



HAL
open science

Étude et comparaison de l'utilisation des sucres aminés chez *E.coli* et chez *B.subtilis*

Isabelle Gaugué

► **To cite this version:**

Isabelle Gaugué. Étude et comparaison de l'utilisation des sucres aminés chez *E.coli* et chez *B.subtilis*.
Alimentation et Nutrition. 2012. dumas-01076672

HAL Id: dumas-01076672

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01076672v1>

Submitted on 22 Oct 2014

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

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

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS
PARIS

Mémoire
présenté en vue de l'obtention
du **DIPLÔME d'INGÉNIEUR CNAM**

Spécialité : Sciences et techniques du vivant
Option : Génie biologique

par
Isabelle Gaugué

**Étude et comparaison de l'utilisation des sucres aminés chez *E.coli*
et chez *B.subtilis***

soutenu le 25 mai 2012

Jury

PRÉSIDENT : Marie-Irène Malewiak, PU

MEMBRES : Josef Deutscher, DR CNRS

Isabelle Martin-Verstraete, PU

Jacqueline Plumbridge, DR CNRS et responsable de stage

Philippe Pochart, PU

Remerciements

Je remercie Joseph Deutscher et Isabelle Martin-Verstraete d'avoir accepté d'être membres de mon jury pour la soutenance d'ingénieur.

Je remercie tout particulièrement Jackie pour son enseignement scientifique, son soutien, son aide et surtout sa patience. Ces deux ans passés m'ont apporté énormément aussi bien scientifiquement qu'humainement.

Je tiens aussi à remercier Harald Putzer et Soumaya Laalami pour leurs conseils sur B.subtilis, leur soutien et leur aide.

Un grand merci à Patrick Stragier pour son aide l'année dernière sur le sujet de la sporulation.

Un énorme merci à mes collègues, Anais, Céline, Marie, Emmeline, Fanette, Lamy, Florette et Sabine ainsi que Sylvain, Mathieu, Rémi, Valério et Jérémie.

Merci à Dominique qui travaille avec moi tous les jours.

Merci au labo 103 pour l'année 2009 passée ensemble, l'enrichissement scientifique et tous les bons souvenirs que je garde.

Merci au labo 226 pour les bons moments passés ensemble.

Merci à tous les autres membres de l'UPR9073 pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	2
Abstract	6
Abréviations	7
Figures	9
Tables	11
I. Introduction	12
I.1. Généralités	12
I.2. Les sucres aminés	14
2.1 Généralités	14
2.2. Rôle	15
I.3. Transport des sucres aminés	16
3.1. Type de Transport	17
3.1.1. Transport facilité	17
3.1.2. Transport primaire dépendant de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP)	17
3.1.3. Transport actif secondaire	18
3.1.4. Transport par le système Phospho-Transférase (PTS)	18
3.1.4.1. Les composants du PTS	21
3.1.4.1.1. Les protéines générales, EI et HPr	21
3.1.4.1.2. Les complexes EIIs	22
3.2 Régulation des gènes du PTS chez <i>E.coli</i>	23
3.2.1 L'opéron <i>ptsHICrr</i>	23
3.2.2 Le gène <i>ptsG</i>	23
3.3 Régulation par le système PTS	28
3.3.1 Répression catabolique	31
3.3.2 Exclusion d'inducteur	34
I.4 Le métabolisme des sucres aminés	35
4.1 Catabolisme	35
4.1.1 L'enzyme allostérique NagB chez <i>E.coli</i>	37
4.1.2. Le répresseur NagC et l'expression de l'opéron <i>nagE-nagBACD</i>	38
4.2 Anabolisme	39

I.5	Comparaison d' <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	41
II.	Matériels et méthodes.....	45
2.1	Méthodes bactériologiques	45
2.2	Interruption des gènes et mise en place du système de cassette excisable par l'enzyme Flippase chez <i>B.subtilis</i>	46
2.2.1	Clonage des régions chromosomiques de <i>B.subtilis</i>	46
2.2.2	Remplacement des gènes <i>gam</i> et <i>nag</i> par les cassettes de résistance à la spectinomycine dans les plasmides.	49
2.2.3	Remplacement des gènes sur le chromosome de <i>B.subtilis</i>	54
2.2.4	Construction d'un plasmide exprimant la Flippase chez <i>B.subtilis</i> et curage des cassettes <i>FRT spec</i>	54
2.3	Miniprep d'ADN chromosomique de <i>B.subtilis</i>	57
2.4	Extraction d'ARN de <i>B.subtilis</i>	57
2.5	Marquage des oligos ou du pBR322 digéré par MspI par la T4 polynucleotide kinase (PNK).....	58
2.6	Northern Blot	59
2.7	Extension d'amorces ou transcription inverse	60
2.8	Construction des fusions <i>lacZ</i>	61
2.9	Préparation des extraits bactériens pour le dosage de la β -galactosidase et du Western Blot	62
2.10	Dosage des protéines par la méthode de Bradford et dosage de la β -galactosidase.....	63
2.11	Western Blot.....	64
2.12	Purification protéique	65
2.13	Empreinte à la DNase I	67
III.	Résultats	72
3.1	Etude des fonctions des gènes <i>nag</i> et <i>gam</i> chez <i>B.subtilis</i>	72
3.2	Etudes de l'expression des gènes <i>nag</i> et <i>gam</i>	76
3.2.1	Identification des transcrits.....	76
3.2.2	Site de démarrage des transcrits <i>gamA</i> , <i>nagA</i> et <i>nagP</i>	78
3.2.3	Quantification de l'expression des gènes par dosage des fusions avec <i>lacZ</i> ..	79
3.2.4	Identifications des régions régulatrices fixant YbgA et YvoA des gènes <i>gamA</i> , <i>nagA</i> et <i>nagP</i>	83
IV.	Discussion	87

4.1	Fonction des gènes <i>gam</i> et <i>nag</i>	87
4.2	Régulation des gènes <i>gam</i> et <i>nag</i>	88
4.3	La régulation par YvoA et YbgA.....	92
V.	Conclusions et Perspectives	96
	Annexes.....	99
	Bibliographie.....	100

Abstract

Amino sugars are essential in all organisms and they are part of many subcellular structures in eukaryotes and bacteria. Metabolic pathways involving amino sugars have not been studied in detail in other organisms besides *E.coli*. Analysis of the genomic sequence of *B.subtilis* has identified genes presumed to be involved in the use of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucosamine (GlcN), namely two PTS (phosphotransferase system) transporters homologous to NagE of *E.coli* (GamP and NagP), two copies of NagB encoding the enzyme GlcN-6-phosphate (GlcN6P) deaminase (NagB and GamA) and a gene for GlcNAc6P deacetylase (NagA). These genes are located in two operons (*hprK nagAB yvoA* and *ybgA-gamAP*) and a isolated gene for *nagP*. Our ANR funded project "Study and comparison of the use of amino sugars in *E coli* and in *B.subtilis*" aims to produce a detailed description of the use of amino sugars in the two diverged bacterial species.

In *B.subtilis*, unlike *E. coli*, growth on GlcN is faster than on GlcNAc. To study the functions of the *nag* and *gam* genes, we developed a system to make gene deletions using an exisable antibiotic resistance cassette which allows the accumulation of mutations in multiple loci. Our study showed that GamA is essential for the use of GlcN and NagA essential for the use of GlcNAc. GamP and NagP are required for the transport of GlcNAc but GamP or PtsG (PTS transporter for glucose) is sufficient for transport of GlcN. NagB seems to have little effect. These results were confirmed by the study of expression of *nag* and *gam* genes by primer extension, Northern blots, fusions with β -galactosidase and Westerns blots. This study also showed that the transcriptional regulators of the GntR family, YbgA and YvoA, are transcriptional repressors of their respective operons and their binding sites were identified by DNaseI footprinting. The binding of YbgA seems sensitive to GlcN6P but the regulation by YvoA seems more complex.

The *gamAP* operon, which exists only in *B.subtilis*, is now the best expressed of the *nag* related genes and GamA is responsible not only for growth on GlcN but also for most of the growth on GlcNAc.

Keywords: *B.subtilis*, metabolism of amino sugars, GlcN, GlcNAc, and PTS transporter GlcN6P deaminase and GlcNAc6P deacetylase, transcriptional repressors.

Abréviations

aa : acide aminé

ABC : ATP Binding Cassette

AC : Adénylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMPc : Adénosine mono-phosphate cyclique

ATP: Adénosine triphosphate

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNr: ARN ribosomique

ARN_t: ARN de transfert

B.subtilis: *Bacillus subtilis*

CAP: Catabolite activator protein (= CRP = cAMP receptor protein)

CAT : Co-antiterminator

CcpA: Catabolite control protein A

CCR : Carbon Catabolite Repression

Crh : Catabolite repression HPr

crr : carbohydrate repression resistance

DHAP: Dihydroxyacétone-phosphate

dNTP: diNucléotide triphosphate

DO : densité optique

dre : DasR responsive element

E.coli: *Escherichia coli*

EI / EII: Enzyme I / Enzyme II

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

FBP: Fructose-1,6-Bisphosphate

Fru6P: Fructose-6-Phosphate

G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate

GalNAc: N-acétylgalactosamine

Glc: Glucose

Glc6P: Glc-6-Phosphate

GlcN: Glucosamine

GlcN6P: GlcN-6-Phosphate
GlcNAc: N-acétylglucosamine
GlcNAc6P: GlcNAc-6-Phosphate
HBP: Hexosamine Biosynthetic Pathway
HPr: Histidine-containing protein of the PTS
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITC: Isothermal Titration Calorimetry
kDa: kiloDalton
LPS: lipopolysaccharides
ManNAc: N-acétylmannosamine
MBP: Maltose binding protein
MIP: Major intrinsic permease
MurNAc : acide N-acétylmuramique
NeuNAc : acide N-acétylneuraminique
NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
OEPCR: Overlap Extension PCR Cloning
ONPG: Ortho-nitrophényl- β -galactoside
ORF : Open Reading Frame = Cadre ouvert de lecture
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Pb : Paire de base
PCR: Polymerase Chain Reaction
PEP: Phospho-Enol Pyruvate
PG: Peptidoglycane
PRD: PTS Regulator Domain
PTS: Phosphotransferase system
RAT: RNA AntiTerminator
SD: Shine-Dalgarno
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SIS : Domaine C-terminal isomérase de sucre
TD : Temps de Doublement
UAS : Upstream Activating Site
UDP: Uridine Di-Phosphate
UTR : Untranslated region

Figures

Figure 1 :	Voies pour le métabolisme de la GlcNAc, de ManNAc et NeuNAc (acide sialique) chez <i>E. coli</i>.	p.16
Figure 2:	Représentation schématique du système PTS et la cascade de phosphorylation qu'il induit.	p.19
Figure 3 :	Modèle de régulation du gène <i>ptsG</i> par le petit ARN SgrS.	p.25
Figure 4 :	CCR chez <i>B.subtilis</i>.	p.31
Figure 5 :	Activité régulatrice du système PTS impliquant la protéine EIIA^{Glc} chez <i>E.coli</i>.	p.33
Figure 6:	Le régulon <i>nag</i> et les voies de formation du GlcNAc6P dans <i>E.coli</i>.	p.35
Figure 7:	Structure de l'opéron divergent <i>nagE-nagBACD</i> et les fonctions des gènes codants.	p.36
Figure 8:	Les gènes codant les protéines homologues sont représentés avec des ombrages de même couleur.	p.41
Figure 9:	Résumé des voies influencées par YvoA (NagR).	P.43
Figure 10 :	Principe de la méthode « Overlap extension PCR cloning ».	p.52
Figure 11 :	Structure de la cassette FRT-spec.	p.53
Figure 12 :	Structure du plasmide pYH/<i>pSpac_LacI flp</i>.	p.55
Figure 13 :	Curage de la cassette Spectinomycine	p.56

Figure 14 :	Exemple de séquence portant les 50 pb-ps4-scar-ps1-50 pb.	p.57
Figure 15 :	Northern blot : système de transfert d'acides nucléiques du haut vers le bas.	p.60
Figure 16 :	Exemple des gels des purifications de protéine.	p.67
Figure 17 :	Principe de l'empreinte à la DNase I	p.69
Figure 18 :	Croissance des mutants sur GlcN et GlcNAc.	p.73
Figure 19 :	Histogramme des temps de doublement (TD) en minutes des mutants en croissance sur GlcN et GlcNAc.	p.75
Figure 20 :	Northern Blot pour déterminer la taille des transcrits.	p.76
Figure 21 :	Identification des sites de démarrage des transcrits <i>gam</i> et <i>nag</i>.	p.79
Figure 22 :	Activité β-galactosidase des fusions transcriptionnelles <i>lacZ</i> dans <i>B.subtilis</i> sauvage en présence des sucres Glc, GlcN et GlcNAc.	p.80
Figure 23 :	Activité β-galactosidase des fusions fusions transcriptionnelles <i>lacZ</i> dans <i>B.subtilis</i> mutée pour <i>yvoA</i>, pour <i>ybgA</i> et <i>yvoA+ybgA</i>.	p.81
Figure 24 :	Quantification par Western Blot de GamA et de NagB dans <i>B.subtilis</i> sauvage (cultivés dans différentes conditions) et muté pour les régulateurs, YbgA ou YvoA.	p.82
Figure 25:	Fixation d'YvoA et d'YbgA aux régions régulatrices de <i>gamA</i>, <i>nagA-hprK</i> et <i>nagP</i> et l'effet de Glc6P, GlcN6P, GlcNAc6P.	p.85
Figure 26 :	Localisation des sites de fixation d'YbgA et d'YvoA sur les régions régulatrices de <i>nagP</i>, <i>hprK-nagA</i> et <i>ybgA-gamA</i>.	p.95

