composés non chargés ou chargés positivement. Les fractions de lavage et le « flow through » ont été recueillis, rassemblés et la radioactivité a été déterminée par comptage à scintillation liquide. Les composés chargés négativement ont été élués trois fois avec 1,5 ml 1 M LiCl et la radioactivité dans les fractions combinées a été déterminée par comptage à scintillation liquide.

Afin de vérifier si le traitement des composés radioactifs chargés accumulés par le mutant *mapP* avec la maltose-6'-P phosphatase allait convertir une partie d'entre eux en des composés non chargés, un extrait cellulaire de la souche *mapP* a été préparé comme décrit ci-dessus. Un aliquot de 180 μl du mélange réactionnel de transport a été retiré et les cellules ont été remises en suspension dans 300 μl d'eau bouillante. Pour un aliquot de 100 μl de l'extrait cellulaire 50 μl de Tris/HCl, pH 7,4 et 20 μl de MgCl_2 100 mM ont été ajoutés. Pour le second aliquot de 100 μl , nous avons ajouté 50 μl de MapP purifiée dissoute dans Tris/HCl, pH 7,4 (0,8 mg ml^{-1}) et 20 μl de MgCl_2 100 mM. Les échantillons ont été incubés pendant 1 h à 37°C avant que les composés radioactifs chargés et non chargés soit déterminés comme décrit ci-dessus.

Troisième partie :
Résultats et discussion

1. Objectifs du travail

Par rapport au transport du maltose deux types de PTS ont été distingués : *B. subtilis* utilise une EIICB^{Mal} (appelée MalP ou GlvC) qui chez *E. coli* fonctionne en jonction avec l'EIIA^{Glc}, par contre chez *B. subtilis* le domaine EIIA^{Glc} du PtsG n'est pas requis pour l'absorption du maltose [211]. Aussi l'opéron porte, en plus du gène codant pour la perméase MalP, le gène qui code pour une α -(1,4)-P-glucosidase (MalA aussi appelé GlvA) qui est classé dans la famille 4 des glycosylhydrolases EC 3.2.1.122 [212]. Le maltose-6'-P qui est formé lors de son transport par le PTS est hydrolysé en glucose-6-P et en glucose par une maltose-6'-P hydrolase. Des opérons similaires se trouvent chez *Fusobacterium mortiferum* et *C. acetobutylicum* [134] [213] [214]. Par contre chez *E. faecalis* JH2-2, *S. mutans*, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* le transport du maltose s'effectue via une EIICBA appartenant à des transporteurs PTS (MalT) de la sous famille du glucose [172] [124] [125] [128]. Chez la plus part des entérocoques et des streptocoques le gène *maltT* (EFT41760 chez *E. faecalis* JH2-2) est suivi par un gène codant pour une protéine de fonction inconnue. Contrairement à *B. subtilis* et d'autres bactéries qui transportent le maltose via un PTS, *E. faecalis* et les streptocoques ne contiennent pas une maltose-6'-P hydrolase, qui, dans la première étape du catabolisme, va cliver le maltose-6'-P en glucose-6-P et du glucose. Par conséquent la question qui se pose est comment ces microorganismes utilisent le maltose-6'-P? Chez *L. lactis* le tréhalose-6-P qui est formé au cours de son transport par le PTS est clivé par une tréhalose-6-P phosphorylase (qui présente une forte similarité vis avis de la maltose phosphorylase) en glucose-1-P et en glucose-6-P [190]. Par conséquent, une phosphorylation du maltose-6'-P par une maltose-6'-P phosphorylase a été proposé pour *B. subtilis*. Néanmoins, comme déjà expliqué, la phosphorylation du maltose-6'-P donnera du glucose-1,6-bisphosphate plus glucose ou du glucose-6-P et glucose-4-P. Un transport du maltose sans phosphorylation ou accompagné de la phosphorylation sur la position 6 de la deuxième partie glucose sont très peu probable. Nous avons donc décidé d'étudier le mécanisme détaillé du transport et de l'utilisation du maltose chez *E. faecalis*

2. MalP présente une activité maltose-phosphorylase, et non une activité maltose-6'-P phosphorylase

La souche JH2-2 qui est utilisé dans cette étude est identique à la souche TX4000 [215], dont le génome a été récemment déterminé (voir le site NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/304651752>). Pour un suivi plus facile des gènes décrits

dans cette étude, nous désignons également les gènes de la souche TX4000 avec la mention (EFT ...). L'opéron qui est situé en amont du gène *malT* (EFT41760) identifié chez *E. faecalis* JH2-2 [172], est orienté dans le sens opposé (fig. 23) et comporte quatre gènes.

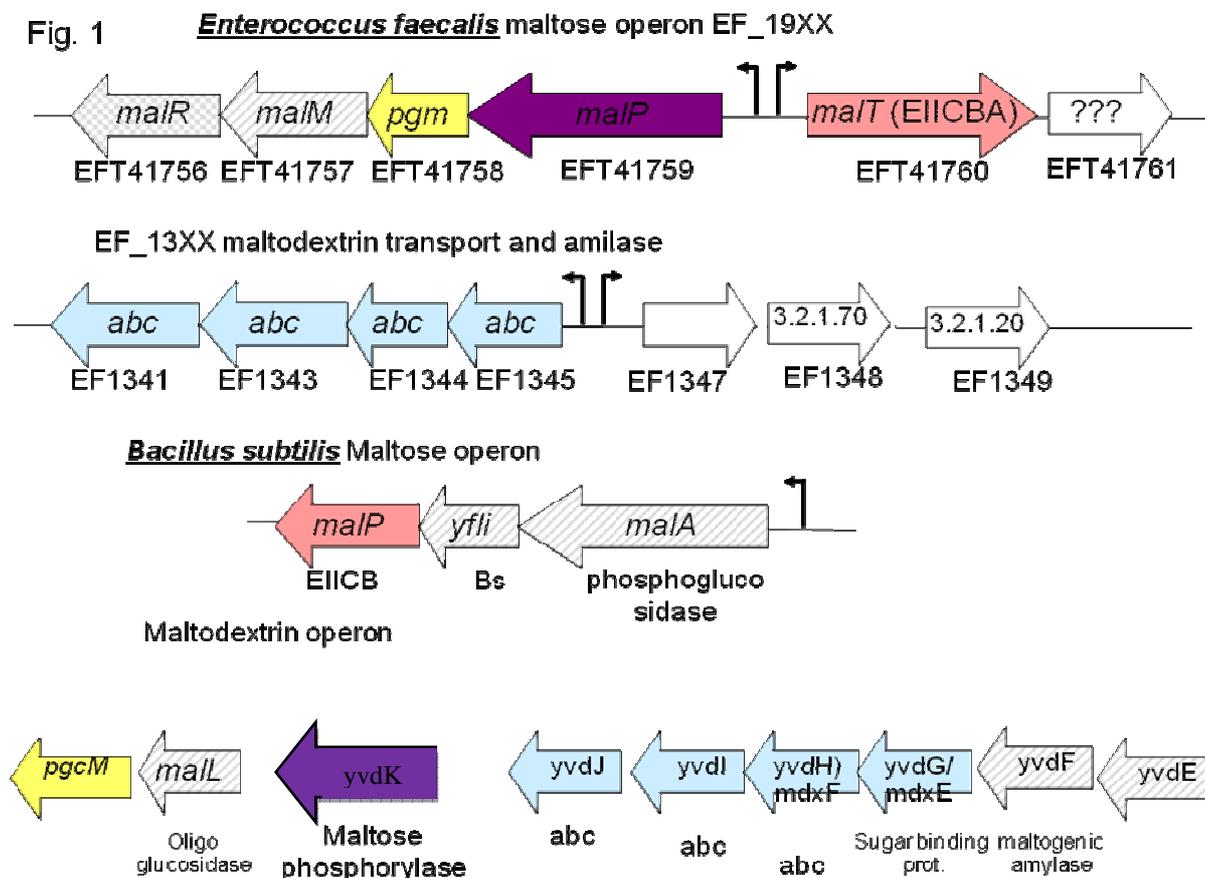


Figure 23. Organisation des gènes codant pour les protéines impliquées dans l'utilisation du maltose chez *E. faecalis* JH2-2. Les deux opérons qui sont impliquées dans l'utilisation du maltose sont orientés dans des directions divergentes. L'opéron *malP-pgm-malR* contient les gènes codant pour une putatif maltose-6'-P phosphorylase (MalP), dont nous avons montré qu'en vérité elle présente une activité maltose phosphorylase, une β -phosphoglucosidase (Pgm), une aldose-1-épimérase (MalM) et un répresseur transcriptionnel (MalR). En amont de MalP et orienté dans le sens opposé est localisé le gène *malT*, qui code pour une PTS permease EIICBA qui est spécifique au maltose, et un gène codant pour une protéine de la famille des endonucléase / exonucléase / phosphatase de fonction inconnue, que nous avons identifié comme étant une maltose-6'-P phosphatase.

Chez *B. subtilis*, le gène codant pour le MalP EIICB^{Mal} est associé avec le gène MalA, qui code pour une P- α -glucosidase dépendant NAD⁺ / Mn²⁺. L'opéron comprend également le gène codant pour un régulateur de transcription [129]. Semblable à *E. faecalis*, l'opéron codant pour le transporteur ABC spécifique au maltodextrines (MdxEFG) est situé dans un endroit du génome différent. Les gènes *mdxEFG* sont précédés par deux gènes codant un répresseur LacI-like (YvdE) et une amylase maltogénique (YvdF) et suivis de quatre gènes codant pour une protéine de fonction inconnue (YvdJ), une maltose-phosphorylase (YvdK), une oligo- α -glucosidase (MalL) qui hydrolyse les longs maltodextrines, et une phosphoglucosidase (PgcM).

Le premier gène (EFT41759) code une protéine présentant une identité de séquence de plus de 55% par rapport à la maltose-phosphorylase de *L. casei* [126] et pour d'autres firmicutes. Chez *E. faecalis* cet opéron semble jouer un rôle important dans le métabolisme du maltose, car la formation du biofilm par des cellules cultivées en maltose a été fortement affectée quand il a été inactivé [180].

Les travaux de Le Breton ont suggéré que le produit du gène EFT41759 serait impliqué dans l'hydrolyse du maltose-6'-P [172]. Celui-ci est formé au court du transport du maltose par le PTS. Dans l'objectif de vérifier cette hypothèse, nous avons cloné le gène dans un vecteur d'expression His-tag, purifié la protéine telle que décrit dans les procédures expérimentales et effectué des tests d'activité spectrophotométriques. Premièrement nous avons testé si l'enzyme été capable d'une phosphorolyse du substrat maltose. Cette réaction aurait conduit à la formation du glucose-1-P et du glucose. La formation du glucose est détectée à l'aide de réactions couplées indicatrices en utilisant le coenzyme NADP qui intervient de façon stœchiométrique dans la réaction et qui est facilement mesurable au spectrophotomètre. La formation de NADPH a été suivie en mesurant le changement d'absorption à 340 nm permettant, avec les conditions choisis, de mesurer l'activité de la maltose phosphorylase.

Dans un premier temps, le test de l'activité catalytique de MalP dans un mélange réactionnel comprenant le maltose est concluant. On a observé une augmentation rapide de l'absorption à 340 nm lorsque le maltose a été utilisé comme substrat. L'activité mesurée est de 0,0152 Abs/min, par contre en présence du maltose-6'-P, cette activité est de 0,0007 Abs/min. Cette valeur est significativement très faible (elle est 20 fois inférieur à celle en présence du maltose) **voir annexe**. Ceci démontre que MalP agit préférentiellement sur la forme non phosphorylée du substrat maltose. Une faible activité a été également mesuré avec le maltotriose, le maltotetraose, le maltopentaose, le maltohexaose et le maltoheptaose. En revanche, l'augmentation de l'absorbance à 340 nm était négligeable quand le maltose a été remplacé par le maltose-6'-P. Néanmoins, selon la voie métabolique proposé par Le Breton et al., les produits de dégradation du maltose-6'-P issue des deux modes présumés de la réaction de phosphorolyse auraient du être détecté avec ce test : Ainsi le transfert du groupe phosphoryle sur la position 1 de la partie glucose-6-P du maltose-6'-P aurait fourni du glucose-1,6-bisphosphate et du glucose.

La formation du glucose aurait été mesurée comme décrit ci-dessus pour la phosphorylation du maltose par MalP. En revanche le transfert du groupe phosphoryle sur la position 4 de la partie glucose réductrice du maltose-6'-P aurait généré du glucose-4-P et du glucose-6-P. La formation du glucose-6-P aurait été directement détecté par la réaction de la glucose 6-P déshydrogénase NADP-dépendante (voir procédures expérimentales). MalP montre donc une activité maltose phosphorylase et non pas maltose-6'-P phosphorylase (Fig. 23). Par conséquent, le métabolisme du maltose chez *E. faecalis* ne peut donc pas suivre la voie proposée précédemment par Le Breton.

3. L'inactivation du gène codant pour la maltose phosphorylase MalP bloque le métabolisme du maltose

Pour tester si la maltose phosphorylase participe au métabolisme du maltose transporté et phosphorylé par MalT nous avons interrompu le gène *malP* (Fig. 23) et étudié l'effet de cette mutation sur l'absorption et le métabolisme du maltose. Tout d'abord, la souche sauvage JH2-2 et le mutant *malP*, ont été cultivées dans un milieu M17 appauvri en carbone [200] et supplémenté soit avec du maltose ou du glucose. Bien que la souche sauvage s'est développée aussi bien en présence du glucose ou du maltose, le mutant *malP* a montré une défaillance à croître sur le maltose (Fig. 24 A et B).