Tables

Table 1:	Souches utilisées et leurs génotypes	p.45
Table 2 :	Récapitulatif de toutes les constructions plasmidiques réalisées	p.70
Table 3 :	Récapitulatif de tous les oligos utilisés	p.71

I. Introduction

I.1. Généralités

Les sucres aminés sont ubiquitaires. Ils peuvent être considérés comme une classe spéciale de sucres car ils sont des composants essentiels de nombreuses structures sous-cellulaires. Le sucre aminé le plus simple, la glucosamine (GlcN), et l'enzyme qui synthétise la GlcN-6-Phosphate (GlcN6P synthétase) sont trouvés dans tous les organismes. Cette enzyme a été conservée à travers l'évolution. Beaucoup de sucres aminés différents ont été identifiés dans la nature et tous sont dérivés de la GlcN. En dehors de celle-ci, les plus fréquemment trouvés sont la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et les acides sialiques. Comme monomères, les sucres aminés sont impliqués à la fois dans les voies anaboliques et cataboliques. Nous les trouvons dans les composants de la paroi cellulaire des bactéries, dans les glycopolyglycanes et les glycoprotéines des matrices extracellulaires des cellules eucaryotes et dans la chitine, molécule structurale des exosquelettes des insectes, des crustacés et des parois des champignons *etc.*.

Les enzymes impliquées dans la dégradation des complexes contenant des sucres aminés, par exemple les chitinases, les glycosaminidases et les hydrolases, sont plus ou moins bien identifiés selon les organismes. Les produits ultimes de la dégradation de tous ces complexes sont le GlcN6P et le GlcNAc6P qui sont des sources d'énergie.

Par ailleurs, les sucres aminés jouent un rôle important dans la régulation moléculaire. Les intermédiaires de dégradation contenant les sucres aminés sont souvent des molécules de signal, comme les facteurs NOD (nodule) chez les plantes (Hamel & Beaudoin, 2010), ou de reconnaissance cellulaire chez les mammifères. Chez les procaryotes, des bactéries du sol telles que *Streptomyces* produisent beaucoup de métabolites secondaires incluant des antibiotiques et des agents anti-tumoraux. Leur formation est couplée au développement de structures aériennes (sporulation) de cette bactérie qui est déclenché par l'état nutritionnel de l'habitat, plus précisément par l'épuisement des ressources. En condition de famine, une haute concentration de GlcNAc, provenant de la dégradation de la paroi cellulaire de *Streptomyces*, est un point de contrôle majeur pour l'apparition du métabolisme secondaire. Il déclenche le développement des structures aériennes et la production d'antibiotiques. Le répresseur transcriptionnel, DasR, qui contrôle les gènes cataboliques du régulon du GlcNAc et est inhibé par la GlcN6P, contrôle aussi la production des antibiotiques et le métabolisme

secondaire en les inhibant lorsqu'il est actif. En condition riche, le GlcNAc provenant de la dégradation de la chitine, empêche la production d'antibiotiques (Rigali *et al.*, 2008). Ceci suggère donc que la cellule peut distinguer entre le GlcNAc dérivé de la chitine (signal de l'abondance des nutriments) et le GlcNAc dérivé de la lyse de la paroi cellulaire (signal de la famine).

De plus, les sucres aminés sont impliqués dans l'équilibre entre les bactéries et leurs hôtes. L'exemple des fimbriae de type 1 chez *E.coli* illustre cette relation. Les fimbriae de type 1 sont des adhésines, produits par les bactéries non-pathogènes ainsi que par les pathogènes. Chez ces derniers, ils sont connus comme facteurs de virulence (infection du tractus urinaire) ou suspectés de l'être. Les fimbriaes sont pro-inflammatoires, ce qui provoque une réponse immunitaire de l'hôte qui relâche des sucres aminés. L'expression des gènes *fim* d'*E.coli* est réprimée par l'acide sialique et la GlcNAc. En conséquence, les sucres aminés libérés par l'hôte pendant la réponse immunitaire, servent à diminuer la fimbriation, et donc l'inflammation. Le contrôle de *fimB* par l'acide sialique et le GlcNAc permet d'intégrer les signaux de l'environnement avec ceux provenant de l'intérieur de la cellule (McVicker *et al.*, 2011, Sohanpal *et al.*, 2004).

Les sucres aminés sont impliqués dans des maladies chez l'homme telles que le diabète de type 2 ou l'arthrose. Malgré le fait que la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP= hexosamine biosynthetic pathway) soit une branche mineure de la glycolyse, elle est fortement impliquée dans l'étiologie du diabète de type 2. HBP fonctionne comme un capteur de nutriments cellulaires et joue un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline et les complications vasculaires du diabète (Buse, 2006, Wells *et al.*, 2003).

D'autre part, la GlcN et la chondroïtine (un glycosaminoglycane), produits endogènes dans le corps humain et composants essentiels du cartilage, sont utilisées pour aider à soulager les symptômes et retarder la progression de l'arthrose (Huskisson, 2008). L'augmentation de l'utilisation du GlcN et de ses dérivés dans les domaines paramédicaux montre qu'il est pertinent et important de comprendre l'effet des sucres aminés à la fois chez l'homme et chez les bactéries commensales.

Vu la vaste gamme de réactions et d'interactions impliquant les sucres aminés, il est important de connaître les mécanismes métaboliques responsables de leur homéostasie. Pour mieux comprendre la variété de réponses, il est nécessaire de comprendre l'origine de ces sucres aminés dans les différents organismes. Les voies du métabolisme des sucres aminés n'ont pas été étudiées en détail dans d'autres organismes qu'*E.coli* ; il en est de même de la

régulation de l'expression des gènes impliqués et de la coordination de leur biosynthèse et de leur catabolisme.

Bacillus subtilis, organisme modèle des bactéries à Gram positif comme *Escherichia coli* l'est pour les bactéries à Gram négatif, fait partie des bactéries les plus étudiées et les mieux comprises. Elle est retrouvée partout dans le sol et se nourrit de matière organique non vivante (bactérie « saprophytes »).

En comparant les deux bactéries modèles, *E.coli* et *B.subtilis*, il est devenu évident que ces deux organismes ne manipulent pas le problème de la coordination de la synthèse et de la dégradation des sucres aminés de la même façon. Des différences existent à la fois au niveau des protéines impliquées et leurs régulations. L'utilisation des sucres aminés n'a pas été étudiée systématiquement chez *B.subtilis* mais l'analyse de la séquence a identifié plusieurs opérons PTS (système Phospho-Transférase) pouvant être impliqués dans l'utilisation de GlcNAc ou de GlcN (Reizer *et al.*, 1999). Notre objectif est de produire une description détaillée du métabolisme des sucres aminés dans les deux espèces bactériennes divergées.

Dans ce premier chapitre, je traiterai dans un premier temps des sucres aminés et de leur transport pour ensuite m'attarder sur le métabolisme du GlcNAc chez *E.coli* et chez *B.subtilis* et enfin terminer sur ce que nous savons des divergences de ce métabolisme entre ces deux organismes.

I.2. Les sucres aminés

2.1 Généralités

Les sucres aminés sont retrouvés dans tous les organismes. Le sucre aminé le plus simple est la glucosamine (GlcN). L'enzyme ubiquitaire qui synthétise le GlcN-6-Phosphate (GlcN6P) est la GlcN6P synthétase (gène *glmS*). Elle est responsable de la synthèse *de novo* du GlcN6P à partir du Fru6P et de la glutamine (Fig.1). Cette enzyme a été conservée à travers l'évolution et est composée de deux domaines, un domaine N-terminal amino-transférase et un domaine C-terminal isomérase de sucre (SIS). Tous les sucres aminés identifiés dans la nature sont dérivés du GlcN.

Les sucres aminés les plus répandus sont des hexosamines, GlcN et N-acétylglucosamine (GlcNAc) et la famille de sucres à neuf carbones que sont les acides

sialiques dérivés de l'acide N-acétylneuramique. D'autres sucres aminés existent, comme le N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylmannosamine (ManNAc) et le lactosamine.

La source la plus abondante de GlcN et GlcNAc est la chitine. C'est un polymère de haut poids moléculaire composé de résidus GlcNAc avec une liaison β 1-4, trouvé dans la paroi cellulaire de champignons et l'exosquelette des insectes et des arthropodes, surtout dans les milieux marins (Keyhani & Roseman, 1999).

2.2. Rôle

Les sucres aminés sont présents dans des biopolymères simples ou complexes. Ils sont à la fois des composants essentiels des structures sous-cellulaires comme le peptidoglycane (PG) des parois bactériennes, les glycosaminoglycanes de hauts poids moléculaire et les glycoprotéines de la matrice extracellulaire des eucaryotes supérieurs, et ils sont aussi des sources d'énergie chez la plupart des organismes. Chez les bactéries, les sucres aminés sont principalement présents dans le peptidoglycane (PG), une alternance de GlcNAc et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) dont les chaînes sont liées par des ponts peptidiques constituant l'épine dorsale du PG, et forment une épaisse paroi cellulaire. Les sucres aminés sont aussi trouvés dans les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli* et dans certaines capsules extracellulaires.

L'UDP-GlcNAc, premier précurseur dédié aux composants de la paroi cellulaire, est synthétisé à partir du GlcN6P, et sert de donneur de sucres aminés dans plusieurs réactions de transfert dans la synthèse du PG, la moitié du lipide A du LPS, l'antigène commun entérobactérien, certains antigènes O des bactéries à Gram-négatif. Il est également utilisé pour la synthèse d'autres sucres, comme la ManNAc (Lin, 1996).

Beaucoup des glycoconjugués (glycoprotéines et glycolipides) des surfaces des cellules de mammifères contiennent des sucres aminés, en particulier des résidus d'acide sialique, dont les chaînes d'oligosaccharides de ces glycoconjugués sont des ligands important pour la reconnaissance cellulaire. Les acides sialiques constituent une série de dérivés N- et O- substitués de l'acide N-acétylneuraminique (NeuNAc), un composé qui est formé par la condensation de ManNAc et du pyruvate. Certaines bactéries peuvent dégrader les chaînes complexes d'oligosaccharides des glycoconjugués, et beaucoup d'entre elles peuvent utiliser les acides sialiques comme source de carbone et d'azote (Fig.1). Contrairement à cette voie

catabolique très répandue chez les bactéries, relativement peu d'espèces, principalement des pathogènes, sont capables de synthétiser l'acide sialique pour l'intégrer ensuite dans les structures de surface (Plumbridge & Vimr, 1999).

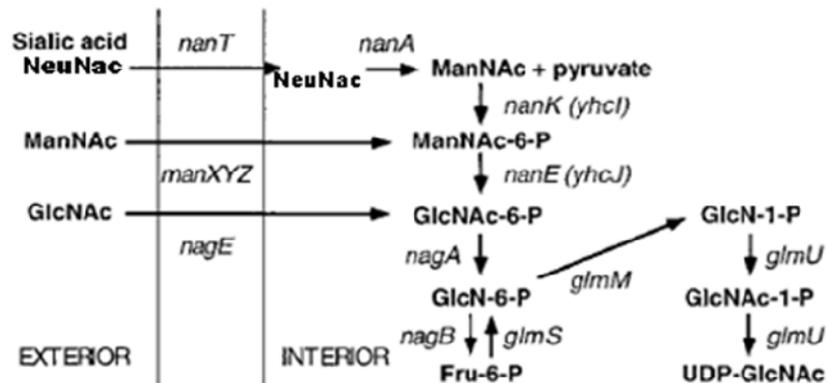


Figure 1 : Voies pour le métabolisme de la GlcNAc, de ManNAc et NeuNAc (acide sialique) chez *E. coli*. Le GlcNAc est transporté à la fois par le transporteur codé par *manXYZ* et son propre transporteur spécifique codé par *nagE*, produisant du GlcNAc-6-P intracellulaire, qui est dégradé par les enzymes codées par *nagA* et *nagB*. La voie biosynthétique, produisant de l'UDP-GlcNAc pour l'incorporation dans les composants de la paroi cellulaire, implique les produits des gènes *glmS*, *glmM* et *glmU*. ManNAc peut être transporté par le transporteur ManXYZ, produisant du ManNAc-6-P intracellulaire. NeuNAc est transporté comme sucre libre par un symporteur sucre-cation codé par *nanT*. À l'intérieur de la cellule, NeuNAc est clivé par l'aldolase codé par *nanA* pour donner ManNAc et du pyruvate. ManNAc intracellulaire est phosphorylé en ManNAc-6-P qui est ensuite converti en GlcNAc-6-P, le substrat de la désacétylase codée par *nagA*. Ainsi les voies de dégradation de NeuNAc, ManNAc et GlcNAc convergent au niveau de GlcNAc-6-P (Plumbridge & Vimr, 1999).

I.3. Transport des sucres aminés

Les différentes espèces de bactéries ont la capacité plus au moins grande d'utiliser, selon leur "niche" environnementale, une variété importante de nutriments et elles peuvent continuellement s'adapter aux changements de conditions environnementales. Pour permettre le passage des différentes sources de carbones, il existe quatre différents types de transport, un transport passif ou un transport actif, lui-même subdivisé en plusieurs classes suivant la source d'énergie utilisée.

3.1. Type de Transport

3.1.1. Transport facilité

Le transport facilité ne nécessite aucune énergie. Il permet le passage de petites molécules en fonction du gradient de concentration. Ce transport se fait soit par des canaux ioniques, soit par des transporteurs.

E. coli possède un seul représentant de cette famille de transport, la protéine GlpF, facilitateur de transport du glycérol. Cette protéine est une aqua-glycéro-porine de la famille des protéines intrinsèques majeures (Major Intrinsic Protein = MIP) ayant une structure homo-tétramérique de 281 acides aminés (aa) et d'environ 30 kiloDalton (kDa) avec six domaines transmembranaires liés par cinq boucles. Chaque monomère forme un canal et fonctionne indépendamment des autres. La concentration en nutriments étant souvent très faible dans la nature, le mécanisme de "diffusion facilitée" n'est pas suffisant dans la plupart des cas, d'où la nécessité d'avoir des systèmes de transport actif plus efficaces (Fu *et al.*, 2000).

3.1.2. Transport primaire dépendant de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP)

Ce type de transport utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les molécules contre leurs gradients électrochimiques.

L'exemple le plus étudié chez *E. coli* est celui du transport de maltose où beaucoup de protéines sont impliquées. Le maltose diffuse passivement et sélectivement dans le périplasma à travers la maltoporine LamB (produit du gène *lamB* de l'opéron *malK-lamB-malM*). Cette protéine est homo-trimérique et sa structure rappelle celle des porines organisées en "tonneaux β ". Une fois dans le périplasma, le maltose est pris en charge par le système de transport de type ABC (ATP Binding Cassette), correspondant à la protéine MalK (produit du gène *malK*) et les protéines MalE, MalF et MalG codées par l'opéron *malEFG* (Revue dans Boos & Shuman, 1998).

3.1.3. Transport actif secondaire

Ce type de transport n'utilise pas l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie mais plutôt l'énergie stockée dans des gradients ioniques. L'énergie libérée pendant le transport d'un ion inorganique est utilisée comme force motrice pour pomper d'autres solutés contre leur gradient électrochimique. Les protéines impliquées dans ce processus fonctionnent comme des systèmes de co-transport dans lesquels le transfert d'un soluté dépend du transfert simultané d'un second soluté. Soit les deux solutés sont transportés dans la même direction, on parle de "symport" ; soit ils sont transportés dans des sens opposés, on parle d'"antiport". Chez les bactéries, l'ion co-transporté est le plus souvent le proton H^+ mais ça peut aussi être Na^+ .

L'exemple le plus étudié chez *E. coli* est celui du transport du lactose par la perméase LacY. Celle-ci est codée par le second gène de l'opéron lactose. Comme les autres membres de la famille des Major Facilitator Superfamily (MFS), LacY utilise l'énergie libre issue de la translocation de protons pour transférer le galactoside contre son gradient électrochimique. En l'absence de lactose, LacY est sous sa forme non-protonée qui est instable. La fixation d'un proton permet la stabilisation de la protéine qui est alors prête à recevoir une molécule de lactose et la fixation du substrat s'accompagne de l'orientation de l'ouverture vers le cytoplasme. Ce changement se traduit par la translocation du lactose suivie de la libération du proton H^+ à l'intérieur de la bactérie et le retour de la protéine à sa conformation initiale (Abramson *et al.*, 2003).

3.1.4. Transport par le système Phospho-Transférèse (PTS)

Le système majeur de transport du glucose chez *E. coli*, chez *B. subtilis* et un grand nombre d'autres procaryotes, est le système de phosphotransférèse dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP). Ce système n'existe pas chez les eucaryotes. Il fut décrit initialement par Kundig *et al.* en 1964 (Kundig *et al.*, 1964) à la suite de la découverte du transport et de la phosphorylation simultanée du mannose dépendant du PEP. Le PTS utilise le PEP pour phosphoryler, via une cascade de réactions de transfert de phosphate, une grande variété d'hexoses (par exemple, le glucose, le mannose, le N-acétylglucosamine), d'hexitols (comme le mannitol), des disaccharides et des trisaccharides, comme le saccharose et le lactose chez *B. subtilis* ou le trehalose chez *E. coli*. Le PTS catalyse l'absorption des sucres et leur conversion simultanément dans leurs formes phosphoesters respectives pendant le

transport. Depuis, beaucoup de différents PTSs pour l'absorption d'un grand nombre de glucides ont été trouvés chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Deutscher *et al.*, 2006). Les PTSs ne fonctionnent pas seulement comme système d'absorption des sucres mais ils constituent aussi des systèmes senseurs de glucides très sophistiqués, qui contrôlent le métabolisme du carbone et de l'azote, le chimiotactisme, la formation de biofilms bactériens et d'autres réponses aux changements des conditions environnementales qui seront décrits plus loin (Lengeler & Jahreis, 2009).

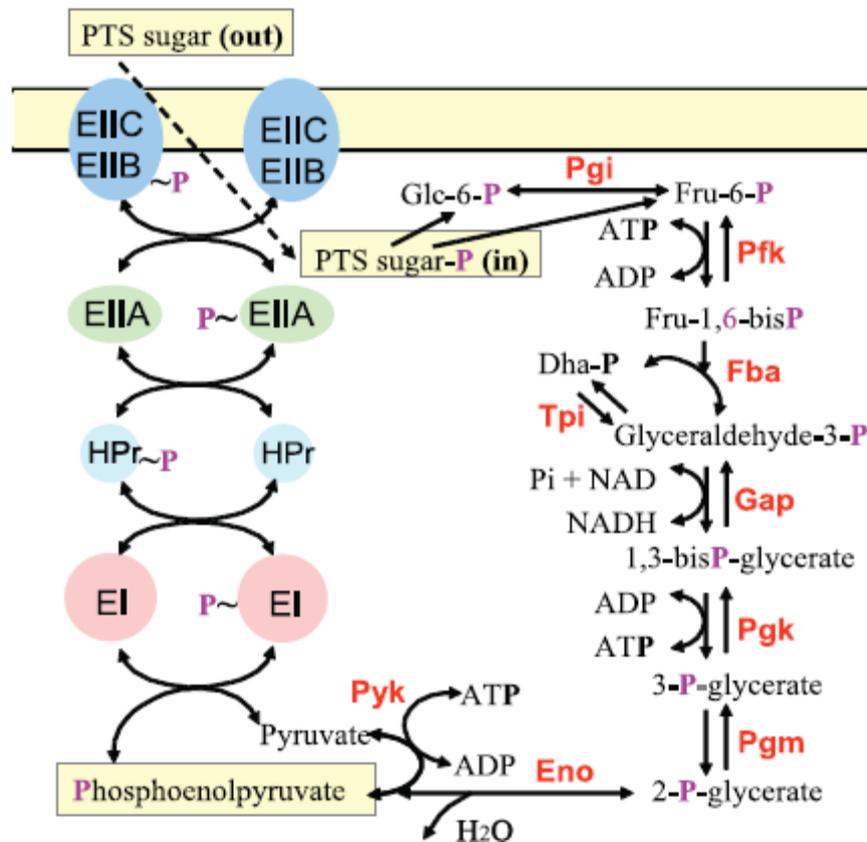
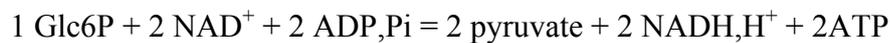


Figure 2: Représentation schématique du système PTS et la cascade de phosphorylation qu'il induit. L'opéron *ptsHI* code les protéines solubles, communes à l'ensemble des systèmes PTS à savoir EI et HPr. Les enzymes EII sont spécifiques de chaque sucre et sont constitués de plusieurs domaines dont au moins un domaine membranaire. La trans-phosphorylation en chaîne des éléments du PTS aboutit à la translocation du phosphate fourni par le PEP vers le sucre à transporter (Deutscher *et al.*, 2006).

Le PTS se compose de deux composants cytoplasmiques généraux, l'Enzyme I (EI, gène *ptsI*) et la Protéine contenant l'Histidine (HPr, gène *ptsH*), qui sont communs à presque tous les sucres PTS et qui transfèrent un phosphate dérivé du PEP au transporteur spécifique du sucre, appelé Enzyme II (EII). Les bactéries contiennent généralement de nombreux EIIs différents. Chaque complexe EII consiste à un ou deux domaines membranaires hydrophobes

(domaines C et D) et deux domaines hydrophiles (domaines A et B) qui ensemble sont responsables du transport de sucre à travers la membrane ainsi que de sa phosphorylation (Fig.2). Les complexes EII sont formés soit de protéines distinctes soit d'une seule protéine à multidomaines (Revue dans (Deutscher et al., 2006, Plumbridge, 2009b). Les complexes EII constituent des voies de transport parallèles connectées à une voie de transfert de phosphate PEP/EI/HPr commune. *E.coli* contient au moins 20 complexes EII différents (Tchieu *et al.*, 2001) et *B.subtilis* en contient un nombre similaire (Reizer et al., 1999).

La première étape dans la cascade de phosphorylation typique des PTSs est catalysée par EI, une protéine kinase dépendante du PEP (Fig.2). L'utilisation du PEP, un intermédiaire de la glycolyse, comme donneur de groupe phosphate couple étroitement le transport et le métabolisme des glucides. Dans le cas du PTS glucose, le groupe phosphate est transféré de EI~P à HPr, de HPr~P à l'EIIA^{Glc} soluble (gène *crr* faisant partie de l'opéron *ptsHIcrr*). Puis EIIA^{Glc}~P transfère le phosphate à la protéine membranaire spécifique du glucose, EIICB^{Glc} (gène *ptsG*) qui réalise l'absorption et la phosphorylation du glucose. Toutes les réactions de phosphotransfert entre le PEP et les domaines EIIBs de n'importe quelle EII spécifique d'un sucre, sont réversibles. Seule l'étape finale, c'est-à-dire le transfert du groupe phosphate à haute énergie vers le substrat, est irréversible. Le Glc6P ou d'autres sucres phosphorylés sont convertis en Fru6P et entrent dans la voie de la glycolyse ou ils servent à resynthétiser le PEP.



Au cours des 4 étapes enzymatiques de la partie supérieure de la glycolyse (Fig. 2), le Glc6P est converti en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en consommant de l'énergie, puisqu'il faut une molécule d'ATP pour phosphoryler le fructose-6-phosphate (Fru6P) en fructose-1,6-bisphosphate (FBP). De plus, l'étape de phosphorylation précédente du glucose, soit par le PTS, soit par la glucokinase, est telle que 2 molécules d'ATP sont nécessaires pour transformer une molécule de glucose en deux molécules de G3P. Sur le plan énergétique, la conversion des trioses-phosphorylés en pyruvate conduit, à partir d'une molécule de glucose préalablement transformée en une molécule de G3P et une molécule de dihydroxyacétone-phosphate (DHAP), à la production de 4 molécules d'ATP et de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné (NADH).

Tous les PTSs d'une seule cellule forment un réseau complexe dans lequel les niveaux de phosphorylation de tous les composants dépendent de la disponibilité des sucres et de l'état

physiologique de la cellule. Les cellules utilisent l'information sur les niveaux de phosphorylation de protéines PTS variées pour contrôler le flux de carbone cellulaire.

3.1.4.1. Les composants du PTS

3.1.4.1.1. Les protéines générales, EI et HPr

EI est codée par le gène *ptsI* de l'opéron *ptsHICrr*. EI consiste en deux domaines autonomes liés par un linker. En présence d'un cation divalent Mg^{2+} ou Mn^{2+} , elle est autophosphorylée dans sa forme dimérique sur le résidu Histidine 189 (His189) du domaine N-terminal de chaque monomère chez *E.coli*. Le domaine C-terminal contient le site de liaison au PEP et il est nécessaire pour la dimérisation : en effet, le domaine N-terminal, à lui seul, est incapable de se dimériser. Le domaine C-terminal est donc impliqué aussi bien dans l'autophosphorylation que dans la dimérisation. Une fois phosphorylé, le dimère se dissocie en monomères pour phosphoryler chacun une molécule de HPr.