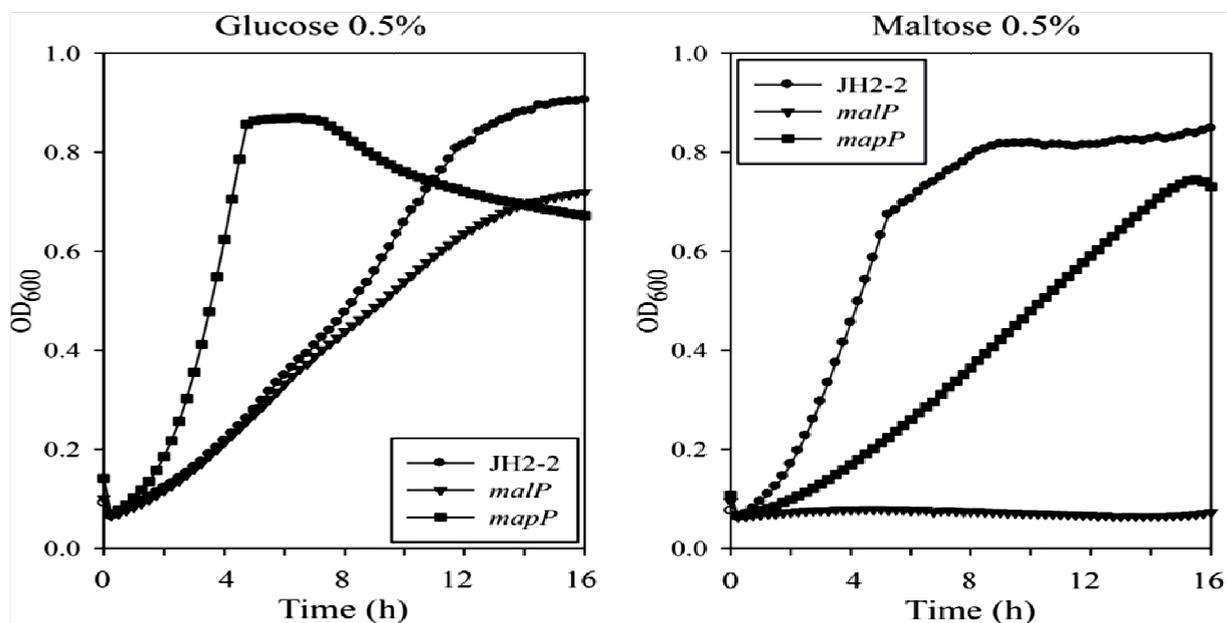


Figure 24. Croissance de la souche sauvage *E. faecalis* JH2-2 et des mutants *malP* et *mapP* dans un milieu M17 complété avec (A) 0,5% de glucose ou (B) 0,5% de maltose. Le mutant *mapP* a progressé plus vite sur un milieu contenant du glucose que la souche sauvage ou le mutant *malP*. Ce dernier avait perdu sa capacité à croître sur le milieu contenant du maltose. Tandis que le mutant *mapP* montre une croissance qui est fortement réduite dans le milieu contenant du maltose. L'expérience a été répétée deux fois et des résultats identiques à ceux qui sont présentés ici ont été obtenus à chaque fois.

Il a déjà été rapporté que la souche JH2-2 pouvait transporter efficacement 50 μM de [^{14}C]-maltose via la protéine MalT. De plus, un mutant *malT* n'a plus la capacité d'absorbé le maltose. La faible absorption du [^{14}C]-maltose observée avec le mutant *malT* permet de penser que le système de transport ABC MdxEFG (EFT41965 - 41967) en serait responsable (Fig. 23) [172]. Des expériences de transport du [^{14}C]-maltose avec la souche sauvage ont montré qu'une partie importante de la radioactivité a été sécrétée dans le milieu sous forme d'un composé chargé négativement (Tableau 4).

Tableau 4. Répartition des composés radioactifs sous leur formes chargée et non chargée, après la captation du [^{14}C]-maltose par la souche sauvage *E. faecalis* JH2-2 et les mutants *malP* et *mapP*. (Des nouvelles expériences ont été effectuées parce que certaines études de transport ont été réalisées avec des concentrations de maltose à 1 mM et d'autres à 0,22 mM. Les expériences présentées dans ce tableau ont été réalisées à une concentration de maltose de 55 μM . A cette concentration le transporteur ABC est très peu actif et par conséquent les mutants *mapP* sécrète très peu de lactate dans le milieu).

Composants	JH2-2 (wild-type)		JH-malP (<i>malP</i>)		AB01 (<i>mapP</i>)	
	Surnageant cellulaires		Surnageant cellulaires		Surnageant cellulaires	
Non chargé (Flowthrough)	76109	2484	93678	17441	76532	1133
Chargé (Elution)	21857	2812	1901	281	1672	40965

Un aliquot du surnageant après centrifugation du mélange a été passé sur une colonne échangeuse d'ions. Cela permet la séparation des composés chargés négativement de ceux non chargés ou chargés positivement (voir procédures expérimentales). L'acide lactique représente probablement la majorité des composés radioactifs chargés. Il est produit pendant la fermentation du maltose et par la suite sécrétée dans le milieu. Même si la croissance d'un mutant *malP* est très faible en présence du maltose, les tests de transport du [^{14}C]-maltose ont révélé une accumulation de la radioactivité environ trois fois plus importante que la souche sauvage (Fig. 25).

En outre, contrairement à la souche sauvage un mutant *malP* sécrète de faible quantité de composés radioactifs chargés dans le milieu (Tableau 4). En résumé, ces résultats ont permis d'établir que la protéine MalP joue un rôle important dans le métabolisme du maltose qui est capté via le PTS. Alors que dans la souche sauvage, environ la moitié des composés

radioactifs accumulés (dans le culot cellulaire obtenu après centrifugation du mélange réactionnel de transport) sont chargés négativement. Par contre les composés radioactifs accumulés dans le mutant *malP* étaient principalement sous forme non chargée (à 98%). Puisque tous les intermédiaires de la glycolyse portent une charge négative, il est fort probable que ce composé radioactif qui est accumulé à l'intérieur de la cellule n'est autre que le [^{14}C]-maltose. Donc la question se pose si le maltose lors de son transport par le PTS est libéré dans le cytoplasme sous sa forme non phosphorylé ou au contraire il est libéré sous sa forme phosphorylée et par la suite il sera déphosphorylé à l'intérieur des cellules.

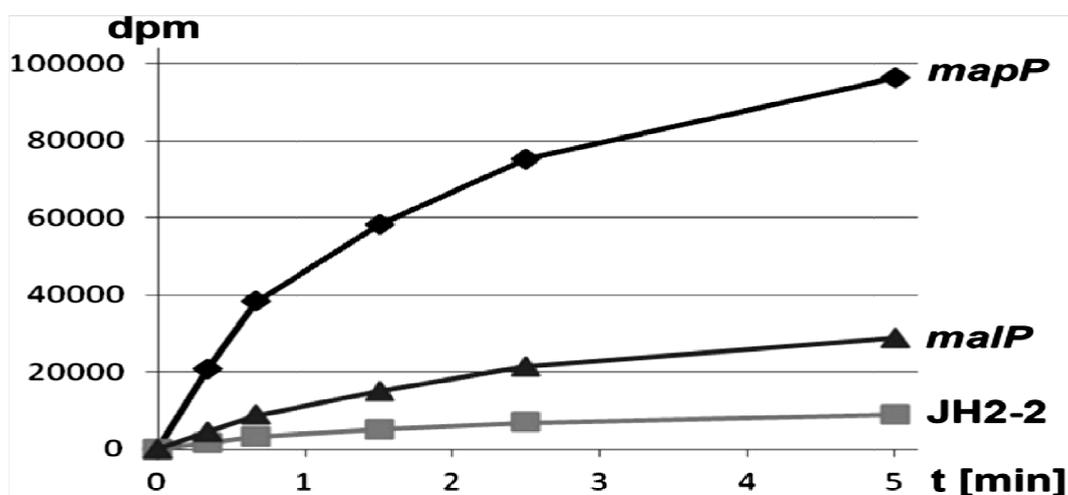


Figure 25. Accumulation du [^{14}C]-maltose chez la souche sauvage *E. faecalis* JH2-2 et les mutants *malP* et *mapP*. La souche JH2-2 est représentée par des (carrés), le mutant *malP* par des (triangles) et *mapP* par des (diamants). Les expériences ont été réalisées avec 55 μM de [^{14}C]-maltose, comme décrit dans les procédures expérimentales. Des aliquots du mélange d'essai ont été prélevés à 0,33, 0,66, 1,5, 2,5 et 5 min et filtrés à travers des filtres avec des pores de 0,45 μm de taille. Les résultats présentés dans cette figure sont des valeurs moyennes obtenues à partir de trois expériences indépendantes. Les écarts-types ne dépassent pas 15%.

4. Le gène en aval de *malT* code pour une maltose-6'-P phosphatase

Chez *S. pyogenes*, le gène *malT* et le gène en aval (M5005_spy1691), qui ressemble au gène *EFT41761* d'*E. faecalis* (Fig. 23A), sont co-transcrits lorsque les cellules sont cultivées en présence du maltose [125]. Cette observation et les résultats montrés dans la figure 25 suggèrent que la protéine codée par *EFT41761* serait impliqués dans le catabolisme du maltose. Comme l'annotation de cette protéine indique qu'elle fait partie de la grande famille des endonucléases/exonucléases/phosphatase, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le maltose pourrait être phosphorylé au cours de son transport par le PTS. Ensuite le maltose-6'-P sera déphosphorylé à l'intérieur de la cellule par MapP afin de servir comme substrat pour la MalP. Nous avons purifié cette protéine après la fixation d'une étiquette His-tag à son extrémité N-terminale dans le but de tester si elle montre effectivement une activité maltose-

6'-P phosphatase. Comme déjà mentionné, l'augmentation de l'absorbance à 340 nm était négligeable quand le maltose a été remplacé par le maltose-6'-P. Néanmoins, la présence de MapP dans un mélange réactionnel contenant du maltose-6'-P plus MalP a permis de rétablir une cinétique comparable à celle obtenue avec le maltose comme substrat en présence de MalP. L'activité qui a été mesurée est de 0,0164 Abs/min **Voir Annexe**. Ce résultat suggère que MapP a déphosphorylé le maltose-6'-P en maltose et Pi. Par la suite MalP hydrolyse le maltose ainsi obtenu en glucose et glucose 1-P. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le même système de dosage qui est utilisé pour la mesure d'une activité potentielle de la maltose phosphorylase avec le maltose 6'-P. En absence du produit du gène *EFT41761* aucune formation de NADPH n'est apparue. Par contre on a observé une augmentation rapide de la NADPH lorsque cette protéine a été ajoutée au mélange réactionnel (Fig. 26). Ce résultat suggère fortement que *EFT41761* déphosphoryle le maltose-6'-P en maltose et Pi et par la suite MalP hydrolyse le maltose en glucose et glucose 1-P.

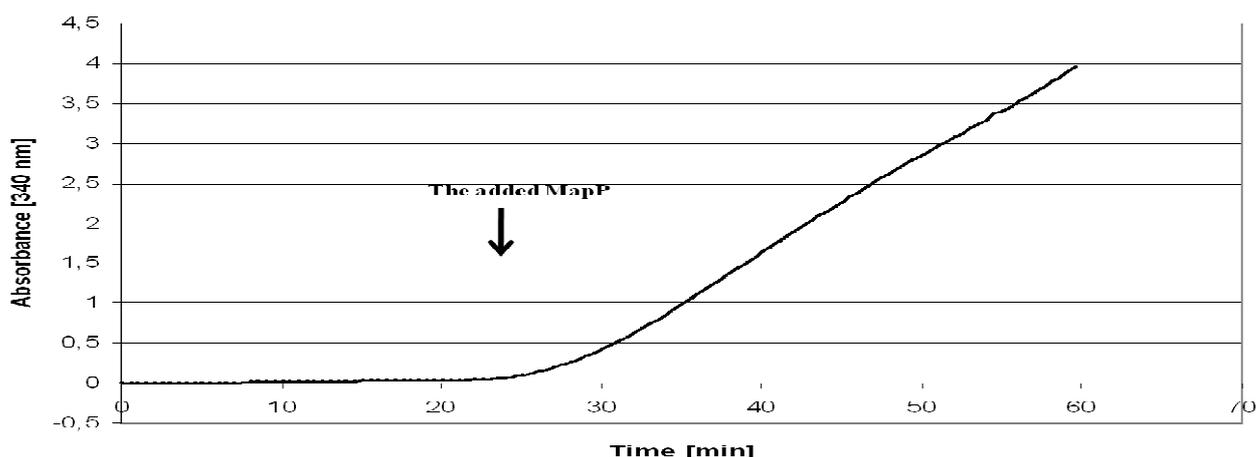
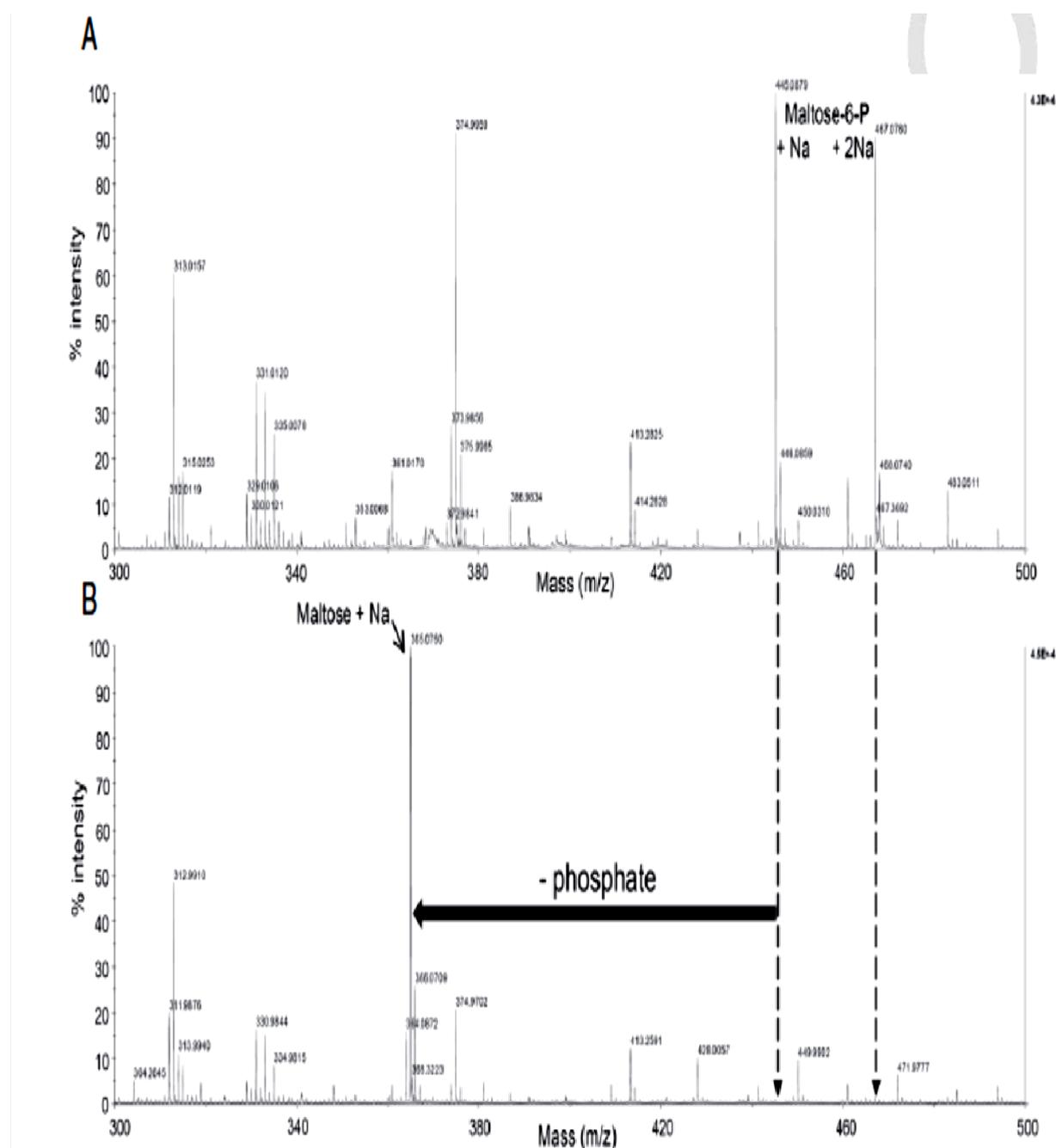