HPr est codé par le gène *ptsH* de l'opéron *ptsHICrr*. Il est phosphorylé sur le résidu Histidine 15 (His15) chez *E.coli* et il phosphoryle ensuite les protéines EIAs. Sa structure tridimensionnelle est conservée entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Le site actif de l'enzyme incluant le résidu His15, localisé dans la partie N-terminal de la première longue hélice α et exposé au solvant, interagit avec le résidu Arginine 17 (Arg17). Le rôle essentiel du résidu Arg17 dans la fonction d'HPr est illustré par le fait que la substitution de cet acide aminé par un résidu Glycine ou Lysine, réduit l'efficacité catalytique de la protéine d'un facteur 100 à 1000 (pour revue voir Postma, 1996). L'interaction d'HPr avec EI ou EIA^{Glc} ne requiert pas de changement conformationnel considérable dans aucun des domaines des partenaires de liaison PTS.

HPr des bactéries à Gram Positive peut être également phosphorylé sur un résidu sérine par une protéine kinase ATP dépendante. Cette phosphorylation ne fait pas partie du transfert de phosphate aux sucres mais elle ralentit le transfert de phosphate de EI~P à HPr d'au moins 100 fois (décrit plus bas) et est impliquée dans la répression catabolique qui joue un rôle régulateur dans l'utilisation des sucres aminés (voir Section 3.3) (revue dans Deutscher et al., 2006).

3.1.4.1.2. Les complexes EIIs

Les PTSs ont été classés en quatre (super) familles avec des origines évolutives distinctes, d'après les phylogénies des EIIs. Il s'agit de la superfamille glucose-fructose-lactose comprenant la famille glucose, la famille fructose-mannitol et la famille lactose ; la superfamille ascorbate-galactitol comprenant la famille ascorbate et la famille galactitol ; la famille mannose; et la famille dihydroxyacétone.

Le Glc est le sucre le plus important chez *B. subtilis* et *E. coli*. C'est un sucre PTS chez ces deux organismes et de plus, le transport du glucose par le PTS a un effet de régulation dans les deux espèces. Il est intéressant de noter que le PTS Glc est de la même famille que le PTS GlcNAc chez ces deux organismes.

Le complexe EII spécifique du Glc chez les entérobactéries est constitué de deux protéines distinctes, la protéine cytoplasmique EIIA^{Glc} (gène *crr*) et la protéine associée à la membrane EIICB^{Glc} (gène *ptsG*), dans lequel le domaine EIIB est hydrophile et en contact avec le cytoplasme et le domaine EIIC est enfoui dans la membrane. Les domaines EIIA et EIIB sont les domaines qui reçoivent respectivement le groupe phosphoryle de HPr~P et de EIIA~P (Fig.2). Tandis que le résidu phosphorylé dans la protéine/ domaine EIIA est un résidu Histidine, celui dans la protéine/domaine EIIB peut être soit un résidu Histidine (cas de la famille mannose), soit un résidu Cystéine (toutes les autres familles) (Pas & Robillard, 1988). EIIA^{Glc} contient une interface hydrophobe impliquée dans l'interaction avec HPr~P. Sa phosphorylation par HPr~P a lieu sur le résidu essentiel His90. Une mutation His90/Gln aboutit à l'inactivation du domaine qui devient non-phosphorylable par HPr~P. (Deutscher et al., 2006). La partie N-terminale du domaine EIIA^{Glc} est importante pour l'activité catalytique de ce domaine. En effet, la délétion des sept premiers résidus amino-terminaux donne naissance à une protéine tronquée EIIA^{Glc}_{fast} dont la capacité de phosphoryler EIICB^{Glc} ne représente que 2 à 3 % de celle de la protéine sauvage (Meadow *et al.*, 1986).

EIIB est un domaine soluble situé du côté cytoplasmique de la membrane interne et attaché à EIIC, lui-même inséré dans la membrane. La structure du domaine EIIB^{Glc} de *E.coli* révèle que le site de phosphorylation Cys421, qui constitue le site actif de ce domaine et est situé du côté C terminal, est exposé en surface de EIIB^{Glc} et transfère le groupe phosphoryle de EIIA^{Glc} au sucre. Le domaine EIIC est composé d'au moins six hélices α transmembranaires avec une longueur supérieure à 21 résidus. Le domaine amino-terminal transmembranaire d'EIIC^{Glc} comprend le site de liaison au sucre. Le groupe phosphate est

transféré au sucre après que celui-ci ait été transporté par le domaine EIIC à travers la membrane cytoplasmique et libéré sur la face interne de la membrane.

Dans le cas d'EIICBA^{Mtl} spécifique du mannitol chez *E.coli* et d'EIICBA^{Glc} spécifique du glucose chez *B.subtilis*, le EII est constitué d'un seul polypeptide contenant les deux domaines hydrophiles EIIA et EIIB ainsi que le domaine transmembranaire EIIC. Ceci est aussi le cas pour EII^{Nag} chez *E.coli* et EII^{Gam} chez *B. subtilis* qui interviennent dans le métabolisme de GlcNAc (Deutscher et al., 2006).

3.2 Régulation des gènes du PTS chez *E.coli*

3.2.1 L'opéron *ptsHIcrr*

Chez *E. coli*, EI et HPr du système PTS sont codés respectivement par les gènes *ptsI* et *ptsH* de l'opéron *ptsHIcrr*. Le gène *crr* (Carbohydrate Repression Resistance) codant pour le domaine EIIA^{Glc} a été nommé ainsi à cause d'une mutation de ce gène qui supprime l'effet répresseur du glucose sur l'utilisation des sucres non-PTS (Saier & Roseman, 1976).

L'opéron *ptsHIcrr* possède une régulation complexe. Sa région régulatrice contient deux promoteurs p0 et p1 en amont du gène *ptsH*. L'expression du promoteur p0 est induite par le glucose tandis que celle du promoteur p1 est constitutive. En l'absence de glucose, le p0 est réprimé par les protéines Mlc et FruR, alors qu'il est activé par le complexe AMPc (Adénosine MonoPhosphate Cyclique)/CAP (Catabolite Activator Protein) (Kimata *et al.*, 2001, Plumbridge, 1999). De plus, le gène *crr* possède son propre promoteur p2 localisé à l'extrémité 3' du gène *ptsI*, ce qui explique sa forte expression par rapport aux autres gènes de l'opéron (De Reuse *et al.*, 1992).

Chez *B.subtilis*, il n'y a pas de gène *crr* car EIIA^{Glc} est un domaine du gène *ptsG*. Ce dernier fait parti de l'opéron *ptsGHI* et est inductible par le glucose tandis que les gènes *ptsHI* sont exprimés constitutivement à partir d'un promoteur présent à la fin du gène *ptsG* et font aussi partie de l'opéron inductible *ptsGHI*.

3.2.2 Le gène *ptsG*

Chez *E. coli*, le gène *ptsG* code la protéine EIICB^{Glc}. Il est exprimé à partir de deux promoteurs, p1 et p2 dont p1 est le promoteur majeur avec une contribution de 90% de l'expression totale. *ptsG* est contrôlée par Mlc et porte deux sites Mlc dans sa région

régulatrice. CAP se fixe en amont du promoteur p1 et active son expression (Kimata *et al.*, 1998, Plumbridge, 1998b). Les gènes spécifiques des sucres sont régulés par les régulateurs généraux type CAP et par les régulateurs spécifiques type répresseur. Mlc est le répresseur spécifique du glucose et NagC est celui du PTS^{Nag} qui sera décrit plus bas (Section 4.1). Plusieurs facteurs globaux agissant sur la transcription de *ptsG* ont été identifiés. Parmi eux, le complexe AMPc -CAP (protéine activatrice de l'AMPc) qui active la transcription du gène *ptsG* sous des conditions de carence nutritionnelle. Mlc est intéressant car à l'opposé des autres régulateurs classiques, il ne reconnaît pas une petite molécule apparentée au métabolisme des transporteurs des sucres mais il est sensible à l'état d'activation du PTS^{Glc} lui-même et se fixe à EIIB^{Glc} non phosphorylé dans la membrane (Lee *et al.*, 2000, Nam *et al.*, 2001, Plumbridge, 1999, Tanaka *et al.*, 2000).

L'expression de *ptsG* est régulée post-transcriptionnellement par la modulation de la stabilité de son ARNm et par la régulation de l'activité de EIICB^{Glc} en réponse au flux glycolytique dans la cellule par le système *sgrRST*. Ce système de régulation intervient au niveau traductionnel et dépend du petit ARN SgrS (Fig.3) (Vanderpool, 2007). L'accumulation du Glc6P ou du Fru6P dans la bactérie induit un état de stress qui active un activateur transcriptionnel, SgrR, qui conduit à son tour à la synthèse d'un petit ARN régulateur, SgrS (Morita *et al.*, 2003, Vanderpool & Gottesman, 2004). SgrS s'hybride à une partie de l'extrémité 5' de l'ARNm de *ptsG* et est capable de former un hybride ARN-ARN dépendant de la protéine chaperonne, Hfq. SgrS s'associe avec la protéine Hfq, elle-même associée à l'ARNase E. Le complexe formé se fixe sur l'ARNm de *ptsG* via l'hybridation de SgrS sur un site chevauchant la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm. Ceci bloque l'accès des ribosomes au site de démarrage de la traduction. De plus, l'ARNm ainsi piégé est rapidement dégradé par l'ARNase E (Kimata *et al.*, 2001). Le processus d'inhibition de la traduction peut se dérouler efficacement, même en absence de l'ARNase E, ce qui suggère que l'étape de dégradation n'est pas nécessaire pour la régulation négative de *ptsG* et que le rôle de l'ARNase E consiste à rendre la réaction d'inhibition irréversible (Morita *et al.*, 2006). Une seconde voie de régulation du transport de glucose par SgrS est due à la présence à l'extrémité 5' de SgrS, d'un petit cadre ouvert de lecture (ORF = open reading frame) codant un polypeptide (SgrT) de 43 résidus dont l'activité consiste à l'inhibition du transporteur EIICB^{Glc} lui-même (Fig.3) (Wadler & Vanderpool, 2007).

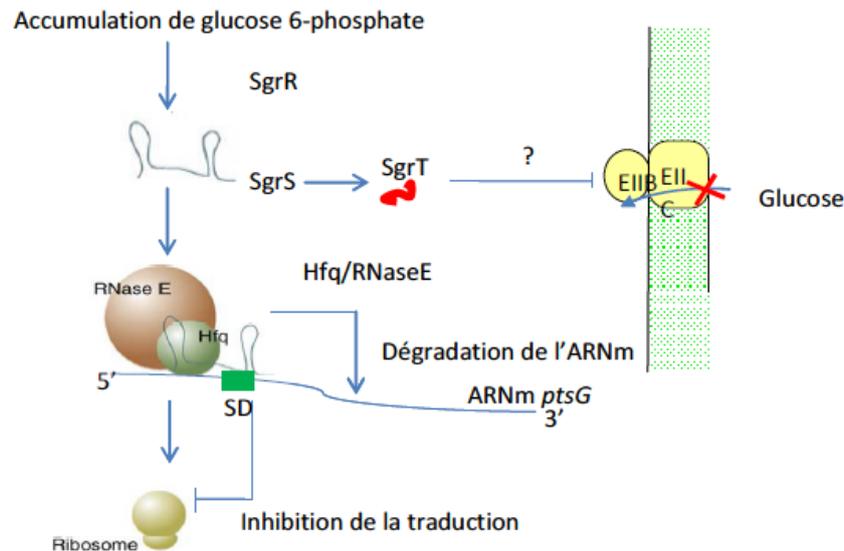


Figure 3 : Modèle de régulation du gène *ptsG* par le petit ARN SgrS. La transcription de ce dernier est induite par SgrR en réponse à une forte concentration de Glc6P. SgrS forme un complexe nucléoprotéique avec Hfq et l'ARNase E. Le complexe se fixe ensuite au niveau de la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm *ptsG* avec, comme conséquence, l'inhibition de la traduction et la dégradation de l'ARNm par l'ARNase E. Le deuxième mécanisme de régulation par SgrS implique l'inhibition directe du transporteur EIIBC (PtsG) par le polypeptide SgrT codé par *sgrS*. D'après (Aiba, 2007).

Comme il a été dit précédemment, Mlc est le répresseur spécifique du glucose. Sa séquence en acides aminés (aa) est 40% identique à celle de NagC, répresseur/activateur impliqué dans l'absorption et le métabolisme du GlcNAc. L'activité de NagC, comme celle de la plupart des régulateurs transcriptionnels, est sensible à une petite molécule apparentée au métabolisme du gène contrôlé par NagC, en l'occurrence le GlcNAc6P, et la fixation de NagC à l'ADN est inhibée par le GlcNAc6P (Plumbridge, 1991). Mlc et NagC appartiennent à la famille ROK qui regroupe des répresseurs, des cadres ouverts de lecture (ORFs) inconnus et des kinases (Plumbridge, 2001). À la différence de NagC, Mlc ne lie pas le glucose ou les métabolites dérivés de lui. C'est le PTS^{Glc} qui contrôle l'activité de Mlc. La régulation transcriptionnelle de l'opéron *pts* est une conséquence de l'augmentation du niveau de $EIICB^{Glc}$ non phosphorylé (De Reuse et al., 1992) qui doit interagir avec Mlc. Mlc se lie sur la forme non-phosphorylé mais pas sur la forme phosphorylé. En conséquence, il est séquestré à la membrane durant l'absorption du glucose, ce qui permet l'induction de l'expression de *ptsG* (Lee et al., 2000, Nam et al., 2001).

Pour que les sucres, autres que le glucose et le fructose, puissent intégrer la voie métabolique centrale de la bactérie, ils doivent d'abord être convertis par une série de réactions enzymatiques, en Glc6P, Fru6P ou d'autres intermédiaires des voies métaboliques.

Les gènes impliqués dans ces réactions enzymatiques sont souvent groupés dans le même opéron que les gènes du transporteur spécifique du sucre à métaboliser. L'exemple de l'opéron *nagE-nagBACD* intervenant dans le métabolisme du GlcNAc sera présenté dans la partie métabolisme.

Chez *B.subtilis*, *ptsG* code un seul polypeptide EIICBA^{Glc} et est localisé en amont de l'opéron *ptsHI*. L'opéron *ptsGHI* est inductible par le glucose tandis que le promoteur des gènes *ptsHI* est constitutif. La présence d'un promoteur spécifique pour *ptsHI* fait que les enzymes générales sont aussi disponibles pour d'autres perméases de sucres en l'absence de glucose mais sont probablement surexprimées en présence de glucose (Schmalisch *et al.*, 2003, Stulke *et al.*, 1997). L'opéron *ptsGHI* est contrôlé par un répresseur transcriptionnel, GlcR, et par un mécanisme d'anti-terminaison (Stulke *et al.*, 2001, Stulke *et al.*, 1997). Ce dernier type de régulation est fréquent chez les bactéries à Gram positives.

Les bactéries ont développé des mécanismes de régulation basés sur la terminaison/anti-terminaison de la transcription. Ce mécanisme appelé atténuation, a été initialement décrit pour l'opéron tryptophane d'*E.coli* (dans ce cas, le mécanisme est différent de ceux des opérons PTS car il dépend d'un peptide leader mal traduit qui permet à l'ARN de former l'anti-terminateur). Il existe deux mécanismes principaux de terminaison de la transcription, la terminaison « facteur dépendant », et la terminaison intrinsèque. Dans le cas des opérons PTS, les unités de transcription sont soumises à la terminaison intrinsèque (Rho-indépendante). Lorsqu'un terminateur Rho-indépendant est localisé entre le site de démarrage de la transcription et le codon AUG, l'expression du gène correspondant ou de l'opéron est inhibée. Sous des conditions d'induction de l'opéron, la formation du terminateur est inhibée par la formation d'une structure dite anti-terminateur, stabilisée par une autre macromolécule, soit une protéine, soit un ARNt (ARN de transfert). Dans le cas des opérons PTS, la structure est stabilisée par la fixation d'une protéine qui se lie à l'ARNm sur le terminateur ou sur une région qui le chevauche, empêchant ainsi la formation de la tige-boucle du terminateur et permettant à l'ARN polymérase d'achever la transcription du gène ou de l'opéron. Cette fixation stabilise la structure alternative de l'ARN appelée RAT (RNA Anti-Terminator) (Aymerich & Steinmetz, 1992).

Les protéines responsables de l'anti-terminaison répondent fréquemment à des changements de la concentration intracellulaire de métabolites qui leur permettent de se lier à leur cible sur l'ARNm. Les activités des protéines anti-terminatrices sont contrôlées par le

PTS. Chez *E.coli*, les premières études dans les systèmes PTS étaient faites sur l'opéron *bglGFB* codant le transporteur spécifique des β -glucosides, EII^{Bgl} (BglF), l'enzyme β -glucosidase (BglB) et la protéine BglG jouant le rôle de facteur d'anti-termination (Mahadevan *et al.*, 1987, Mahadevan & Wright, 1987). Cet opéron contient un terminateur se trouvant entre le site d'initiation de la transcription et le codon AUG de *bglG* et un autre en amont de *bglF* (Amster-Choder, 2005).

Chez *B.subtilis*, les premières études d'anti-termination ont concerné le gène *sacB* codant la levansucrase (Aymerich *et al.*, 1986). L'opéron *ptsGHI* est un autre exemple chez *B.subtilis* qui dépend également d'un mécanisme de terminaison/anti-termination impliquant une protéine d'anti-termination liant l'ARN, GlcT, de la famille des anti-terminateurs transcriptionnels BglG. En l'absence de glucose, GlcT est inactif et un terminateur est formé dans la région « leader » de l'ARNm de *ptsG*. Si le glucose est présent, la protéine GlcT est activée, se lie et stabilise une structure ARN alternative (RAT = Ribonucleic Anti-Terminator) qui chevauche le terminateur et empêche la terminaison. Le GlcT contient trois domaines, un domaine N-terminal liant l'ARN (appelé CAT = Co-AntiTerminator) et deux domaines de régulation du PTS (PTS regulator domain = PRD), PRD-I et PRD-II. Chaque protéine anti-terminatrice est capable de subir deux types de phosphorylation antagonistes, une qui active l'activité d'anti-termination et l'autre qui la supprime. GlcT peut être phosphorylé par HPr et EII^{Glc}. La phosphorylation dépendant d'HPr survient sur PRD-II et a un léger effet stimulateur sur l'activité de GlcT. En revanche, EII^{Glc} inactive GlcT en phosphorylant PRD-I. Cette dernière phosphorylation lie la disponibilité du glucose à l'expression de l'opéron *ptsGHI* via l'état de phosphorylation d'EII^{Glc} et de GlcT (Schmalisch *et al.*, 2003, Stulke *et al.*, 1997). De plus, comme dit plus haut, superposé sur cette régulation, il y a un répresseur transcriptionnel appartenant à la famille DeoR, GlcR, qui se fixe en amont de GlcT (Stulke *et al.*, 2001).

Quelques opérons PTS chez *B. subtilis* possèdent des activateurs de transcription qui sont des protéines liant l'ADN, souvent par un motif hélice tour hélice. Ces protéines se lient en amont de leurs promoteurs cibles, interagissent avec l'holoenzyme ARN polymérase avec un sigma spécifique et stimulent la transcription. Ces activateurs de transcription ne sont régulés ni par liaison d'un ligand ni par la phosphorylation par une kinase senseur mais ils possèdent des PRDs suggérant que leur activité est contrôlée par le système PTS. En effet, les PRDs sont utilisés non seulement pour réguler l'activité de liaison à l'ARN des anti-terminateurs mais aussi pour contrôler la fonction de liaison à l'ADN de cette classe

d'activateurs de transcription. Tous les activateurs de transcription contenant un PRD possèdent aussi un domaine homologue à EIIA et un domaine homologue à EIIB (pour revue voir Deutscher et al., 2006).

Chez *B.subtilis*, LevR est l'activateur de la transcription contrôlé par le PTS le mieux étudié (Debarbouille *et al.*, 1991). Il régule l'expression de l'opéron *levDEFG-sacC*. Le gène *levR* est localisé en amont de l'opéron *lev* qui code les sous unités de l'EII pour un PTS spécifique du fructose/mannose et une levanase extracellulaire capable de dégrader les polymères de fructose comme le lévane. L'expression de l'opéron *lev*, qui est contrôlée par un promoteur -24, -12 dépendant de σ^L (σ^{54}), est induite par de faibles concentrations de fructose, et est réprimée par des sources de carbone rapidement métabolisables. LevR stimule l'activité de l'ARN polymérase/ σ^L après liaison à des UAS (upstream activating site) localisés en amont du promoteur *lev* (Martin-Verstraete *et al.*, 1994). LevR contient un domaine de liaison à l'ADN et des domaines de type NtrC, PRD-I, EIIA, EIIB et PRD-II. Il est régulé par de multiples phosphorylations catalysées par le PTS. Au total, il possède cinq sites de phosphorylation PTS, deux dans PRD-I, un dans les domaines A et B et un dans PRD-II. La phosphorylation catalysée par EI/HPr exerce un effet positif sur la fonction d'activation de la transcription de LevR alors que la phosphorylation dans PRD-II exerce un effet inhibiteur sur cette même fonction (pour revues voir Fujita, 2009, Deutscher et al., 2006).

3.3 Régulation par le système PTS

En plus de son rôle dans le transport et le métabolisme des sucres, le système PTS possède plusieurs fonctions régulatrices. Nous avons vu dans le paragraphe précédent une fonction régulatrice du PTS avec l'exemple évident des régulateurs portant des domaines PRDs. Dans ce nouveau paragraphe, d'autres fonctions régulatrices du PTS vont être présentées.

Deux observations essentielles ont conduit à la découverte de la fonction régulatrice du système PTS chez *E. coli*. La première, faite par Pastan et Perlman (Pastan & Perlman, 1969), décrit que le défaut de croissance observé chez les mutants *ptsH* ou *ptsI* sur des sucres non-PTS peut être restauré si l'on ajoute de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate Cyclique) dans le milieu. La seconde observation correspond à l'identification de mutations au niveau du gène *crr* chez *Salmonella typhimurium* qui restaurent la croissance des mutants *ptsHI* sur différents sucres non-PTS (Saier & Roseman, 1976). D'autres études ont ensuite permis de

décrire la protéine EIIA^{Glc} produit du gène *crr*, comme étant l'élément responsable de l'« exclusion de l'inducteur » et de la répression catabolique (décrit plus bas).

EIIA^{Glc} non phosphorylée (excès de glucose) inhibe les systèmes d'absorption de sucres non PTS, comme la lactose perméase, dans un processus appelé « exclusion d'inducteur ». A l'inverse, EIIA^{Glc} phosphorylée active directement ou indirectement l'adénylate cyclase (AC) qui produit de l'AMP_c à partir de l'ATP. Ce second messager, l'AMP_c, agit comme un co-activateur qui module l'activité du régulateur global CAP (Catabolite Activator Protein = cAMP receptor protein = CRP). Le complexe AMP_c-CAP est responsable de l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes codant pour des protéines de transport de sucres ou des enzymes métabolisantes (pour revue voir Deutscher et al., 2006).

Un autre type de régulation par le PTS est le cas de Mlc chez *E.coli*. Mlc et EIICB^{Glc} constitue un système de détection du glucose efficace impliqué dans l'induction de gènes du PTS^{Glc} (*ptsG* et *ptsHI*) en présence de glucose (Section 3.2.1 et 3.2.2). Ainsi, la perte de répression de Mlc par le glucose, déréprime l'opéron *ptsGHI*. La présence de ce sucre réduit aussi la concentration d'AMP_c mais l'expression du gène *ptsG* a besoin d'un niveau de base d'AMP_c/CAP. Donc ces deux effets sont antagonistes dans le sens que Glc déréprime l'opéron en déplaçant Mlc mais réduit la concentration d'AMP_c pour l'expression du gène *ptsG*. L'interaction entre ces deux systèmes régulateurs globaux pourrait donc aider les cellules à garder leur équilibre métabolique.

La plupart des bactéries à Gram positif ne possèdent pas d'adénylate cyclase. La protéine PTS générale, HPr, est le régulateur majeur du métabolisme du carbone chez les bactéries à Gram positif. Elle a des fonctions similaires à l'EIIA^{Glc} des bactéries à Gram négatif et elle effectue ses diverses fonctions régulatrices en réponse aux changements de son état de phosphorylation (Fig.4). HPr peut-être phosphorylé non seulement par PEP sur l'His15 mais aussi par l'ATP sur la sérine 46 (Ser46). Il existe donc quatre formes d'HPr, soit l'HPr déphosphorylé, l'HPr phosphorylé sur l'His15 (HPr-His~P) ou sur la Ser46 (HPr-Ser~P) et l'HPr doublement phosphorylé. La phosphorylation sur Ser46 est faite par une protéine kinase/protéine phosphorylase bifonctionnelle ATP dépendante (HPrK/P, gène *hprK*) qui répond aux changements des concentrations de l'ATP, P_i, PP_i et du FBP (fructose-1,6-bisphosphate), tandis que la phosphorylation sur His15 par EI répond à l'alternance de l'activité phosphotransférase du PTS et le rapport PEP/pyruvate. Ces deux enzymes contrôlent la concentration des différentes formes d'HPr qui régulent le métabolisme du carbone via les interactions protéine-protéine (HPr et HPr-Ser~P) ou la phosphorylation de

protéines non PTS (HPr-His~P). HPr fonctionne donc comme «l'unité de traitement centrale » pour le métabolisme du carbone. En absence de sucre, HPr-His est phosphorylé et en présence de sucre, HPr-Ser est phosphorylé. La phosphorylation d'HPr par EI sur l'His15 ralentit sa phosphorylation sur la Ser46 par l'HPrK/P, probablement en diminuant l'affinité de la kinase pour son substrat. HPrK/P est aussi responsable de la déphosphorylation de l'HPr-Ser~P. Le mécanisme de déphosphorylation, appelé phospho-phosphorolyse, est réversible. PP_i peut remplacer l'ATP comme donneur de phosphate. FBP stimule l'activité de la kinase HPrK/P, et sa principale fonction physiologique est d'empêcher l'inhibition d'HPrK/P par le phosphate. Les deux activités opposées d'HPrK/P et le taux de formes variées d'HPr semblent donc être régulés par les métabolites, FBP, ATP et Pi (Revue dans Deutscher et al., 2006, Fujita, 2009, Plumbridge, 2009b).