Figure 26. Test d'activité de la maltose-6'-P phosphatase EFT41761. Le mélange réactionnel contenait 500 μ l du réactif glucose assay, 500 μ l tampon phosphate 50 mM, pH 7, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de maltose-6'-P et 20 μ l de l'enzyme maltose phosphorylase ($1,2 \text{ mg ml}^{-1}$). Aucune formation de NADPH (augmentation de l'absorbance à 340 nm) n'a été détectée dans ces conditions. Ce n'est que lorsque la maltose-6'-P phosphatase MapP a été ajoutée au mélange réactionnel (flèche) que le glucose a été produit à partir de maltose-6'-P, puis phosphorylé et oxydé en gluconate-6-P avec formation de NADPH. La flèche indique le moment où la maltose-6'-P phosphatase « présumée » a été ajoutée. Les conditions de dosage ont été optimisées (moins de maltose-6'-P). La différence d'absorbance et de 55 fois supérieure entre l'activité du mélange d'essai contenant seulement la maltose phosphorylase et l'activité observée après addition de la maltose-6'-P phosphatase.

Pour confirmer sans ambiguïté cette activité phosphatase nous avons procédé à l'incubation du substrat maltose-6'-P en présence et en absence de EFT41761. Par la suite nous avons déterminé la masse des composants formés dans les deux conditions. En l'absence

de l'enzyme, nous avons observé des pics correspondant au maltose-6'-P avec soit un ion de Na^+ et un $\text{PM} = 445,08$ soit deux ions de Na^+ et un $\text{PM} = 467,07$. Dans l'échantillon qui est incubé avec EFT41761 ces deux pics n'étaient plus détectable, par contre on observe l'apparition d'un nouveau pic à 365,07 correspondant au maltose sous sa forme non phosphorylée avec une addition d'un ion Na^+ ($\text{MW} = 343 + 22$) (Fig. 27A).



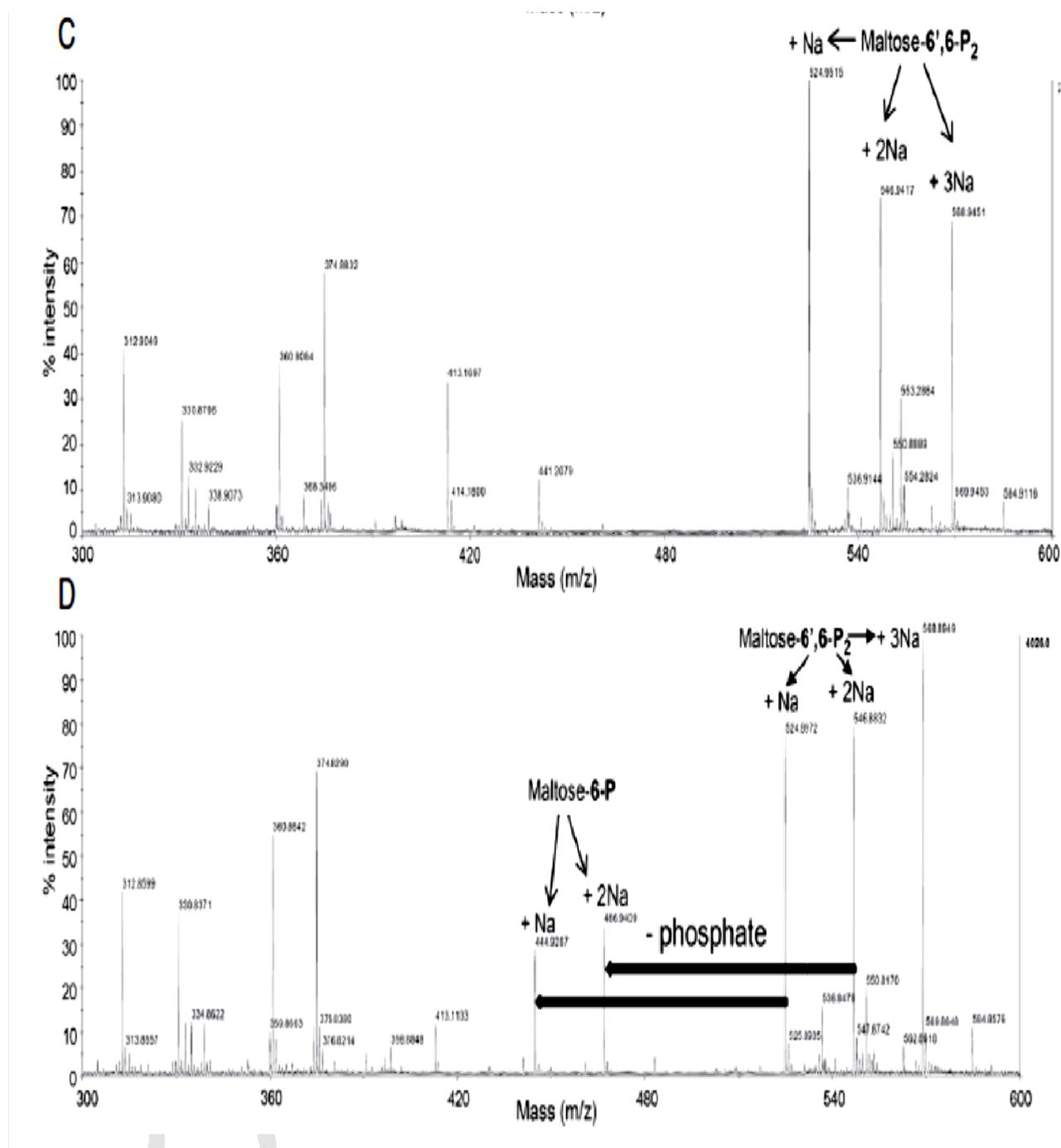


Figure 27. La conversion du maltose-6'-P en maltose (A et B) et du maltose-6',6-P₂ en maltose-6'-P (C et D) par MapP ont été mise en évidence par spectrométrie de masse. Les réactions de déphosphorylation du maltose-6'-P avec MapP et les analyses de spectrométrie de masse ont été effectués comme décrit dans les procédures expérimentales. (A) Les deux pics pour le maltose 6'-P observés correspondent bien au disaccharide phosphorylé avec une $m/z = 445$ et 467 portant respectivement un ($423 + 22$) ou deux ($423 + 44$) ions Na^+ . (B) Ces deux pics ont disparu complètement après le traitement avec MapP et un nouveau pic à 365 est apparu, qui correspond au maltose portant un ion Na^+ ($343 + 22$). (C) le maltose-6',6-P₂ était capable de se lier à trois ions Na^+ et par conséquent trois pics à $524,95$ [$(M + H) + \text{Na}^+$], $546,94$ [$(M + H) 2 + \text{Na}^+$] et $568,94$ [$(M + H) + 3 \text{Na}^+$] ont été observés. (D) Ces trois pics sont encore détectés après le traitement avec la MapP. Néanmoins, deux petits pics supplémentaires sont apparus à $444,93$ et $466,94$, ce qui correspond au maltose-6-P portant respectivement un [$(M + H) + \text{Na}^+$] ou deux [$(M + H) + 2 \text{Na}^+$] ions Na^+ .

Ce résultat établi clairement que le gène en aval de *malT*, *EFT41761*, code pour une enzyme avec une activité maltose-6'-P phosphatase. Le point d'interrogation sur la figure. 23 A peut donc être remplacé par MapP. Pour mesurer les paramètres cinétiques de l'enzyme MapP, nous avons utilisé un test par spectrophotométrie couplée légèrement modifiée avec la glucose-déshydrogénase (voir procédures expérimentales). La modélisation graphique est obtenue en traçant la courbe correspondant à l'équation de Michaelis Menten, $V_i = (V_{max} \cdot [S]) / (K_m + [S])$. Le K_M de MapP a été déterminé à 4,1 mM et la V_{max} a été trouvée égale à 25 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéine et une k_{cat} de 128 s^{-1} .

Ces résultats démontrent que le maltose-6',6-P₂ est un mauvais substrat pour la MapP et que seul l'un des deux groupements phosphate est éliminé par cette enzyme. Aucun pic correspondant au maltose transportant un produit d'addition d'ion de Na⁺ (365,07) ne sont apparues, ce qui suggère que l'enzyme élimine spécifiquement le groupe phosphoryle lié à la fraction de sucre non réducteur du maltose-6',6-P₂. Sinon du maltose-6'-P aurait été formé, et (dans les conditions de réaction utilisées) aurait été efficacement déphosphorylé en maltose (voir Fig. 27B). Ce n'était pas le cas.

5. MapP attaque préférentiellement les disaccharides phosphatés contenant une liaison α -glycosidique

MapP agit préférentiellement sur les disaccharides phosphatés qui sont liés entre eux par des ponts glycosidiques. Afin de déterminer la spécificité de l'enzyme MapP de *E. faecalis* nous avons utilisé le glucose-6-P et le fructose 6-P qui sont disponibles commercialement comme substrats potentiels. En outre nous avons synthétisé une variété de sucres phosphorylés et de dérivés de sucre (Tableau 5). La structure exacte de ces composés a été confirmée par chromatographie sur couche mince, par spectrométrie de masse et par spectroscopie à RMN [216]. Les phospho-sucres ont été incubés avec MapP et les produits de la réaction ont été analysés par spectrométrie de masse. Les résultats ont montré que les sucres suivants : le glucose-6-P, le fructose 6-P et le β methylglucoside 6-P, n'ont pas été déphosphorylés. Ces sucres sont caractérisés par l'absence sinon la présence d'une petite aglycone. Fait intéressant, MapP déphosphoryle préférentiellement les disaccharides dérivés-glycopyranosyles et les hétérosides contenant une liaison O- α -glycosyl. Par exemple, les cinq isomères du sucrose qui sont liés par des ponts osidiques (α) (le maltulose-6'-P, le leucrose-6'-P, le tréhalulose-6'-P, le turanose-6'-P et le palatinose-6'-P) étaient tous entièrement ou sensiblement déphosphorylés par MapP (Tableau 2).

Par contre, le sucrose-6-P [qui contient une liaison glucosidique α -(1,2) n'a pas été déphosphorylé. Les composés phosphorylés contenant une liaison O- β -glycosidique telque : le cellobiose-6-P le gentiobios-6-P, l'arbutine-6-P, etc. n'étaient pas non plus déphosphorylé par MapP. A l'exception de l'esculine-6-P, qui a été déphosphorylée de manière significative par MapP. Dans la molécule d'esculine, le glucose est lié par une liaison β -glycosidique au groupe hydroxyle en position 6 de la 6,7-dihydroxychromen-2-on. Il est maintenant important de savoir si MapP faisait la distinction entre les groupes phosphates qui sont liés à la 1^{ère} molécule de glucose (non réductrice) et ceux de la seconde molécule de glucose (réductrice) du disaccharide maltose. Dans cet objectif du maltose doublement phosphorylé a été synthétisé par voie chimique, de telle sorte que les deux groupes glucose porté un groupe phosphoryle en position C6 (le maltose-6',6-P₂, pour la formule, voir le tableau 2). La structure et les sites de phosphorylation du maltose-6',6-P₂ ont été confirmés par chromatographie sur couche mince, par spectrométrie de masse et par spectroscopie à RMN. Il est intéressant de noter qu'un seul groupe phosphoryle du maltose-6',6-P₂ a été hydrolysé par MapP (comparer la Fig. 27 C et D). Ceci doit être le groupe phosphate attaché en position 6', car si la déphosphorylation avait eu lieu au niveau de la position 6 du maltose-6',6-P₂, elle aurait conduit à la formation du maltose-6'-P. Comme décrit ci-dessus, le maltose-6'-P est efficacement déphosphorylé par la MapP conduisant ainsi à la formation du maltose, qui, cependant, n'a pas été détecté comme un produit de la réaction (Fig. 27 D). En outre, par rapport au maltose-6'-P, la vitesse de déphosphorylation du maltose-6',6-P₂ été significativement plus lent. Ces résultats établissent que la MapP arrive à faire une discrimination entre les groupes phosphoryle liés en position 6 et 6' du maltose, et que 6'. MapP semble donc interagir non seulement avec la fraction du glucose réductrice du maltose, mais aussi avec la fraction non-réductrice.