L'opéron contenant *hprK* est composé de cinq gènes (*hprK*, *lgt*, *yvoD*, *yvoE* et *yvoF*) chez *B. subtilis*. Il est intéressant de noter que l'opéron *nagAB* est adjacent à l'opéron *hprK* et est exprimé dans le sens divergent. Donc leurs régions régulatrices peuvent se chevaucher.

HPr-Ser~P peut se lier à CcpA (Catabolite control protein A) pour former un régulateur de la transcription globale intervenant dans la répression catabolique. La fonction du complexe HPr-Ser~P/CcpA peut être comparée au complexe AMPc/CAP chez les Gram négatifs. CcpA est un membre de la famille des protéines LacI et un régulateur global des voies de métabolisme du carbone chez beaucoup de bactéries à Gram positif (Warner & Lolkema, 2003). Chez *B. subtilis*, CcpA contribue à la régulation de plus de 100 gènes dont les produits dans la plupart des cas sont impliqués dans l'acquisition de carbone. Il peut être soit un régulateur positif, soit un régulateur négatif de la transcription. Dans la majorité des cas, le complexe CcpA/HPr-Ser~P réprime l'activité des gènes impliqués dans l'utilisation des sources de carbone alternatives mais active les gènes du métabolisme "de surplus" (pour la synthèse de l'acétate, du lactate et de l'acétoïne) (Fig. 4).

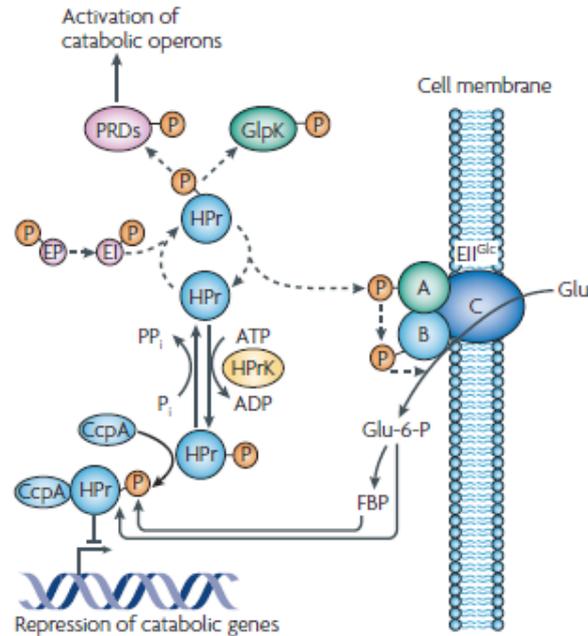


Figure 4 : CCR chez *B.subtilis*. Chez les firmicutes, HPr peut être phosphorylée à la Ser46 par l’HPr kinase/phosphorylase (HPrK). Cette phosphorylation se produit lorsque les concentrations intracellulaires de FBP et d’ATP sont élevées, ce qui reflète la présence de sources de carbone préférées. HPr-Ser~P se lie à la protéine CcpA, et cette interaction est activée par les intermédiaires glycolytiques, telles que FBP et le G6P. Le complexe de CcpA et HPr-Ser~P se lie à des sites *cre* sur l’ADN, et réprime ainsi la transcription de gènes cataboliques. HPrK est également responsable de la déphosphorylation de HPr-Ser~P dans des conditions de P_i élevée et de faible ATP, et quand les concentrations FBP reflètent un apport nutritionnel pauvre. De plus, HPr-His~P contribue à la CCR: en l’absence de glucose, HPr-His~P phosphoryle la glycérol kinase, GlpK, et les régulateurs de transcription qui contiennent des domaines PRD, ce qui est un pré-requis pour leur activité. Ainsi, en présence de glucose, l’activation des régulateurs contenant un PRD, par leurs inducteurs, est empêché par un mécanisme qui a été appelé la prévention d’induction. Les flèches pointillées indiquent le transfert de phosphate. (D’après (Gorke & Stulke, 2008).

3.3.1 Répression catabolique

Lorsqu’un substrat particulier est absent, les gènes codant les enzymes requises pour l’absorption suivie du métabolisme de ce substrat ne sont pas exprimés. La disponibilité du substrat conduit à la diminution de la répression. La croissance sur glucose peut diminuer l’expression de certains gènes par répression catabolique et l’exclusion de l’inducteur. Le phénomène de « diauxie » a été découvert par Jacques Monod dans les années 1940 (Monod, 1942). Il a montré que lorsque les bactéries, Gram positif ou négatif, étaient en présence de deux types de glucides tels que le glucose et le maltose, elles privilégieront le glucose et donc l’utiliseront en premier. Il apparaît donc que dans chaque organisme, une hiérarchie

spécifique existe pour l'utilisation des sources de carbone avec le glucose souvent en haut de celle-ci. Dans les années suivantes, il a été trouvé que les sucres préférés tels que le glucose, le fructose ou le sucrose, aussi longtemps qu'ils sont présents en quantités suffisantes dans le milieu de croissance, répriment la synthèse des enzymes nécessaires pour le transport et le métabolisme de source de carbone moins favorable. Ce phénomène est la répression catabolique du carbone (CCR) (Contesse, 1969). Lorsque la source de carbone préférée est épuisée, les bactéries rentrent dans une phase de latence durant laquelle elles synthétisent les enzymes nécessaires pour le transport et le métabolisme de source de carbone moins favorables avant qu'elles puissent reprendre la croissance. Les effets du glucose rapportés au milieu du siècle dernier peuvent donc être considérés comme CCR. La CCR est l'effet inhibiteur d'une certaine source de carbone dans le milieu de croissance sur l'expression génique et/ou l'activité des enzymes impliquées dans le catabolisme d'autres sources de carbone. L'expression génique et l'activité enzymatique sont régulées par des interactions protéine-ADN, protéine-protéine et protéine-métabolite. Ces interactions sont à leur tour modulées par la modification des protéines. Les systèmes PTS jouent un rôle majeur dans la CCR bactérien. Cependant des mécanismes assez différents ont évolué chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

La molécule clé du CCR chez *E.coli* est la protéine EIIA^{Glc} codée par le gène *crr*. Au moins deux circuits de régulation sont en action durant la CCR par le glucose. Le glucose réduit la concentration d'AMPc/CAP, il diminue donc la transcription des gènes cibles. Par ailleurs, il cause « l'exclusion d'inducteur » en empêchant l'absorption d'autres sources de carbone, et empêche donc l'induction des gènes nécessaires à leur métabolisme (Plumbridge, 2009b). L'activité de l'adénylate cyclase (AC) est influencée par l'état de phosphorylation d'EIIA^{Glc}. Lorsqu'EIIA^{Glc} est phosphorylée, l'interaction directe de l'adénylate cyclase avec cette dernière stimule son activité. Des études montrent que quel que soit son état de phosphorylation, EIIA^{Glc} peut interagir de façon spécifique avec une forme d'AC attachée à la membrane par le domaine transmembranaire du récepteur de la sérine (AC-Tsr). Cette interaction devient impossible en l'absence du domaine C-terminal de l'AC suggérant que ce dernier est un domaine régulateur. Cependant l'activité de l'AC ne peut être stimulée qu'en présence de la forme phosphorylée de EIIA^{Glc} et d'un facteur régulateur présent dans les extraits cellulaires qui reste à identifier (Park *et al.*, 2006). Park *et al.* ont proposé un modèle pour décrire le lien entre la répression catabolique et le système PTS. L'AC serait en complexe permanent, au moyen de son domaine régulateur, avec la protéine EIIA^{Glc} et un

facteur régulateur (X) (Fig.5). En l'absence de glucose, $EIIA^{Glc}$ sous forme phosphorylée stimulerait fortement l'activité de l'AC. Le transport du glucose s'accompagnerait de sa phosphorylation par le système PTS^{Glc} , d'où la déphosphorylation de $EIIA^{Glc}$ et, donc la réduction de l'activité adénylate cyclase (Park et al., 2006).

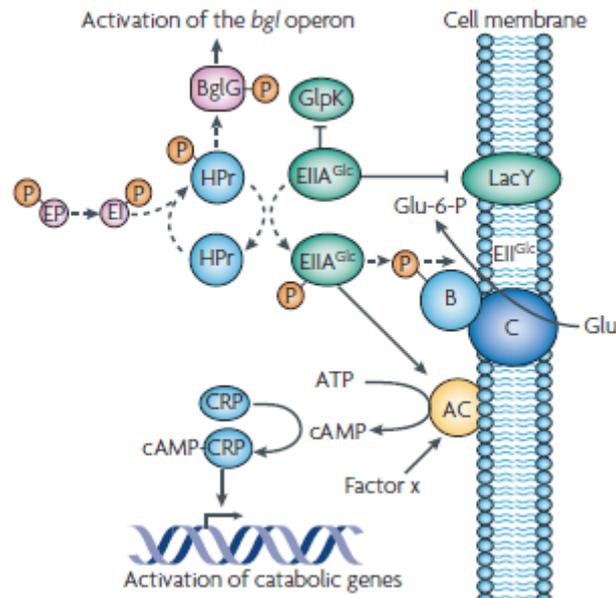


Figure 5 : Activité régulatrice du système PTS impliquant la protéine $EIIA^{Glc}$ chez *E.coli*. À l'état phosphorylé et en association avec un facteur X, $EIIA^{Glc}\sim P$ stimule l'activité de synthèse de l'AMPc nécessaire pour l'expression des gènes CAP-dépendants. En présence de glucose, la forme déphosphorylée d' $EIIA^{Glc}$ inhibe le transport des sucres non-PTS tels que le glycérol, le lactose et le maltose. (D'après Gorke & Stulke, 2008)

Au contraire de chez *E.coli*, le CCR chez *B.subtilis* apparait seulement quand le sucre réprimant peut être converti en certains intermédiaires glycolytiques, incluant FBP. Les fonctions régulatrices exercées par $EIIA^{Glc}$ chez *E.coli* sont assurées par la protéine PTS générale, HPr, chez les bactéries à Gram positif. L'utilisation de sucres rapidement métabolisables et l'augmentation de la concentration intracellulaire de FBP déclenchent la phosphorylation dépendant de l'ATP de HPr sur la Ser46. HPr-Ser~P fonctionne comme un corépresseur catabolique en se liant à CcpA et permettant son interaction avec les sites *cre* (Catabolite Responsive Element). Ces sites sont des séquences palindromiques d'opérateur spécifiques dans les régions promotrices des opérons cataboliques (Fujita *et al.*, 1995) (Fig.4). Les mécanismes CCR à l'oeuvre chez les organismes à Gram positif (inhibition de la transcription par liaison d'un complexe répresseur/corépresseur à un site opérateur) et chez *E.coli* (inhibition de la transcription en empêchant la liaison d'un activateur transcriptionnel)

sont par conséquent fondamentalement différents (revue dans Deutscher et al., 2006, Gorke & Stulke, 2008, Plumbridge, 2009b).

3.3.2 Exclusion d'inducteur

Les mutations dans EI ou HPr préviennent l'utilisation des sucres PTS et non PTS chez *E.coli*. EIIA^{Glc}, intervenant dans la CCR, joue aussi un rôle dans « l'exclusion d'inducteur ». Chacune de ses deux formes (phosphorylée et non phosphorylée) interagit avec un certain nombre de protéines dont elles modulent l'activité. Ainsi EIIA^{Glc} non phosphorylé, lors de la croissance sur glucose, inhibe le transport et le métabolisme de nombreux sucres non-PTS et ce par une interaction directe soit avec la perméase du sucre (cas de la perméase du lactose LacY) (Saier, 1993, Wilson *et al.*, 1990), soit avec une des enzymes de son métabolisme (cas de la protéine GlpK ou de l'ATPase MalK) (Hurley *et al.*, 1993, Kuhnau *et al.*, 1991). Ce phénomène, connu sous le nom d'exclusion d'inducteur, ne se produit qu'en présence de sucre non-PTS, substrat de l'enzyme cible (lactose pour LacY, glycerol pour GlpK, maltose pour MalK). Ceci suggère qu'un changement conformationnel de la protéine-cible est nécessaire avant son interaction avec EIIA^{Glc}. L'inhibition de l'activité de ces transporteurs pour différentes sources de carbone prévient l'absorption de ces substrats alternatifs et l'induction des gènes requis pour leur transport et leur métabolisme.