Etant donné que les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées à des concentrations saturantes de substrat (200 mM), nous avons utilisé le test de vert de malachite (voir procédures expérimentales) [209], ce qui a permis une détermination plus quantitative de la vitesse de la déphosphorylation de ces divers substrats phosphorylés par l'action de la MapP. Nous avons utilisé des concentrations en substrat de 2 mM, une valeur qui est dans la plage de K_M pour le maltose-6'-P. Dans ces conditions nous avons observé que seul le turanose-6'-P a été efficacement déphosphorylé pareillement comme pour le maltose-6'-P (85 % de l'activité du maltose-6'-P) (Tableau 5). Les quatre autres isomères du sucrose avec des liaisons (α) ont été déphosphorylés avec une vitesse allant de 0,9 % pour le palatinose-6'-P et

jusqu'à 18,8 % pour le leucrose-6'-P. La déphosphorylation du maltose-6',6-P₂ était environ 15 fois plus lente que la déphosphorylation du maltose-6'-P, confirmant ainsi l'effet inhibiteur des modifications au niveau du fragment de sucre réducteur du maltose. Enfin, l'esculine-6-P, qui est le seul β-glycoside déphosphorylé par MapP, présentait 0,6 % de l'activité obtenue avec le maltose-6'-P, ce qui indique que MapP possède une faible affinité pour ce composé. Mais d'après les données de spectrométrie de masse l'esculine-6-P est efficacement déphosphorylé à des concentrations élevées (Tableau 5). Nous avons également testé la déphosphorylation qui est catalysée par MapP sur le glucose-6-P, le fructose-6-P et le saccharose-6-P, mais en accord avec les données de spectrométrie de masse aucune activité n'a été observée.

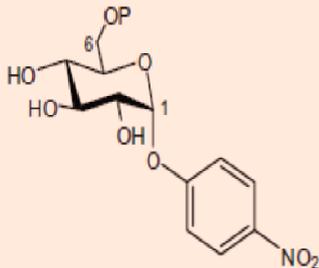
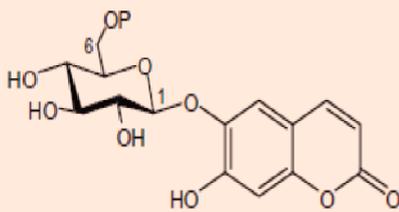
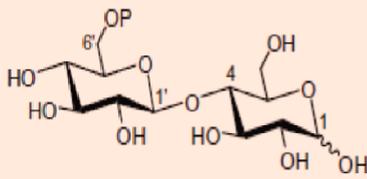
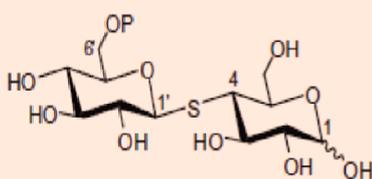
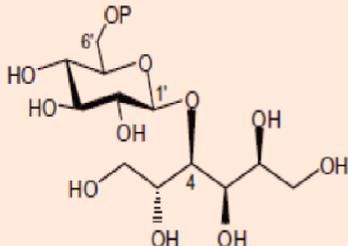
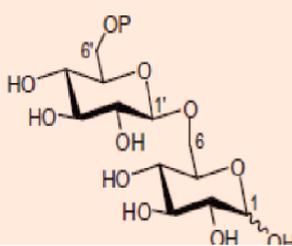
6. Le mutant *mapP* accumule du maltose-6-P

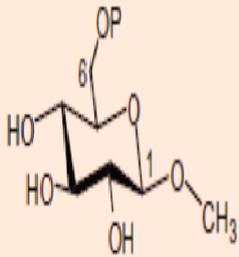
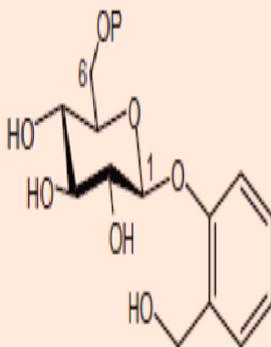
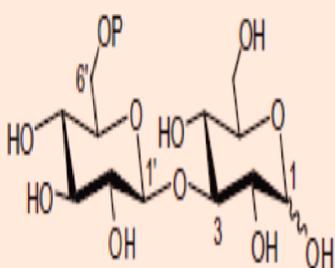
Pour confirmer le rôle de MapP lors de l'utilisation du maltose, nous avons construit un mutant *mapP* et testé sa capacité à utiliser le glucose ou le maltose comme source de carbone. Fait intéressant, dans un milieu M17 appauvri et contenant du glucose comme seule source de carbone, le mutant *mapP* présentait une croissance plus rapide par rapport à celle observée avec la souche sauvage (Fig. 24). Une observation similaire a été faite avec le mutant *mapP* (*M5005_spy1691*) de *S. pyogenes*, qui par rapport à la souche sauvage pousse également plus rapidement sur un milieu contenant du glucose [125]. Nous n'avons aucune donnée pouvant expliquer ce phénomène. A la différence de la souche *malP*, le mutant *mapP* était capable de croître dans un milieu contenant du maltose, bien que le taux de croissance ait été significativement plus lent que celui obtenu avec la souche sauvage. Le mutant *mapP* utilise probablement le maltose capté via le système de transport ABC, qui semble être spécifique aux maltodextrines. En effet ce système de transport de type ABC présente une faible affinité pour le maltose ainsi permettant un transport seulement très lent [172]. Le maltose transporté via le système ABC peut être directement métabolisé par MalP (voir Fig. 28). La MalP est donc nécessaire pour le métabolisme du maltose qui est capté aussi bien par le PTS que par le transporteur ABC, ce qui explique la raison pour laquelle le mutant *malP* avait perdu la capacité à croître sur le maltose. Nous avons étudié ensuite l'effet de la mutation *mapP* sur le transport et le métabolisme du maltose. En accord avec les expériences de croissance, le mutant *mapP* a pu transporter le [¹⁴C]-maltose. Cependant, la quantité de radioactivité accumulée dans les cellules, après 5 minutes d'incubation avec 55 μM de [¹⁴C]-maltose, est environ 10 fois plus élevée que dans la souche sauvage et elle est 3,5 fois plus élevée que dans le mutant *malP* (Fig. 25).

Tableau 5 : Liste des sucres phosphorylés et de dérivés de sucres phosphorylés utilisés dans cette étude.

Name	Glycosidic linkage	MapP activity ^a	MapP activity ^b	Formulae of phosphorylated sugars
Maltose 6'-P	$\alpha(1\rightarrow4)$	(++) ^a	100	
Maltose 6',6-P ₂	$\alpha(1\rightarrow4)$	(±)	6.0	
Glucose 6-P	α/β equilibrium	(-)	(-) ^a	
Fructose 6-P	α/β equilibrium	(-)	(-)	
Sucrose 6-P	$\alpha(1\leftrightarrow2)\beta$	(-)	(-)	
Trehalulose 6'-P ^c	$\alpha(1\rightarrow1)$	(±)	2.1	

Name	Glycosidic linkage	MapP activity ^a	MapP activity ^b	Formulae of phosphorylated sugars
Turanose 6'-P	$\alpha(1\rightarrow3)$	(++)	85.7	
Maltulose 6'-P	$\alpha(1\rightarrow4)$	(±)	8.1	
Leucrose 6'-P	$\alpha(1\rightarrow5)$	(++)	18.8	
Palatinose 6'-P	$\alpha(1\rightarrow6)$	(+)	0.9	
Arbutin 6-P	β	(-)	nd	

Name	Glycosidic linkage	MapP activity ^a	MapP activity ^b	Formulae of phosphorylated sugars
p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 6-P	α	(-)	nd	
Esculin 6-P	β	(+)	0.6	
Cellobiose 6'-P	$\beta(1\rightarrow4)$	(-)	nd	
Thiocellobiose 6'-P	$\beta(1\rightarrow4)$	(-)	nd	
Cellobititol 6'-P	$\beta(1\rightarrow4)$	(-)	nd	
Gentiobiose 6'-P	$\beta(1\rightarrow6)$	(-)	nd	

Name	Glycosidic linkage	MapP activity ^a	MapP activity ^b	Formulae of phosphorylated sugars
β -methylglucoside 6-P	β	(-)	nd	
Salicin 6-P	β	(-)	nd	
Laminaribiose 6'-P	$\beta(1\rightarrow3)$	(-)	nd	

Les formules des composés phosphorylés sont également présentées.

- Activité MapP déterminée par spectrométrie de masse. (+ +) = déphosphorylation totale; (+) = plus de la moitié déphosphorylé; (\pm) = moins de la moitié déphosphorylé, (-) = pas de déphosphorylation détectable.
- Activité MapP déterminée avec le test de vert de malachite pour le dosage du phosphate. Les activités déterminées avec les différents substrats sont exprimés par rapport à l'activité mesurée avec le maltose -6'P, qui a été fixée à 100%.
- Les cinq isomères du sucrose 6-P (avec des ponts α) sont écrits en caractères gras.
- nd, non déterminé.

Il convient de noter que ces résultats ne reflètent pas forcément la vitesse de transport, parce que le maltose est catabolisé. Comme mentionné ci-dessus, chez la souche sauvage, une

majeure partie de maltose catabolisé est sécrété dans le milieu sous forme de composés chargés. Il s'agit probablement du lactate qui est formé à partir du maltose et ainsi échappe au comptage de scintillation. A la différence de la souche sauvage, le mutant *mapP* a sécrété dans le milieu une très faible quantité de radioactivité. Celui-ci est probablement capté par l'ABC transporteur spécifique aux maltodextrines et métabolisé via MalP. Lorsque nous avons utilisé 250 μM de [^{14}C]-maltose l'absorption via l'ABC transporteur a augmenté de manière significative par référence à la quantité élevée de composés radioactifs chargés négativement qui sont sécrétées (données non présentées). La plupart de la radioactivité accumulée par le mutant *mapP* (dans le culot cellulaire obtenu après centrifugation du mélange dans lequel a été effectué l'essai de transport) est présente sous une forme qui est chargée négativement, très probablement sous forme de maltose-6'-P (Tableau 4). Afin de confirmer cette hypothèse nous avons incubé un aliquot d'un extrait de cellules qui ont été exposées au [^{14}C]-maltose avec l'enzyme MapP que nous avons purifié. Nous avons observé, qu'en présence de la MapP plus de 90% des composés radioactifs qui sont chargés négativement ont été converties en composés non chargés ou chargés positivement (Tableau 6). Ce qui suggère que le mutant *mapP* accumule principalement du maltose-6'-P, lorsqu'il est exposé à un milieu de croissance contenant du maltose. On a observé que chez le mutant *malP* la quantité du maltose radioactif accumulée était très faible par rapport à celle du mutant *mapP* (Fig. 25). Cela est probablement dû au fait que ce dernier est capable de produire de l'énergie à partir du maltose intracellulaire fournit lentement via l'ABC transporteur MdxEFG/MsmX. Le disaccharide est ensuite métabolisé via l'enzyme MalP, donc une voie non-fonctionnelle dans le mutant *malP* (Fig. 28).

Tableau 6. Effet du traitement avec MapP sur les composés radioactifs accumulés majoritairement en forme négativement chargée à partir de [^{14}C]-maltose par le mutant *E. faecalis mapP* AB01.

	Non traité	MapP-traité
Non chargé (flowthrough)	891 ^a	34167
Chargé (elution)	35334	2619

L'expérience a été réalisée trois fois et à chaque fois les résultats obtenu sont comparables.

- Le flowthrough « flux continu » contient des composés radioactifs non chargé et chargés positivement.
- Les chiffres représentent la “dpm”, et sont des valeurs moyennes de trois expériences indépendantes.

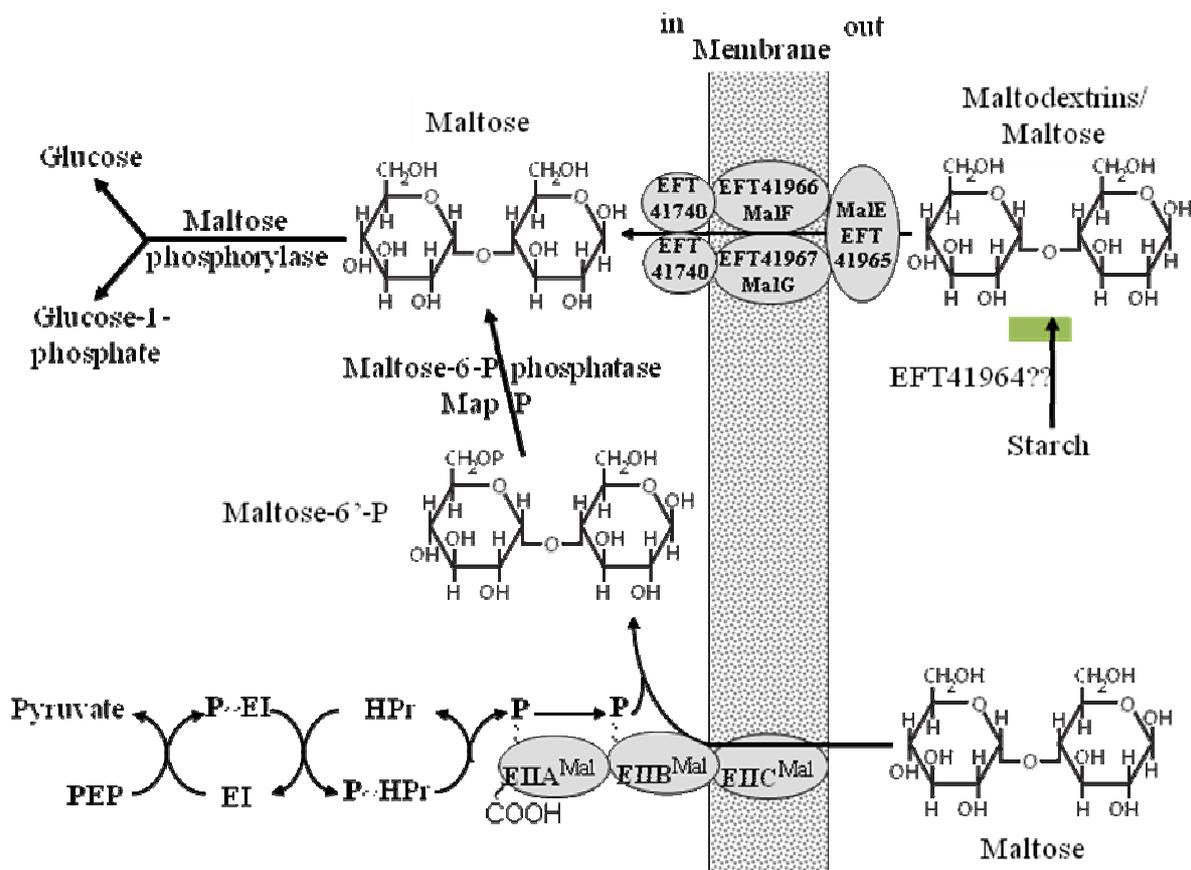


Fig. 28. Modèle proposé pour l'absorption et le métabolisme du maltose chez les entérocoques et d'autres bactéries portant les gènes *malT* et *mapP*. Le maltose est lentement absorbé par l'ABC transporteur MalEFG/MsmX de faible affinité puis il est métabolisé par la voie métabolique habituel via la maltose phosphorylase MalP. Le maltose qui est capté par l'intermédiaire du PTS arrive dans la cellule sous forme de maltose-6'-P. Les entérocoques et les streptocoques sont dépourvus pour l'enzyme 6-P- α -glucosidase, qui chez d'autres bactéries hydrolyse le maltose-6'-P en glucose et en glucose-6-P. Au lieu de cela, les entérocoques et les streptocoques ont acquis une phosphatase, qui déphosphoryle le maltose-6'-P intracellulaire en maltose, reliant ainsi le transport et la phosphorylation par le PTS^{Mal} (MalT) au métabolisme via la maltose phosphorylase.

7. Complémentation hétérologue d'un double mutant *malA mdxE* de *B. subtilis* avec le mutant *mapP* de *E. faecalis*

Afin de démontrer *in vivo* que l'enzyme MapP de *E. faecalis* peut déphosphoryler le maltose-6'-P, chez d'autres bactéries, nous avons construit un mutant *malA* de *B. subtilis*, qui devrait accumuler du maltose-6'-P en raison de la perte de l'enzyme 6-P- α -glucosidase, qui hydrolyse le maltose-6'-P en glucose-6-P et en glucose [135]. Nous avons également inactivé le gène *mdxG* (appelé aussi *yvdI*), qui code un composant membranaire du transporteur ABC qui est spécifique au maltodextrines [122]. Cette mutation a pour objectif d'empêcher le transport du maltose par l'intermédiaire de ce système d'absorption qui présente une faible

affinité pour ce substrat. À cette fin, nous avons inséré le plasmide pMUTIN [197] dans ce gène, causant ainsi non seulement une inactivation du gène *mdxG* mais permettant également une expression inductible par l'IPTG des gènes en aval, y compris *yvdK*, qui code pour une protéine qui montre une forte similarité vis à vis de la maltose phosphorylase [122] (Fig. 23). Par conséquent ce double mutant devrait perdre la capacité de croître sur un milieu minimal contenant du maltose comme unique source de carbone. Nous nous attendions à ce que la complémentation hétérologue de cette souche avec le gène *mapP* de *E. faecalis* qui est cloné dans le plasmide pAC7 intégrative [196] conduirait à la déphosphorylation du maltose-6'-P accumulé et donc permettre la restauration de la croissance sur le maltose. Afin de tester cette hypothèse, le gène *mapP* de *E. faecalis* a été fusionné au promoteur constitutif et à la boîte RBS du gène *ptsH* de *B. subtilis* et inséré dans le locus *amyE* du double mutant *malA mdxG*. Sur un milieu minimum contenant du maltose et en présence de l'inducteur IPTG, le double mutant dans lequel a été inséré le plasmide PAC7 vide a montré une croissance inexistante. De même en absence de l'IPTG, aucune croissance n'a eu lieu après 36 h lorsque le double mutant a été complété par *mapP* et incubé dans un milieu minimal contenant du maltose. Ce n'est que lorsque on rajoute l'IPTG, qui conduit à l'expression des gènes en aval de *mdxG*, que le double mutant *malA mdxG* complémenté avec *mapP* était capable de croître sur un milieu minimum contenant du maltose à une valeur égale à la moitié du taux de croissance qui est obtenu avec la souche sauvage (données non présentées). Ces résultats suggèrent que MapP convertit le maltose-6'-P accumulé par le mutant *malA* de *B. subtilis* en maltose, qui est ensuite convertie en glucose-1-P et en glucose par la maltose phosphorylase YvdK. En accord avec ce concept, l'absence de MapP ou l'absence d'induction du gène *yvdK* empêche la croissance du double mutant *malA mdxG* sur un milieu minimal supplémenté avec du maltose.

Conclusion

Conclusion

Nous avons établi dans cette étude que l'absorption du maltose par le PTS et son utilisation chez *E. faecalis* suit une voie métabolique inhabituelle. Comme il est présenté dans la Fig. 6, le maltose est transporté par le PTS et pénètre dans les cellules sous forme de maltose-6'-P. Il est ensuite déphosphorylé à l'intérieur des cellules en maltose par une maltose-6'-P phosphatase MapP. Une maltose-phosphorylase MalP va hydrolyser le maltose intracellulaire en glucose-1-P et glucose. Cette réaction de phosphorolyse nécessite l'utilisation d'un phosphate inorganique. Le glucose et le glucose-1-P, ainsi obtenu sont tous deux convertis en glucose-6-P qui pourra ainsi intégrer la voie de la glycolyse. MapP est un membre de la famille des endonucléase / exonucléase / phosphatase, qui comprend des enzymes présentant des activités assez différentes, telles que la DNase I ou la Synaptojanin, un phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 5-phosphatase [217]. Les paramètres cinétiques déterminés pour MapP ($K_M = 4,1 \text{ mM}$, $V_{\max} = 25 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protéine}$; $k_{\text{cat}} = 128 \text{ s}^{-1}$) sont dans la gamme habituelle des enzymes cataboliques.

Il a été fait mention de la présence des deux gènes codant l'un pour une perméase du PTS (MalT) et l'autre pour la maltose-6'-P phosphatase MapP. De plus leur organisation génétique est identique chez la plupart des entérocoques et des streptocoques, tels que *S. mutans* [124], *S. pyogenes* [125] et *S. pneumoniae* [128]. Ceci laisse penser que ce type d'utilisation du maltose est un phénomène général partagé chez l'ensemble de ces espèces bactériennes. Chez certains streptocoques, tels que *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus gordonii* et *S. agalactiae*, MapP a été désigné RgfB (régulateur de liaison du fibrinogène), et le gène *rgfB* est également situé en aval de *malT*. Néanmoins, *rgfB* a été rapportée pour être co-transcrit avec des gènes codant pour une kinase senseur à deux composants et un régulateur de réponse [218]. L'inactivation de l'histidine kinase RgfC affecte la liaison du fibrinogène, mais on ne sait pas si des modifications ciblant l'expression de *rgfB* (*mapP*) sont responsables de ce phénotype. Plusieurs *Bacillales* (*Macrocooccus caseolyticus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, etc) et *Clostridiales* (*Catonella Morbi*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, etc) possèdent également des homologues de MalT et de la MapP. Chez ces organismes, une PTS perméase de la sous-famille de glucose a adapté probablement sa fonction pour le transport du maltose. En effet, MalT ressemble plus à PtsG de *B. subtilis*, un PTS transporteur spécifique au glucose, qu'au PTS transporteur du maltose (MalP) de cet organisme.

L'absorption du maltose médiée par le PTS conduit à la formation du maltose-6'-P à l'intérieur de la cellule. Chez certaines bactéries le maltose-6'-P est hydrolysé en glucose et en glucose-6-P par l' α -glucosidase-6-P NAD⁺/Mn²⁺-dépendante. Les entérocoques et les streptocoques sont généralement dépourvus de cette hydrolase. Par contre les entérocoques portent en amont du gène *maltT*, un opéron codant trois enzymes qui sont impliqués à la fois dans le catabolisme et l'absorption du maltose par des ABC transporteurs ou par des symporteurs à ions sans aucune phosphorylation [172]. En fait, chez plusieurs organismes contenant une maltose perméase MalY de type LacY-like [219], le gène du transporteur MalY est suivi par trois autres gènes *malP*- *pgcM* – *malM* codant respectivement pour une maltose phosphorylase, une phosphoglucomutase et une mutarotase (A. Mazé et J. Deutscher, observations inédites). Il est donc tentant de supposer que les entérocoques et les streptocoques ont acquis ces gènes à partir d'un organisme qui utilise MalY pour le transport du maltose.

Ces organismes semblent donc synthétiser une protéine pour le transport du maltose (MalT, qui libère du maltose-6'-P), qui, au demeurant ne semble pas être relié à une voie catabolique (MalP utilise uniquement du maltose comme substrat). Afin d'acquérir la capacité de cataboliser le maltose-6'-P (formé durant le transport via MalT) les entérocoques et toutes les autres bactéries possédant un homologue de MalT ont besoin d'une enzyme supplémentaire qui relie le transport par le PTS à l'itinéraire de l'enzyme maltose phosphorylase. Pour cette raison, ces bactéries ont probablement acquis le gène situé en aval de *maltT*, qui code pour une enzyme appartenant à la grande famille des endonucléase / exonucléase / phosphatase. Au cours de l'évolution, ce gène a été probablement optimisé pour la déphosphorylation des α -glucosides phosphorylés tels que le maltose-6'-P.

L'acquisition d'une maltose-6'-P phosphatase fournit probablement une connexion optimale entre transport et phosphorylation du maltose par le PTS, et le métabolisme du maltose médié par la maltose phosphorylase. Fait intéressant, le nombre de molécules d'ATP formés à partir du maltose qui est capté par un système de transport de type ABC, et phosphorylé par une maltose phosphorylase, ou transporté via le PTS, et hydrolysé par une 6-P- α -glucosidase, est identique à celui obtenu par le métabolisme du maltose-6'-P sous l'action de la MapP. Ainsi dans la première étape catabolique la MapP va déphosphoryler le maltose-6'-P intracellulaire libérant du maltose et du Pi. Par la suite la MalP va utiliser le Pi pour la phosphorylation du maltose, il s'ensuit la formation du glucose-1-P et du glucose. Une enzyme la phosphoglucomutase qui est codée par le gène EFT41758 (Fig. 1A) convertit le glucose-1-

P en glucose-6-P. Le glucose et le glucose-6-P sont également formés lorsque la MalA de *B. subtilis* hydrolyse le maltose-6'-P qui est libéré au court du transport du maltose par la perméase MalP du système PTS (Fig. 1B). La somme de molécules d'ATP et/ou PEP utilisés pour le transport du maltose et les intermédiaires cataboliques sont donc identiques pour les trois différents modes de transport et de métabolisme du maltose.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] Monnet, D. (2008). Etude de l'évolution des propriétés mécaniques de matériaux amylicés par sélection et/ou modifications structurales dirigées. Université de Reims Champagne-Ardenne. Thèse. P 182.
- [2] Teyssandier, F. (2011). Formulation et morphologies de mélanges de polymères thermoplastiques à base d'amidon. Ecole doctorale matériaux de Lyon. Thèse. P 214.
- [3] Davidovic, A. S. (2006). Matériaux biodégradables à base d'amidon expansé renforcé de fibres naturelles Application à l'emballage alimentaire. Université du sud Toulon-Var. Thèse. P 200.
- [4] Belard, L. (2007). Nouvelles stratégies d'hydrophobation de matériaux à base d'amidon plastifié. Université de Reims Champagne-Ardenne. Thèse. P 210.
- [5] Schwach, E. (2004). Etude de systèmes multiphasés biodégradables à base d'amidon de blé plastifié : relations structure – propriétés approche de la compatibilisation. Université de Reims Champagne-Ardenne. Thèse. P 266.
- [6] Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C. and Bin Ariff, A. (2012). Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. Enzyme Research. Article ID 921362. P 14
- [7] Moat, A. G., Foster, W. J. and Spector, M. P. (2002). Metabolism of substrates other than glucose. Microbial Physiology. Wiley-Liss, Inc. P 394-409
- [8] El Fellal, A., Abou Dohara, M., El-Sayed, A. and Omar, N. (2012). Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. INTECH. Pp 459-488.
- [9] Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, vol. 94, no. 2, pp. 137–155.
- [10] Haki, G. D. and Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, vol. 89, no. 1, pp. 17–34.
- [11] Tharanathan, R. N. and Mahadevamma, S. (2003). Grain legumes a boon to human nutrition. Trends in Food Science and Technology, vol. 14, no. 12, pp. 507–518.
- [12] Bertoldo, C. and Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, vol. 6, no. 2, pp. 151–160.
- [13] Duffner, F., Bertoldo, C., Andersen, J. T., Wagner, K., and Antranikian, G. (2000). A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, vol. 182, no. 22, pp. 6331–6338.
- [14] Hobel, C. F. V. (2004). Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. Ph.D. thesis. University of Iceland, Iceland.
- [15] Roy, A., Messaoud, E. B., and Bejar, S. (2003). Isolation and purification of an acidic pullulanase type II from newly isolated *Bacillus sp.* US149. Enzyme and Microbial Technology. vol. 33, no. 5, pp. 720–724.

- [16] Saier, M. H., Jr. (2000). Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology*. 35(4), 699 -710.
- [17] Siebold, C., Flukiger, K., Beutler, R., Erni, B. (2001). Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Letters* 504, 104-111.
- [18] Poolman, B. (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:147-64.
- [19] Hiron, A. (2007). Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Agroparistech. Thèse. pastel-00003802.
- [20] Tomii, K. and Kanehisa, M. (1998). A Comparative Analysis of ABC Transporters in Complete Microbial Genomes. *Genome Res.* 8: 1048-1059
- [21] Gally, F. (2005). Etude structure/ Fonction d'une protéine ABC : sur les récepteurs des sulfonylurées. Université Joseph Fourier – Grenoble 1. Thèse. P 205.
- [22] Rees, D. C., Johnson E. and Lewinson O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature reviews | Molecular cell Biology*. Volume 10.
- [23] Blanvillain, S. (2004). Etude des récepteurs TonB-dépendants et d'un nouvel effecteur de type III de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris pv. Campestris*. Université Toulouse III. Thèse. P 463.
- [24] Fath, M. J., and Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 57, 995-1017
- [25] Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.*8:67-113.
- [26] Schneider, E. and Hunke, S. (1998) .ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews* 22 1-20.
- [27] Cuthbertson, L., Kos V., and Whitfield C.. (2010). ABC Transporters Involved in Export of Cell Surface Glycoconjugates. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. p 341–362.
- [28] Ferreira M. J. and Nogueira, I. d. S. (2010). A Multitask ATPase Serving Different ABC-Type Sugar Importers in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* October vol. 192 n°. 20 5312-5318.
- [29] Boos, W., and Shuman, H. A. (1998). The maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 204-229.
- [30] Dippel, R., and Boos, W. (2005). The Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Metabolism and Transport. *J. Bacteriol.* 187: 8322-31.
- [31] Gould, A. D. (2011). ATPase Regulation in the Maltose Transporter. University of Western Ontario - Electronic Thesis and Dissertation Repository. Paper 374.
- [32] Schneider, E. (2001). ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Res. Microbiol.* 152 303–310.