L'exclusion d'inducteur a aussi été décrit chez les bactéries à Gram positif et HPr-Ser~P y joue un rôle majeur. Chez *Lactobacillus brevis*, HPr-Ser~P qui est activé en présence de glucose, lie et inactive la galactose perméase. En revanche, l'activité de la lactose perméase de *Staphylococcus thermophilus* est contrôlée par la phosphorylation dépendant d'HPr-His~P. Cette perméase non-PTS contient un domaine similaire aux domaines EIIA du PTS. En absence de glucose, HPr-His~P peut phosphoryler le domaine type PTS, ainsi activant la perméase pour le transport du lactose. En présence de glucose, HPr devient phosphorylé sur la Ser46 et ne peut plus activer la lactose perméase (Gorke & Stulke, 2008). Par ailleurs, il a été montré chez *Lactobacillus casei* que l'inactivation du gène *ccpA* n'a aucun effet sur l'exclusion d'inducteur du maltose ce qui indique que l'effet inhibiteur du glucose sur l'absorption du maltose, qui dépend de HPr-Ser~P, est due exclusivement à une inhibition de l'étape du transport et non à la CCR de l'opéron maltose causée par le complexe HPr-Ser~P:CcpA (pour revues voir Deutscher et al., 2006, Gorke & Stulke, 2008, Plumbridge, 2009b).

Chez *B.subtilis*, le phénomène d' « expulsion d'inducteur » a aussi été décrit. Après avoir mis les bactéries en présence d'un sucre non-métabolisable, l'addition de glucose entraîne sa déphosphorylation et sa sécrétion dans le milieu. Le mécanisme moléculaire de ce phénomène n'est pas connu.

I.4 Le métabolisme des sucres aminés

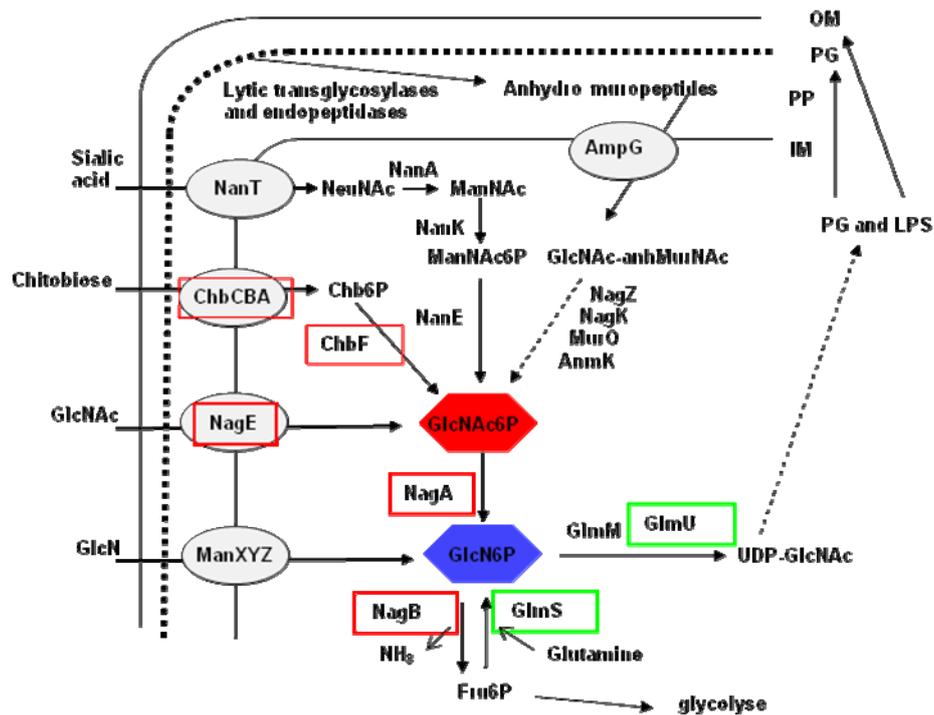


Figure 6: Le régulon *nag* et les voies de formation du GlcNAc6P dans *E.coli*. Les protéines correspondant aux gènes réprimés par NagC sont entourées en rouge et celles activées par NagC en vert. (Adapté de Plumbridge, 2009a).

4.1 Catabolisme

Les monomères de sucres aminés sont impliqués dans les voies anaboliques et cataboliques (Fig. 6). Les sucres aminés, une fois absorbés par la bactérie, peuvent être utilisés pour synthétiser à la fois le PG et les LPS de la paroi cellulaire et servir comme source d'énergie. En effet, outre leur rôle structurel, les sucres aminés sont particulièrement utiles pour la bactérie comme source d'énergie car ils apportent du carbone et de l'azote.

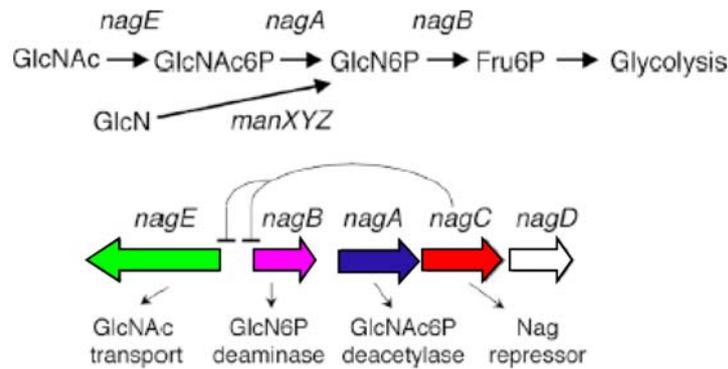


Figure 7: Structure de l'opéron divergent *nagE-nagBACD* et les fonctions des gènes codants. GlcNAc entre dans la cellule par le transporteur PTS codé par *nagE* et est métabolisé par les enzymes codées par *nagA* et *nagB* en fructose-6-P. L'expression des gènes *nagE*, *nagA* et *nagB* est reprimé par le répresseur NagC. GlcN est transporté par le transporteur PTS codé par *manXYZ* et requiert juste la GlcN6P déaminase codé par *nagB* pour être converti en fructose-6-P. Rose, GlcN6P désaminase; bleu foncé, GlcNAc6P désacétylase; vert, transporteur PTS; rouge, régulateur type ROK (Alvarez-Anorve *et al.*, 2009).

Chez *E. coli*, l'utilisation du sucre aminé GlcNAc implique les gènes de l'opéron divergent *nagE-nagBACD* (Fig. 7). Les gènes *nagE*, *nagA* et *nagB* codent respectivement l'enzyme EII^{Nag} qui catalyse le transport et la phosphorylation via le système PTS, la GlcNAc6P désacétylase (NagA) et la GlcN6P déaminase (NagB). NagA est un tétramère de sous unités identiques qui permet la dégradation du GlcNAc6P en GlcN6P. NagB est un hexamère de sous-unités identiques qui existe dans une forme de dimère de trimères. Il permet la dégradation du GlcN6P en Fru6P qui peut ensuite rentrer dans la voie de la glycolyse (Fig.6).

White a identifié les gènes *nagA* et *nagB* et a montré que dans une souche délétée pour le gène *nagA*, le GlcNAc6P était fortement accumulé et NagB était exprimé de manière constitutive (White, 1968). Dans les années 1980s, l'analyse de la séquence ADN a montré que les gènes *nagE* et *nagB* sont transcrits dans des sens opposés et donc ont deux promoteurs divergents (Plumbridge, 1989). L'expression des deux enzymes et celle du transporteur NagE sont contrôlées par un répresseur transcriptionnel codé par le gène *nagC*. NagC réprime les deux opérons en parallèle par le moyen d'une boucle d'ADN (Plumbridge & Kolb, 1993). Le signal pour l'induction du régulon est la présence du GlcNAc6P, le produit intracellulaire du transport du GlcNAc (Plumbridge, 1991). Sa forme phosphorylée empêche le répresseur NagC de se lier à ses opérateurs. La fonction de NagD, un membre de la superfamille HAD (Haloalkanoic Acid Dehalogenase), n'est pas connue et il n'est pas nécessaire pour l'utilisation de GlcNAc ou du GlcN. L'expression des gènes *nagE-nagBA* est fortement

induite durant la croissance sur GlcNAc mais seulement faiblement sur GlcN (Plumbridge *et al.*, 1993).

L'absorption du GlcN se fait grâce à un autre système de transport PTS, l'EII^{Man} (PTS mannose codé par les gènes de l'opéron *manXYZ*) qui est aussi un second système d'entrée pour GlcNAc, mais moins efficace (Fig.7).

4.1.1 L'enzyme allostérique NagB chez *E.coli*

Chez *Escherichia coli*, la croissance sur GlcNAc produit du GlcNAc6P intracellulaire qui influe sur la régulation du catabolisme des sucres aminés de deux manières. D'une part, le GlcNAc6P est l'inducteur pour le répresseur NagC et donc il augmente l'expression des enzymes de l'opéron *nagE-nagBACD*. D'autre part, il est l'activateur allostérique de NagB et donc il augmente la capacité catalytique de cette enzyme clé dans le métabolisme des sucres aminés. Toute augmentation de la concentration du GlcNAc6P pourrait augmenter simultanément la quantité de la protéine NagB (par induction de l'opéron) et l'activité de l'enzyme NagB. Une mutation de *nagA* cause l'accumulation de GlcNAc6P, déprime l'opéron *nag* et permet l'activation allostérique de NagB (Alvarez-Anorve *et al.*, 2005).

NagB est requis pour la dégradation du GlcN6P, qu'il soit dérivé du métabolisme du GlcNAc6P ou par transport du glucosamine (GlcN). Cette réaction catabolique produit du Fructose-6-P et de l'ammoniac, utilisés pour la synthèse de la glutamine et du glutamate (Fig.7). NagB catalyse donc la réaction inverse de GlmS (GlcN6P synthase) qui convertit le fructose-6-P et la glutamine en GlcN6P (Fig.6). L'enzyme NagB de *E.coli* a été purifiée et cristallisée (Horjales *et al.*, 1999, Oliva *et al.*, 1995). NagB est une enzyme allostérique de type K, activée hétérotropiquement par GlcNAc6P ou homotropiquement (à cause d'une coopérativité positive) par une haute concentration du substrat GlcN6P. Son mécanisme a été étudié par l'étude chimique, enzymologique et cristallographique de protéines sauvages et mutantes (Bustos-Jaimes *et al.*, 2002, Horjales *et al.*, 1999, Montero-Moran *et al.*, 2001, Oliva *et al.*, 1995).

La croissance sur GlcN est plus lente que sur GlcNAc. L'effet limitant majeur durant la croissance sur GlcN est la quantité de protéine NagB, à cause d'un niveau d'induction beaucoup plus faible de l'opéron *nagE-nagBACD* par rapport à la croissance sur GlcNAc. Il a été aussi observé que la croissance s'améliore lorsque la quantité du transporteur du GlcN augmente, et donc le taux d'absorption du substrat augmente aussi. L'enzyme NagB semble pleinement active durant la croissance sur GlcN. L'explication pourrait être que la croissance

sur GlcN génère suffisamment de GlcNAc6P pour activer allostériquement l'enzyme. Et dans ce cas, l'origine du GlcNAc6P pour l'activation allostérique devrait venir du recyclage du peptidoglycane (Fig. 6) (Alvarez-Anorve et al., 2009, Alvarez-Anorve et al., 2005).

L'utilisation des sucres aminés chez *B.subtilis* est beaucoup moins connue. L'analyse de la séquence de l'ADN montre que *B.subtilis* possède deux homologues à NagB d'*E.coli* qui sont appelés *nagB* et *gamA* (ou *nagBA* et *nagBB*). La protéine NagB a été purifiée et cristallisée par Vincent *et al.* et cette enzyme est non-allostérique (Vincent *et al.*, 2005). GamA est en train d'être caractérisée par nos collègues mexicains (laboratoire de Mario Calcagno) et n'est pas non plus allostérique.

Les désaminases NagB sont ubiquitaires. Chez la plupart des organismes, procaryotes et eucaryotes, les enzymes sont des orthologues de NagB, avec une triade catalytique conservée d'acides aminés facilement identifiables. Dans beaucoup de cas, les enzymes NagB purifiées, par exemple une enzyme chez le chien et deux enzymes humaines clonées (hGNPDA) sont hexamériques et allostériquement activées par GlcNAc6P, comme la version d'*E.coli* (Alvarez-Anorve et al., 2011). D'autres orthologues de NagB existent sous forme de dimères (*Candida albicans*) ou de monomères (NagB de *B.subtilis*) et sont non allostériques. Le grand nombre d'enzymes allostérique conservées, surtout chez les mammifères, suggère que la régulation allostérique joue un rôle important dans la fonction cellulaire de ces enzymes (Alvarez-Anorve et al., 2011, Alvarez-Anorve et al., 2009).