- [33] Mitchell, P. (1973). Chemiosmotic coupling in energy transduction : a logical development of biochemical knowledge. *J. Bioenerg.* 4 : 63-91
- [34] Kundig, W, Ghosh, S, Roseman, S. (1964). Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:1067-1074.
- [35] Saier, M. H., Jr., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Ebner, R., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K., Lee, C. A. et al (1988). Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *Faseb J* 2, 199-208.
- [36] Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57, 543-594.
- [37] Lengeler, J. W., Titgemeyer, F., Vogler, A. P. and Wohrl, B. M. (1990). Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326, 489-504.
- [38] Lengeler, J. W., Jahreis, K. and Wehmeier, U. F. (1994). Enzymes II of the phospho enol pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport. *Biochim Biophys Acta* 1188, 1-28.
- [39] Saier, M. H., Jr. and Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* 13, 755-764.
- [40] Lengeler, J. and Jahreis, K. (1996). Phosphotransferase systems pr PTSs as carbohydrate transport and as signal transduction systems. In *Handbook of Biological Physics*, pp. 573-598. Edited by W. Konings, H. Kaback & J.Lolkema.
- [41] Deutscher, J., Galinier, A. and Martin-Verstraete, I. (2002). Carbohydrate Uptake and Metabolism. In *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells*, pp. 129-150. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- [42] Saier, M. H., Jr., Tran, C. V. et Barabote, R. D. (2006). TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* 34:D181-D186.
- [43] Casabon, I. (2010). Synthèse de Hpr (Ser-P)(His~P) chez *Streptococcus salivarius*. Université Laval-Québec. These. P 265.
- [44] Reizer, J., Reizer, A., Saier, M. H, JR and Jacobson, G. R. (1992). A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. *Protein science*, I, 722 – 726
- [45] Raynaud, S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l’auto acidification chez *Lactococcus lactis*. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Thèse. P 310.
- [46] Roy, A. (1999). Etude de la transcription de l’opéron pts de *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. Université Laval. Mémoire (M. Sc). P 98.
- [47] Reizer, J, Bachem, S, Reizer, A, Arnaud, M, Saier, MH Jr, Stülke, J. (1999) .Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of

- PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 145 (Pt 12):3419-29.
- [48] van den Bogaard, P. T.C. (2002). Catabolite control of sugar metabolism in *Streptococcus thermophilus*. Thesis. University, Wageningen, The Netherland. 168p.
- [49] Meadow, ND, Fox, D. K., Roseman, S. (1990). The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annu Rev Biochem*. 59:497–542.
- [50] Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S. von Wright, A. and Ouwehand A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- [51] Cao, Y, Jin, X, Levin, E. J., Huang, H. Zong, Y., Quick, M., Weng, J., Pan, Y., Love, J., Punta, M., Rost, B., Hendrickson, W. A., Javitch, J. A., Rajashankar, K. R., Zhou, M. (2011). Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. *Nature* 473:50-54.
- [52] Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann. Paris.
- [53] Titgemeyer, F., Hillen, W. (2002). Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:59-71.
- [54] Suarez, C. A., Blancato, V. S., Poncet, S., Deutscher, J. and Magni, C. (2011). CcpA represses the expression of the divergent cit operons of *Enterococcus faecalis* through multiple cre sites. *BMC Microbiology*. 11: 227.
- [55] Storai, J. (2008). Analyse métabolique et transcriptomique de *Streptococcus pneumoniae* en lien avec la production de polysaccharide capsulaire. Université Toulouse These.
- [56] Herro, R. (2006). Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur transcriptionnel des gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*. Université Paris XI. These. P 180.
- [57] van den Bogaard, P. T. C., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P., de Vos, W.M., (2000). Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol*. 2000 Nov;182(21):5982-9.
- [58] Grasnier, M. (1996). Cyclic AMP and catabolite repression. *Res. Microbiol.* 147. 479 – 482
- [59] Leboeuf, C., Auffray, Y., Hartke, A. (2000). Cloning, sequencing and characterization of the ccpA gene from *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 55, Issues 1–3, Pages 109–113
- [60] Mach, H., Hecker, M. and Mach, F. (1984). Evidence for the presence of cyclic adenosine monophosphate in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* Volume 22, Issue 1, pages 27–30,
- [61] Nihashi, J, Fujita, Y. (1984). Catabolite repression of inositol dehydrogenase and gluconate kinase syntheses in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta*. 798(1):88–95.

- [62] Stewart, G. C. (1993). Catabolite repression in the gram-positive bacteria: Generation of negative regulators of transcription. *Journal of Cellular Biochemistry* Volume 51, Issue 1, pages 25–28.
- [63] Leboeuf, C., Leblanc, L., Auffray, Y., Hartke, A. (2000). Characterization of the CcpA gene of *Enterococcus faecalis*: identification of starvation-inducible proteins regulated by CcpA. *J Bacteriol.* 182(20):5799-806.
- [64] Lulko, A, Buist, G, Kok, J, Kuipers, O. P. (2007). Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 12(1-2):82-95.
- [65] Saier, M. H., Jr. (1993). Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51: 62–68.
- [66] Lulko, A. (2011). Stress responses and sugar metabolism in *Bacillus subtilis*: a transcriptomic portrait. University of Groningen. Thesis. pp 173.
- [67] Wray, Jt, L.V., Pettengill, F. K., and Fisher, S. H. (1994) *J Bacteriol* UQ: 1894-1902. In Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global mechanism for the Gram-positive bacteria?
- [68] Hueck, C.J., Hillen, W. (1995). Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria?. *Mol Microbiol* 15(3): 395 – 401.
- [69] Stülke, J. and Hillen, W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54: 849-880
- [70] Jones, B.E., Dossonnet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J., Klevit, R.E. (1997). Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272 : 26530-26535.
- [71] Galinier, A, Deutscher, J, Martin-Verstraete, I. (1999). Phosphorylation of either crh or HPr mediates binding of CcpA to the bacillus subtilis xyn cre and catabolite repression of the xyn operon. *J Mol Biol.* 286(2):307-314.
- [72] Schumacher, M, Allen, G, Diel, M, Seidel, G, Hillen, W, Brennan, R. (2004). Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell.* 118(6):731-741
- [73] Fujita, Y., Miwa, Y., Galinier, A. and Deutscher, J. (1995). Specific recognition of the *Bacillus subtilis* gnt cis-acting catabolite responsive element by a protein complex formed between CcpA and serylphosphorylated HPr. *Mol Microbiol* 17, 953-960 .
- [74] Deutscher, J., Kessler, U. and Hengstenberg, W. (1985). In Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global mechanism for the Gram-positive bacteria? *J eacfer/o/163*: 1203-1209.
- [75] Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H. E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., Hengstenberg, W. (1999). The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol.* 31(1):59-66.
- [76] Deutscher, J., Aké, F. M. D., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., Joyet, P. (2014). The bacterial

phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: Regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein/protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 78(2):231-56.

[77] Aarnikunnas, J. (2006). Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. University of Helsinki. Thesis. pp 67.

[78] Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. and Saier, M. H. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol*, 39, 1366-1381.

[79] Deutscher, J., Kuster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. and Hillen, W. (1995). Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15: 1049–1053.

[80] Stülke, J. and Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2:195-201

[81] Jiménez, L. H. (2008). Une nouvelle vision de la protocoporation entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus débriusckii ssp. bulgaricus* par des approches poste génomiques. Agro PariTech.These. P 233.

[82] Luesink, E. J., van Herpen, R. E. M. A., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. (1998). Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30:789–798.

[83] Miwa, Y. and Fujita, Y. (1990). Determination of the *cis* sequence involved in catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon ; implication of a consensus sequence involved in catabolite repression in the genus *Bacillus*. *Nucleic Acids Res* 18, 7049-7053.

[84] Miwa, Y. and Fujita, Y. (1993). Promoter-independent catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon. *J Biochem* 113,665-671.

[85] Hueck, C. J., Hillen, W. and Saier, M. H., Jr (1994). Analysis of a *cis* active sequence mediating catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Res Microbiol* 45, 503-518.

[86] Monedero, V., Gosalbes, M. J., Perez-Martinez, G. (1997). Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J. Bacteriol.* 179 : 6657-6664

[87] Mahr, K., Hillen, W., Titgemeyer, F. (2000). Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 277-283.

[88] Weickert, M. J. and Adhya, S. (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressor. *J. Biol. Chem.* 267, 15869-15874.

[89] Henkin, T. M., Grundy, F. J., Nicholson, W. L. and Chambliss, G. H. (1991). Catabolite repression of alpha amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a transacting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol Microbiol* 5: 575-584

- [90] Kraus, A., Kuster, E., Wagner, A., Hoffmann, K. and Hillen, W. (1998). Identification of a corepressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol* 30: 955-963/26535
- [91] Chaptal, V. (2006). Etudes structurales et fonctionnelles, de l'HPr Kinase/Phosphorylase, de sa voie de signalisation et de sa nouvelle famille de protéine-kinases à P-loop. Université Paris XI Orsay. Thèse. P 120
- [92] Lewis, M. (2005). The lac repressor. *C R Biol*, 328, 521-548.
- [93] Seidel, G., Diel, M., Fuchsbauer, N. and Hillen, W. (2005). Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and cre in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *Febs J*, 272, 2566-2577.
- [94] Kuster, E., Luesink, E. J., de Vos, W. M., and Hillen, W. (1996). Immunological crossreactivity to the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* is found in many Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 139: 109–115.
- [95] Egeter, O., Bruckner, R. (1996). Catabolite mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol Microbiol*. 21 : 739-749.
- [96] Behari, J., Youngman, P. (1998). A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol*. 180 : 6316-6324.
- [97] Hueck, C J, Hillen, W. (1995). Catabolite repression in *Bacillus subtilis* : a global regulatory mechanism for the gram positive Bacteria ? *Mol Microbiol*. 15 : 395-401.
- [98] Grundy, F. J., Waters, D. A., Allen, S. H. G., and Henkin, T. M. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J. Bacteriol*. 175:7348–7355.
- [99] Tobisch, S, Zuhlke, D, Bernhardt, J, Stulke, J, Hecker, M. (1999). Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 181 : 6996-7004.
- [100] Henkin, T M. (1996). The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 135 : 9-15.
- [101] Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stulke, J., Deutscher, J., and Martin-Verstraete, I. (1997). The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8439–8444.
- [102] Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M.-C., Deutscher, J. and Haiech, J. (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1823–1828.
- [103] Rueff, A. S. (2011). Rôle de Protéines Associées au Cytosquelette Bactérien. Université Paris Sud 11. Thèse. P 103.
- [104] Marchandier, E. (2009). Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Université Paris XI. Thèse. P 332.
- [105] Weidinger, L. A. F. (2010). Systems biology in *Bacillus subtilis* databases for gene

function and software tools for pathway discovery. Univ Göttingen. Thesis.

[106] Schallmeyer, M., Singh A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17.

[107] Doan, T. (2003). Etude fonctionnelle du génome de *Bacillus subtilis* : de nouvelles régulations transcriptionnelles du métabolisme central du carbone. Ecole Doctorale ABIES – Paris Grignon. Thèse. P 292.

[108] Lenaers, B. D. (2007). Relation entre le métabolisme central carboné et la réplication de l'ADN chez la bactérie *Bacillus subtilis*. INRA- Domaine de Vilvert. Mémoire. P 58.

[109] Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature (London)* 390: 249–256.

[110] Moszer, I. (1998). The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Lett.* 430: 28–36.

[111] SubtiList. (1999). In I. Mozer, and A. Danchin (eds.), Data Release R15.1. Institut Pasteur, Paris, France, <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/genome>.

[112] Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev* 41, 711-753.

[113] Vihinen, M. and Mantsala, P. (1990). Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha amylase. *Biotechnol Appl Biochem* 12, 427-435.

[114] Deutscher, J., Galinier, A. and Martin –Verstraete, I. (2002). Carbohydrate uptake and metabolism in *Bacillus subtilis* and its closest relatives : from Genes to Cells, pp. 129 – 150. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. Washington, DC : American Society for Microbiology.

[115] Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H. M., Merzbacher, M., Stülke, J. (2002). Control of the glycolytic gapA operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol.* 45(2):543-53.

[116] Skarlatos, P. and Dahl, M. K. (1998). The glucose kinase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180, 3222–3226

[117] Paulsen, I. T., Nguyen, L., Sliwinski, M. K., Rabus, R. & Saier, M. H., Jr. (2000). Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J Mol Biol* 301, 75-100.

[118] Barabote, R. D. and Saier, M. H. Jr. (2005). Comparative Genomic Analyses of the Bacterial Phosphotransferase System. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(4): 608–634.

[119] Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Kiler, A., Rapoport, G. (1997). Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, Glc T. *Mol Microbiol.* 25(1) : 65-78.

- [120] Bouraoui, H. (2012). Regulation de MtlR, activateur transcriptionnel de l'operon mtl de *Bacillus subtilis*, par le domaine EIIB du transporteur du manitol. Université Paris Sud XI. These. P 142.
- [121] Deutscher, J., Galinier, A. and Martin Verstraete, I. (2002). Carbohydrate uptake and metabolism. In : *Bacillus subtilis* and its closet relatives : from Genes to Cells. Ed. by A. L. Sonenshein et al.
- [122] Schonert, S., Seitz, S., Krafft, H., Feuerbaum, E. A, Andernach, I., et al. (2006). Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 188: 3911–3922.
- [123] Martin, S. A. and Russell, J. B. (1987). Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. Appl Environ Microbiol 53, 2388–2393.
- [124] Webb, A. J., Homer, K. A., and Hosie, A. H. F. (2007). A Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Is the Principal Maltose Transporter in *Streptococcus mutans*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 3322–3327
- [125] Shelburne, S. A., Keith, D. B., Davenport, M. T., Horstmann, N., Brennan, R. G. and Musser, J. M. (2008). Molecular characterization of group A *Streptococcus* maltodextrin catabolism and its role in pharyngitis. Mol Microbiol. Mol Microbiol.69(2): 436–452.
- [126] Monedero, V., Yebra, M. J., Poncet, S., Deutscher, J. (2008). [Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion.](#) Res Microbiol. 159(2):94-102
- [127] Yamamoto, H., Uchiyama, S., Fajar, A. N., Ogasawara, N., Sekiguchi, J. (1996). Determination of a 12 kb nucleotide sequence around the 76 degrees region of the *Bacillus subtilis* chromosome. Microbiology. 42 (Pt 6):1417–1421
- [128] Bidossi, A., Mulas, L., Decorosi, F., Colomba, L., Ricci, S., Pozzi, G., Deutscher, J., Viti, C., Oggioni, M. R. (2012). A Functional Genomics Approach to Establish the Complement of Carbohydrate Transporters in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS ONE 7(3): e33320.
- [129] Yamamoto, H., Serizawa, M., Thompson, J., and Sekiguchi, J. (2001). Regulation of the glv operon in *Bacillus subtilis*: YfiA (GlvR) Is a positive regulator of the operon that is repressed through CcpA and cre. J. Bacteriol. 183: 5110–5121.
- [130] Sutrina, S. L., Reddy, P., Saier, M. H., Jr and Reizer, J. (1990). The glucose permease of *Bacillus subtilis* is a single polypeptide chain that functions to energize the sucrose permease. J Biol Chem 265, 18581±18589.
- [131] Dahl, M. K. (1997). Enzyme IIGlc contributes to trehalose metabolism in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett 148, 233±238
- [132] Reizer, J., Michotey, V., Reizer, A. and Saier, M. H., Jr (1994). Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis : unique, putative fructose- and glucoside-specific systems. Protein Sci 3, 440-450.
- [133] Parker, L. L. and Hall, B. G. (1990). Characterization and nucleotide sequence of the cryptic cel operon of *Escherichia coli* K12. Genetics 124, 455471.
- [134] Robrish S. A., Fales H. M., Gentry-Weeks C., Thompson J. (1994). Phosphoenolpyruvate-dependent maltose:phosphotransferase activity in *Fusobacterium*

mortiferum ATCC 25557: specificity, inducibility, and product analysis. *J Bacteriol.* 176(11): 3250–3256.

[135] Thompson, J., Píkis A., Ruvinov S. B., Henrissat B., Yamamoto H., and Sekiguchi J. (1998). The gene *glvA* of *Bacillus subtilis* 168 encodes a metalrequiring, NAD(H)-dependent 6-phospho- α -glucosidase. Assignment to family 4 of the glycosylhydrolase superfamily. *J. Biol. Chem.* 273:27347– 27356.

[136] Bouma, C. L., Reizer, J., Reizer, A., Robrish, S. A. & Thompson, J. (1997). 6-Phospho- α -d-glucosidase from *Fusobacterium mortiferum*: cloning, expression, and assignment to family 4 of the glycosylhydrolases. *J Bacteriol* 179, 4129±4137.

[137] Burstein, C., Kepes, A. (1971). The α -galactosidase from *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta.* 230:52–63.

[138] Thompson, J., Ruvinov S. B., Freedberg D. I., and Hall B. G.. (1999). Cellobiose- 6-phosphate hydrolase (CelF) of *Escherichia coli*: characterization and assignment to the unusual family 4 of glycosylhydrolases. *J. Bacteriol.* 181: 7339–7345.

[139] Raasch, C., Streit, W., Schanzer, J., Bibel, M., Gosslar, U., Liebl, W. (2000). *Thermotoga maritima* AglA, an extremely thermostable NADp-, Mn2p-, and thiol-dependent α -glucosidase. *Extremophiles.* 4:189–200.

[140] Píkis, A., Immel, S., Robrish, S. A., Thompson, J. (2002). Metabolism of sucrose and its five isomers by *Fusobacterium mortiferum*. *Microbiology.* 148:843–852.

[141] Plunkett, G., Burland, V., Daniels, D. L. and Blattner, F. R. (1993). Analysis of the *Escherichia coli* genome. 111. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. *Nucleic Acids Res* 21, 3391-3398.

[142] De Crecy-Lagard, V., Bouvet, O. M. M., Lejeune, P. and Danchin, A. (1991). Fructose catabolism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Sequence of the pts operon, characterization of the fructose-specific enzymes. *J Biol Chem* 266, 1815418161

[143] Sorensen, K. I., and Hove-Jensen B. (1996). Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *J. Bacteriol.* 178:1003–1011.

[144] Quentin, Y., Fichant G., and Denizot F. (1999). Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J. Mol. Biol.* 287:467–484.

[145] Kamionka, A., and Dahl M. K. (2001). *Bacillus subtilis* contains a cyclodextrin binding protein which is part of a putative ABC-transporter. *FEMS Microbiol.Lett.* 204:55–60.

[146] Tangney, M., Buchanan, C.J., Priest, F.G., and Mitchell, W.J. (1992). Maltose uptake and its regulation in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 97: 191–196.

[147] Dahl, MK. (2002). CcpA-indepenent carbon catabolite repression in bacillus subtilis. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4(3) : 315-21

[148] Nakai, H., Baumann, M.J., Petersen, B. O., Westphal, Y., Schols, H., Dilokpi- moi,A., Hachem,M.A., Lahtinen, S. J., Duus,J.O., and Svensson, B.(2009).The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel α -

glucosides through reverse phosphorolysis by maltose phosphorylase. FEBS J. 276, 7353–7365.

[149] Gänzle, M. G. and Follador, R. (2012), Metabolism of oligosaccharides and starch in *Lactobacilli*: a review In Metabolism of oligosaccharides and starch in *Lactobacilli*: a review, September 2012 | Volume 3 | Article 340

[150] Schonert, S., Buder, T. and Dahl, M. K. (1998). Identification and enzymatic characterization of the maltose-inducible alpha-glucosidase MalL (sucrase isomaltase-maltase) of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 180:2574–2578.

[151] Gopal, S., Berg, D., Hagen, N., Schriefer, E. M., Stoll, R., Goebel, W., Kreft, J. (2010). Maltose and Maltodextrin Utilization by *Listeria monocytogenes* Depend on an Inducible ABC Transporter which Is Repressed by Glucose. PLoS ONE. Volume 5. Issue 4 . e10349

[152] Schonert, S., Buder, T., and Dahl, M.K. (1999). Properties of maltose inducible α -glucosidase in *Bacillus subtilis*: evidence for its contribution in maltodextrin utilization. Res. Microbiol. 150: 167–177.

[153] Kim, J. H., Sunako, M., Ono, H., Murooka, Y. L., Fukusaki, E., and Yamashita, M. (2008). Characterization of gene encoding amulopullulanase from plant originated lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* L137. J. Biosci. Bioeng. 106, 449–459.

[154] Egeter, O., Brueckner, R. (1995). Characterization of a genetic locus essential for maltose maltotriose utilization in *Staphylococcus xylosus*. J. Bacteriol. 177 :2415

[155] Shim, J.H., Park, J. T., Hong, J. S., Kim, K. W., Kim, M. J., Auh, J. H., Kim, Y.W., Park, C. S., Boos, W., Kim, U.W., and Park, K. H. (2009) . Role of Maltogenic Amylase and Pullulanase in Maltodextrin and Glycogen Metabolism of *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. vol. 191 no. 15 4835-4844

[156] Cho, H. Y., Kim Y. W., Kim T. J., Lee H. S., Kim D. Y., Kim J. W., Lee Y. W., Leed S. and Park K. H. 2000. Molecular characterization of a dimeric intracellular maltogenic amylase of *Bacillus subtilis* SUH4-2. Biochim. Biophys. Acta 1478:333-340

[157] Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (1998). Maltose metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and heterologous expression of the key enzymes maltose phosphorylase and phosphoglucomutase. FEMS Microbiol. Lett. 169, 81–86.

[158] Stolz, P., Hammes, W.P. and Vogel, R. F. (1996). Maltose-phosphorylase and hexokinase activity in *Lactobacilli* from traditionally prepared sourdoughs. Adv. Food Sci. 18, 1–6.

[159] Egloff, M. P., Uppenberg, J., Haalck, L., van Tilbeurgh, H. (2001). Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. Structure. 9(8):689-97.

[160] Nakai, H., Baumann, M. J., Petersen, B. O., Westphal, Y., Schols, H., Dilokpimol, A., Hachem, M. A., Lahtinen, S. J., Duus, J. Ø. and Svensson, B. (2009). The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel α -glucosides through reverse phosphorolysis by maltose phosphorylase. FEBS Journal 276. 7353–7365

- [161] Nieto, C., Espinosa, M. and Puyet, A. (1997). The maltose maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*. Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. *J Biol Chem* 272, 30860–30865.
- [162] Puyet, A. and Espinosa, M. (1993). Structure of the maltodextrin- uptake locus of *Streptococcus pneumoniae*. Correlation to the *Escherichia coli* maltose regulon. *J Mol Biol* 230, 800–811.
- [163] Mesak, L. R. and Dahl, M. K. (2000). Purification and enzymatic characterization of PgcM, a b-phosphoglucomutase and glucose-1-phosphate dismutase of *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* 174, 256–264.
- [164] Ani, L. R., Skarlatos, P., Dahl, M. K. (1999). Putative contribution of glucose kinase from *Bacillus subtilis* to carbon catabolite repression (CCR) : a link between enzymatic regulation and CCR ?. *FEMS Microbiology Letters* 17189^96
- [165] Bonnin-Jusserand, M.)2011 .(Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin. Université de Bourgogne.These. P 194.
- [166] Frankenberg, L. (2003). Hemoproteins of *Enterococcus faecalis*. Lund University .Thesis. pp 119.
- [167] Ballering, K. S. (2010). Identification and characterization of a novel genetic determinant of biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. University of Minnesota. PHD . P 140.
- [168] Lammers, M. (2008). Physiology of *Enterococcus faecalis* and *faecium*. University of Utrecht. Master. P 26.
- [169] Aakra, Å., Nyquist, O. L., Snipen, L., Reiersen, T. S., and Nes, I. F. (2007) A survey of genomic diversity in *Enterococcus faecalis* by microarray based comparative genomic hybridization
- [170] Englyst, H. N, Cummings, J. H. (1986). Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 44: 42-50.
- [171] Englyst, H. N, Cummings, J. H. (1987). Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45: 423-431.
- [172] Le Breton, Y., Pichereau, V., Sauvageot, N., Auffray, Y. and Rince, A. (2005). Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol* 98, 806–813.
- [173] Nilsson, U., Rådström, P. (2001). Genetic localization and regulation of the maltose phosphorylase gene, malP, in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. 147(Pt 6):1565-73.
- [174] Martin, S. A. and Russell, J. B. (1987). Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol* 53, 2388–2393.
- [175] Andersson, U. and Radstrom, P. (2002). b-Glucose 1-phosphate interconverting enzymes in maltose- and trehalose-fermenting lactic acid bacteria. *Environ Microbiol* 4, 81–88.
- [176] Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G., Leenhouts, K. (1995). A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol*, 177:7011-7018

- [177] Levander, F., Andersson, U. and Radstrom, P. (2001). Physiological role of b-phosphoglucomutase in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67, 4546–4553.
- [178] O’Sullivan, O., O’Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. and Beresford, T. (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 9 :50.
- [179] Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (2006). The prokaryote third edition A handbook on the biology of bacteria : Bacteria : Firmicutes, cyanobacteria. Volume 4.
- [180] Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L., Huebner, J. (2006). *Enterococcal* colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiol.* 6:60.
- [181] Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* 11, 731–753.
- [182] Ferretti, J.J., McShan, W.M., Adjić, D., Savic, D., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S.S. et al. (2001) Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98,4658–4663.
- [183] Muscariello, L., Vastano, V., Siciliano, R. A., Sacco, M., Marasco, R. (2011). Expression of the *Lactobacillus plantarum* malE gene is regulated by CcpA and a MalR-like protein. *J Microbiol.* 49(6):950-5.
- [184] Anderson, U. and Radstrom, P. (2002). Physiological function of the maltose operon regulator, MalR, in *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiol.* 2 : 28.
- [185] Schlösser, A., Weber, A., Schrempf, H. (2001). Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR. *FEMS Microbiol Lett.* 196(1):77-83.
- [186] Hufnagel, M., Koch, S., Creti, R., Baldassarri, L., Huebner, J. (2004). A Putative Sugar-Binding Transcriptional Regulator in a Novel Gene Locus in *Enterococcus faecalis* Contributes to Production of Biofilm and Prolonged Bacteremia in Mice. *J Infect Dis.* 189:420-430.
- [187] O’Toole, G. A., Gibbs, K.A., Hager, P.W., Phibbs, P.V. Jr., Kolter, R. (2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 182:425–31.
- [188] Mohamed, J. A. and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1581
- [189] Qian, N., Stanley, G. A., Hahn-Haˆgerdal, B., and Rådstrom, P. (1994). Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and their regulation in maltose- and glucose – utilizing cells. *J. Bacteriol.* 176, 5304–5311
- [190] Andersson, U., Levander, F., Radstrom, P. (2001). Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* 16, 276 (46) : 42707-13.

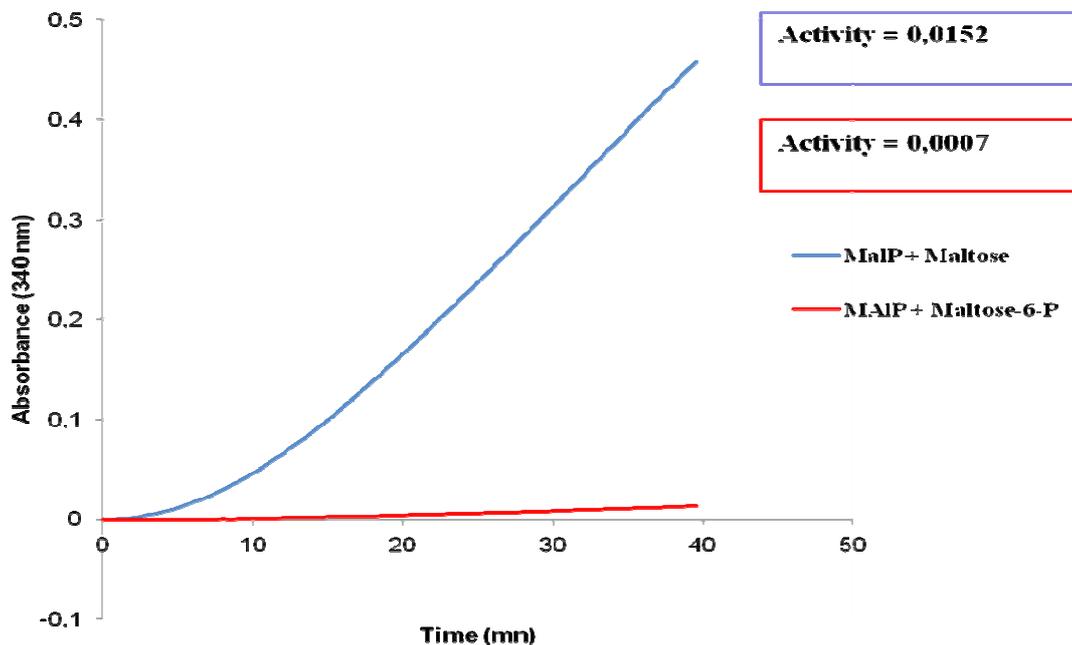
- [191] Rodríguez-Díaz, J., Rubio-del-Campo, A., and Yebra, M.J. (2012). *Lactobacillus casei* ferments the N-Acetylglucosamine moiety of fucosyl-a-1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4613–4619.
- [192] Gough, J.A., and Murray, N.E. (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* **166**: 1–19.
- [193] Jacob, A.E., and Hobbs, S.J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. zymogenes. *J Bacteriol* **117**: 360–372.
- [194] Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S.D., and Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in *Lactococci* and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **178**: 931–935.
- [195] Benachour, A., Auffray, Y., and Hartke, A. (2007). Construction of plasmid vectors for screening replicons from gram positive bacteria and their use as shuttle cloning vectors. *Curr Microbiol* **54**: 342–347.
- [196] Weinrauch, Y., Msadek, T., Kunst, F., and Dubnau, D. (1991). Sequence and properties of *comQ*, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 5685–5693.
- [197] Vagner, V., Dervyn, E., and Ehrlich, S.D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **144**: 3097–3104.
- [198] Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally non transformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887–6891.
- [199] Aké, F.M.D., Joyet, P., Deutscher, J., and Milohanic, E. (2011). Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **81**: 274–293.
- [200] Bizzini, A., Zhao, C., Budin-Verneuil, A., Sauvageot, N., Giard, J.C., Auffray, Y., and Hartke, A. (2010). Glycerol is metabolized in a complex and strain-dependent manner in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **192**: 779–785.
- [201] Darbon, E., Servant, P., Poncet, S., and Deutscher, J. (2002). Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA, and inducer exclusion elicited by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* *glpFK* expression. *Mol Microbiol* **43**: 1039–1052.
- [202] Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741–746.
- [203] Friesenegger, A., Fiedler, S., Devriese, L.A., and Wirth, R. (1991). Genetic transformation of various species of *Enterococcus* by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* **63**: 323–327.
- [204] Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (1980). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester: John Wiley & Sons.
- [205] Aké, F.M.D. (2011). Régulation des principaux transporteurs de glucose et leurs effets sur l'expression des gènes de virulence chez *Listeria monocytogenes*. Université Paris-Sud XI. These. P 225.

- [206] Martin-Verstraete, I., Deutscher, J., and Galinier, A. (1999). Phosphorylation of HPr and Crh by HprK, early steps in the catabolite repression signalling pathway for the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* **181**: 2966–2969.
- [207] 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
- [208] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 – 685.
- [209] Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., and Avaeva, S.M. (1988). A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* **171**: 266–270.
- [210] Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Pérez-Martínez, G., and Deutscher, J. (2000). Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol* **36**: 570–584.
- [211] Pikis, A., Hess, S., Arnold, A., Erni, B., and Thompson, J. (2006). Genetic requirements for growth of *Escherichia coli* K-12 on methyl- α -d-glucopyranoside and the five α -d-glucosyl-d-fructose isomers of sucrose. *J Biol Chem* **281**: 17900–17908.
- [212] Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate Active EnZymes data-base (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* **37**: D233–D238.
- [213] Thompson, J., Gentry-Weeks, C. R., Nguyen, N. Y., Folk, J. E., and Robrish, S. A. (1995). Purification from *Fusobacterium mortiferum* ATCC 2557 of a 6-phosphoryl-O- α -d-glucopyranosyl: 6-phosphoglucohydrolase that hydrolyzes maltose 6-phosphate and related phospho- α -d-glucosides. *J Bacteriol* **177**: 2505–2512.
- [214] Thompson, J., Hess, S., and Pikis, A. (2004). Genes *malh* and *pagl* of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 encode NAD⁺- and Mn²⁺-dependent phospho- α -glucosidase(s). *J Biol Chem* **279**: 1553–1561.
- [215] Nallapareddy, S. R., Duh, R. W., Singh, K. V., and Murray, B. E. (2002) Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **40**: 868–876.
- [216] Thompson, J., Robrish, S. A., Pikis, A., Brust, A., and Lichtenthaler, F. W. (2001). Phosphorylation and metabolism of sucrose and its five linkage-isomeric α -d-glucosyl-dfructoses by *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr Res* **331**: 149–161.
- [217] Woscholski, R., Finan, P. M., Radley, E., Totty, N. F., Sterling, A. E., Hsuan, J. J., *et al.* (1997). Synaptojanin is the major constitutively active phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase in rodent brain. *J Biol Chem* **272**:9625–9628.
- [218] Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber- Heynemann, J., and Lütticken, R. (2002). *rgf* encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **70**: 2434–2440.

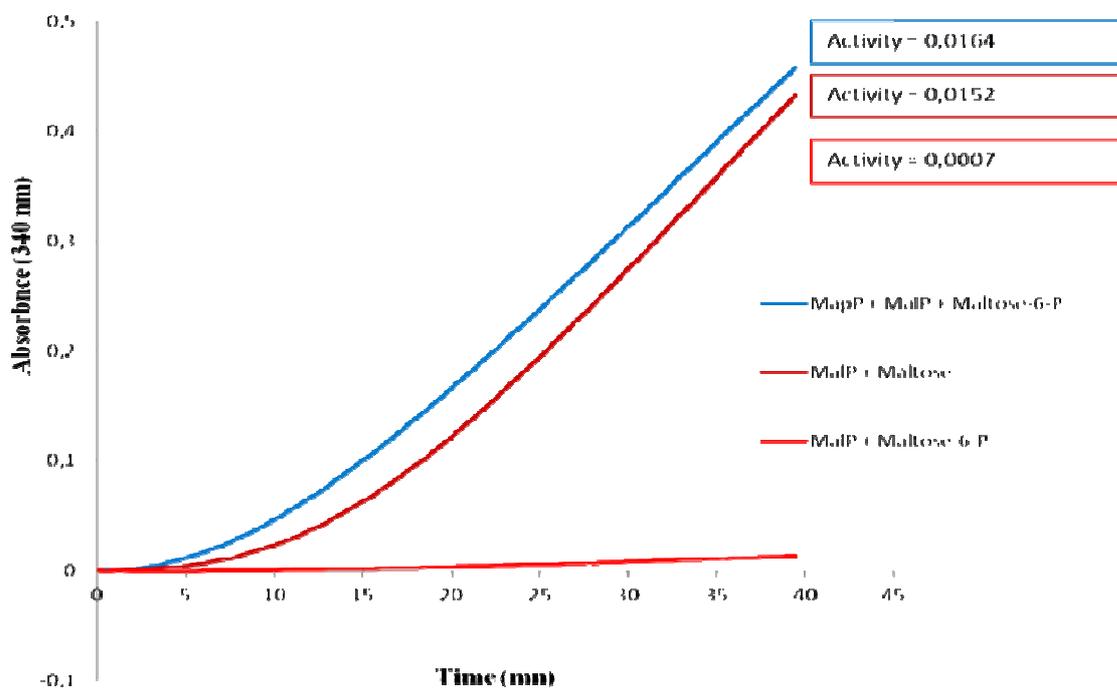
[219] Lohmiller, S., Hantke, K., Patzer, S.I., and Braun, V. (2008). TonB-dependent maltose transport by *Caulobacter crescentus*. *Microbiology* **154**: 1748–1754.

Annexe

Annexe : Courbes de la mise en évidence des activités (a) de la maltose phosphorylase et (b) de la maltose phosphate phosphatase



(a) Mise en évidence de l'activité maltose phosphorylase



(b) Test d'activité de la maltose phosphate phosphatase

Résumé

Résumé

Similairement comme *Bacillus subtilis*, la bacterie *Enterococcus faecalis* est capable de transporter et de phosphoryler le maltose via un système de phosphotranspherase dependant du phosphoenolpyruvate (PEP). Le gène malT code une perméase PTS-dependant qui est spécifique au maltose. Cependant, *E. faecalis* est depourvu du gène codant pour une MalA 6-P- α -glucosidase qui, chez *B. subtilis* hydrolyse le maltose-6'-P en glucose et en glucose-6-P. Au lieu de cela, un opéron codant pour une maltose-phosphorylase (MalP), une phosphoglucomutase et une mutarotase est située en amont de malT. Il a été suggéré que MalP clive le maltose-6-P, formé lors de la translocation du maltose par l'EII (MalT), en glucose-1-P et en glucose-6-P. Cependant, la Malp qui a été purifié avait une activité de phosphorolyse uniquement vis a vis du substrat maltose et non pas le maltose-6-P. Nous avons trouvé que la protéine qui est codé par le gène en aval de malT présenté une nouvelle activité enzymatique, celle de la déphosphorylation du maltose-6'-P. Resultat le maltose-6'-P intracellulaire formée lors du transport PTS est déphosphorylée par MapP et le maltose obtenu est ensuite hydrolysé par MalP en glucose et le glucose-1-P. L'absorption du maltose via le systeme ABC meme avec une faible affinité permet une legere croissance du mutant mapP contrairement au mutant malP qui presente une absence total de croissance. Lorsque la proteine MapP a été synthétisé par un mutant de *B. subtilis* accumulant le maltose 6'-P sa croissance est restauré sur le maltose. La proteine MapP déphosphoryle probablement le maltose-6'-P qui est accumulé dans *B. subtilis* et le maltose obtenu est hydrolysé par phosphorolyse par la maltose phosphorylase YvdK. Donc La MapP relie le systeme PTS qui est impliqué dans l'absorption du maltose à la vois metabolique de l'utilisation du maltose par l'intermediaire de la maltose phosphorylase. Les essais de déphosphorylation avec divers - substrats phosphorylés ont révélé que MapP déphosphoryle de préférence les disaccharides reliés par une liaison O-glycosidique.

Abstract

Similar to *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* transports and phosphorylates maltose via a phosphoenolpyruvate (PEP) : maltose phosphotransferasesystem (PTS). The maltose-specific PTS permease is encoded by the *maltT* gene. However, *E. faecalis* lacks a *malA* gene encoding a 6-phospho- α -glucosidase, which in *B. subtilis* hydrolyses maltose 6-P into glucose and glucose 6-P. Instead, an operon encoding a maltose phosphorylase (MalP), a phosphoglucomutase and a mutarotase starts upstream from *maltT*. MalP was suggested to split maltose 6-P into glucose 1-P and glucose 6-P. However, purified MalP phosphorylates maltose but not maltose 6-P. We discovered that the gene downstream from *maltT* encodes a novel enzyme (MapP) that dephosphorylates maltose 6-P formed by the PTS. The resulting intracellular maltose is cleaved by MalP into glucose and glucose 1-P. Slow uptake of maltose probably via a maltodextrin ABC transporter allows poor growth for the *mapP* but not the *malP* mutant. Synthesis of MapP in a *B. subtilis* mutant accumulating maltose 6-P restored growth on maltose. MapP catalyses the dephosphorylation of intracellular maltose 6-P, and the resulting maltose is converted by the *B. subtilis* maltose phosphorylase into glucose and glucose 1-P. MapP therefore connects PTS-mediated maltose uptake to maltose phosphorylase-catalysed metabolism. Dephosphorylation assays with a wide variety of phosphosubstrates revealed that MapP preferably dephosphorylates disaccharides containing an O-aglycosyl linkage.

ملخص

على غرار *Bacillus subtilis* وسائل النقل وفسفرة المالتوز عبر الفوسفواينولبيروفات (PEP): نظام ناقلة المالتوز المفسفر (PTS) مشابهة عند البكتيريا *Enterococcus faecalis*. يتم ترميز بيرمياز PTS المالتوز المشفرة من قبل الجين malT. ومع ذلك *Enterococcus faecalis* ، يفتقر إلى الجين malA الذي يشفر لإنزيم P-6α وسفات-جلوكوزيداز (6-phospho-α-glucosidase) ، التي عند *Bacillus subtilis* تحلل المالتوز P-6 إلى جلوكوز والجلوكوز P-6. ومع ذلك تحتوي على الاوبرون يشفر فسفوريلاز المالتوز (MalP) وفسفوغلوكوموتاز وموتاروتاز التي تقع قبل الجين (malT).

واقترح (MalP) لتقسيم المالتوز P-6 إلى جلوكوز P-1 والجلوكوز P-6. ومع ذلك، (MalP) التي تم تنقيتها تقوم بتحليل phosphorolyses المالتوز و ليس المالتوز 6 ف. اكتشفنا أن هذا الجين الذي يقع قبل malT يشفر لإنزيم جديد (MapP) الذي ينزع الفوسفات (dephosphorylation) من المالتوز P-6 الذي يشكل من قبل ال PTS. ونتيجة ذلك المالتوز داخل الخلايا الناجم عن malT ينحل إلى الجلوكوز والجلوكوز P-1. الامتصاص البطيء للمالتوز ربما عن طريق نقل مالتوديكسترين ABC يسمح للنمو ضعيف MapP لكن ليس الطفرة MalP. تركيب MapP في *Bacillus subtilis* يؤدي إلى تراكم المالتوز P 6 واستعادة النمو على المالتوز. MapP تحفز نزع الفوسفات من المالتوز P6 الخلايا ، ويتم تحويل المالتوز الناجم عن ذلك إلى فسفوريلاز المالتوز *Bacillus subtilis* إلى الجلوكوز والجلوكوز P-1. لذا MapP يربط PTS بواسطة امتصاص المالتوز إلى مالتوز الأيض محفز فسفوريلاز. وكشفت فحوصات نزع الفوسفات مع مجموعة واسعة من phosphosubstrates التي MapP يفضل déphosphorylation المركبات السكرية الثنائية التي تحتوي على الربط - O aglycosyl