4.1.2. Le répresseur NagC et l'expression de l'opéron nagE-nagBACD

nagC code un répresseur et est inhibé par le GlcNAc6P. La présence d'un site de fixation de la protéine CAP entre les gènes *nagE* et *nagB* montre que le régulon *nag* est contrôlé par le complexe AMPc-CAP et que l'expression du régulon est sensible à la présence de glucose dans le milieu. L'expression de *nagE* est plus dépendant de l'AMPc/CAP que *nagB* (Alvarez-Anorve et al., 2005, Plumbridge & Kolb, 1998, Plumbridge, 1990). Des expériences d'empreinte à la DNase I et de gel retard ont montré que l'expression des gènes *nagE* et *nagB,A* est régulée en parallèle par NagC. Celui-ci se lie à deux opérateurs (la boîte E et la boîte B), qui chevauchent les promoteurs de *nagE* et *nagB*. La répression résulte de la formation d'une boucle sur l'ADN (Fig.7) (Plumbridge & Kolb, 1993). Ces deux sites de fixation des protéines situés du même côté de la double hélice sont séparés de 93 paires de bases (pb) et les boîtes sont quasi-palindromiques, une caractéristique de la plupart des sites

de liaison des répresseurs chez les procaryotes. La croissance sur GlcNAc produit du GlcNAc6P qui se lie à NagC, le déplace de ses opérateurs, et induit l'expression des gènes *nag*.

Le transport du GlcN dépend du ManXYZ. ManXYZ est capable de transporter plusieurs sucres, dont le glucose, mannose et le GlcNAc. L'expression de l'opéron *manXYZ* est contrôlée par le répresseur Mlc, homologue de NagC. Mlc est principalement impliqué dans le contrôle de l'utilisation du glucose, et Mlc est induit lors de la croissance sur glucose mais aussi, plus faiblement, lors de la croissance sur d'autres sucres PTS. ManXYZ est également dépendant de l'AMPc/CAP pour son expression et l'effet de répression catabolique du glucose sur *manXYZ* est plus important que l'induction de Mlc, donc l'expression n'est pas augmentée pendant la croissance sur Glc ou GlcNAc, et seulement légèrement durant la croissance sur GlcN (Plumbridge, 1998a).

4.2 Anabolisme

Les sucres aminés sont des composants majeurs de l'enveloppe cellulaire bactérienne. En l'absence de sucres aminés exogènes, une enzyme anabolique essentielle, la GlcN6P synthase (GlmS codé par le gène *glmS*) est requise pour la biosynthèse du GlcN6P et donc, par la suite, de l'UDP (Uridine DiPhosphate)-GlcNAc (Fig.6). Le gène *glmS* fait partie de l'opéron *glmUS* activé par NagC (Plumbridge, 1995). *glmU* est le gène codant la GlcNAc1P uridyltransférase et se trouve en amont de *glmS* chez *E.coli*. Cette voie commence avec la synthèse *de novo* du GlcN6P.

En absence d'un apport exogène de sucres aminés, l'enzyme GlcN6P Synthase (GlmS) est essentielle. Son expression est contrôlée à plusieurs niveaux. Premièrement, il y a une régulation transcriptionnelle positive de l'opéron *glmUS* par NagC qui réduit son expression quand le niveau des gènes du régulon *nag* est déréprimé, NagC agissant comme un activateur en absence de sucres aminés exogènes (Plumbridge, 1995). Deuxièmement, il existe un mécanisme de contrôle post-transcriptionnel élaboré, impliquant deux petits ARNs, GlmY et GlmZ et probablement une protéine sensible du GlcN6P, YhbJ, qui réduit l'expression de GlmS quand le taux de GlcN6P est élevé. Ceci démontre l'importance de la production contrôlée de GlcN6P (Kalamorz *et al.*, 2007).

Les enzymes cataboliques (NagA et NagB) et anabolique (GlmS) impliquées dans le métabolisme des sucres aminés catalysent des réactions physiologiquement inverses. De ce

fait, la régulation des gènes et des enzymes doit être hautement coordonnée afin d'éviter un cycle futile (Plumbridge et al., 1993).

Chez les Gram positifs, l'expression de GlmS est contrôlée par un ribozyme, un riboswitch catalytique, qui est activé par la GlcN6P. Les riboswitchs sont des éléments d'ARN agissant en *cis* qui contrôlent l'expression de gènes en détectant directement le niveau de certaines petites molécules. Le riboswitch du ribozyme GlmS est contenu dans le 5'-UTR (untranslated regions = régions non traduites) de l'ARNm codant pour la GlcN6P synthétase. Ce riboswitch a une activité d'auto-clivage qui s'active quand il se lie au GlcN6P. Les riboswitchs sont formés de deux domaines. Un domaine aptamer reconnaît et se lie à des petites molécules. La liaison est signalée à un domaine effecteur qui dans le cas du ribozyme de GlmS, clive l'ARN pour moduler l'expression du gène. En présence du ligand, la conformation du riboswitch séquestre un segment du 5'UTR dans une région fortement structurée. Dans la conformation sans métabolite, le même segment participe au contrôle de la traduction (par exemple, il interagit avec ou contient une séquence Shine-Dalgarno) ou de la transcription (par exemple, il forme un terminateur transcriptionnel ou un anti-terminateur) (Dambach & Winkler, 2009, Edwards *et al.*, 2007).

Pour entrer dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane (PG), le GlcN6P est d'abord converti en GlcN1P par l'enzyme codé par *glmM* puis en UDP-GlcNAc, par l'enzyme bifonctionnelle GlmU qui est une acétylase et une uridyl-transférase. UDP-GlcNAc est l'intermédiaire cytoplasmique primaire dans la synthèse du peptidoglycane (PG) et du LPS de la membrane externe (Fig.6). Le PG est constamment produit et il est en perpétuel renouvellement. Les couches supérieures du PG sont donc dégradées pour laisser la place à de nouvelles couches. De nombreuses enzymes participent à cette dégradation ; chez *E.coli*, leur rôle est de récupérer le matériel produit, libéré et de le réutiliser pour synthétiser plus de PG ou comme source d'énergie. Quelques une de ces enzymes montrées ont apparemment été recrutées dans une autre voie métabolique, c'est le cas de NagE (transporteur PTS Nag) et NagA (GlcNAc6P désacétylase) (Fig. 6). Il a été montré que dans des mutants délétés pour le gène *nagA*, du GlcNAc6P s'accumule en grande quantité et que le recyclage du PG est inhibé. Cette observation suggère que le GlcNAc6P provient du recyclage, et donc que NagA joue un rôle critique dans ce processus. Des mutations dans les gènes codant les enzymes clés en amont du gène *nagA* dans la voie de recyclage (*ampG*, *nagZ*, *nagK*, *murQ* et *anmK*) qui étaient censées interrompre le processus de recyclage, réduisaient mais n'éliminaient pas

l'accumulation du GlcNAc6P. Une mutation dans le gène *nagE* dans une souche mutée *nagA* provoquait une diminution de 50% de la quantité du GlcNAc6P ; en combinaison avec des mutations dans les différents gènes de la voie de recyclage, l'accumulation de GlcNAc6P était éliminée. Le recyclage génère de la GlcN6P qui peut être réincorporé dans les cycles suivant de synthèse du PG et du LPS. La GlcNAc6P venant du transport de la GlcNAc externe doit aussi être désacétylé avant d'être incorporé dans la paroi cellulaire (Plumbridge, 2009a).

I.5 Comparaison d'*E. coli* et *B. subtilis*

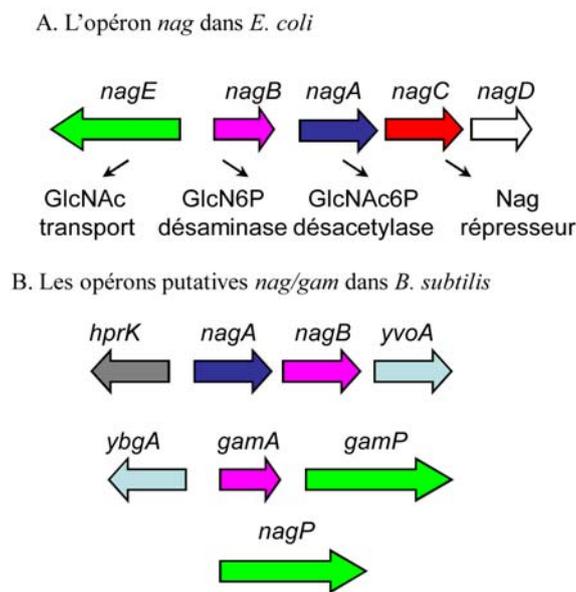


Figure 8: Les gènes codant les protéines homologues sont représentés avec des ombrages de même couleur. Rose, GlcN6P désaminase; bleu foncé, GlcNAc6P désacetylase; vert, transporteur PTS; rouge, régulateur type ROK; bleu clair, régulateurs type GntR.

E.coli et *B.subtilis* sont les organismes modèles des organismes à Gram négatif et à Gram positif et il devient de plus en plus évident que ce qui est vrai pour *E.coli* ne l'est pas forcément pour *B.subtilis*. Dans toutes les espèces, les protéines sont mieux conservées que leur régulation. Chez *E.coli* et *B.subtilis*, des différences existent au niveau des protéines présentes et les stratégies de régulation sont fondamentalement différentes. Le mécanisme de régulation prédominant pour plusieurs classes de gènes chez *B.subtilis* contrôlant notamment l'absorption de sucres, la synthèse de protéines ribosomales ou la biosynthèse d'acides aminés, est l'anti-termination transcriptionnelle (Section 3.2.2). En revanche, *E.coli* fait une plus grande utilisation des répresseurs transcriptionnels et/ou traductionnels. Même lorsque la

régulation est post-transcriptionnelle, les stratégies adoptées sont différentes entre les deux organismes. Par exemple, dans les deux cas, les niveaux d'ARNm de *glmS* sont contrôlés post-transcriptionnellement par les mécanismes de détection du GlcN6P. Toutefois chez *E.coli*, le mécanisme implique deux petits ARNs, l'ARNaseE et une nouvelle protéine sensible au GlcN6P tandis que chez *B.subtilis*, l'expression de *glmS* est contrôlée par un riboswitch sensible au GlcN6P qui sert aussi de ribozyme.

Le métabolisme des sucres aminés a été assez bien étudié chez *E.coli* mais très peu chez *B.subtilis*. Dans les années 1960's, les enzymes pour l'utilisation des sucres aminés, la désacetylase NagA et la déaminase NagB ont été identifiées dans les deux espèces (Bates & Pasternak, 1965a, Bates & Pasternak, 1965b, White & Pasternak, 1967) mais chez *E.coli*, les études ont évolués avec la caractérisation des cinétiques de ces enzymes (NagB comme modèle d'enzyme allostérique) (Bustos-Jaimes et al., 2002, Calcagno *et al.*, 1984) et l'étude de la régulation de l'expression des gènes (décrit plus haut). Récemment, les enzymes NagB et NagA de *B.subtilis* ont été purifiées, et leurs structures cristallographiques déterminées (Vincent et al., 2005, Vincent *et al.*, 2004). Malgré une forte homologie avec celui d'*E.coli*, il a été proposé que NagB a une structure monomérique et n'est pas allostérique. En ce qui concerne le paralogue de NagB, GamA, rien n'était connu sur cette protéine, c'est pourquoi, nos collaborateurs mexicains (l'équipe de Mario Calcagno) ont commencé sa purification et sa caractérisation enzymatique. Elle est dimérique et n'est pas allostérique. L'enzyme NagA de *B.subtilis* est dimérique (Vincent et al., 2004).

Chez *B.subtilis*, Reizer *et al.* ont identifié plusieurs sucres transportés par le PTS et ils ont vu qu'à la différence d'*E.coli*, la croissance sur GlcN est plus rapide que sur GlcNAc (Reizer et al., 1999). Par contre, les gènes structuraux des protéines requises pour le transport et l'utilisation des sucres aminés sont conservés. Cependant toute l'organisation génomique et la régulation semblent être différentes. Une recherche des gènes par homologie a montré qu'il y a deux transporteurs PTS homologues à NagE d'*E.coli*, NagP (EIICB) et GamP (EIICBA) et aussi deux copies de NagB d'*E.coli*, NagB et GamA et une seule copie de NagA. Le transporteur GamP est un homologue de PtsG. Les gènes codant ces protéines se trouvent dans trois locus différents sur le chromosome, les deux opérons (*hprK-nagAB-yvoA* et *gamAP-ybgA*) et un gène isolé pour *nagP* (Fig.8). Les gènes *ybgA* et *yvoA*, codant pour des régulateurs transcriptionnels putatifs de la famille GntR, sont associés aux deux opérons. Récemment, Bertram *et al.* ont montré qu'YvoA réprime l'expression des gènes du

Le gène *hprK* codant l'HPK kinase est l'enzyme clé dans le contrôle de la répression catabolique (CCR) chez *B.subtilis* (Section 3.3). L'expression d'*hprK* n'a jamais été étudiée et son promoteur n'a pas été localisé. Or ce gène étant seulement à 182 pb du gène *nagA*, il serait intéressant de savoir si son expression est contrôlée par le même régulateur que les gènes *nagAB* et donc finalement par le GlcNAc.

Mon projet a été d'étudier le rôle des gènes *nag* et *gam* ainsi que leurs régulateurs dans l'utilisation des sucres aminés chez *B. subtilis*. Je présente ci-dessous les résultats obtenus, ainsi que leurs interprétations dans la discussion, et enfin les perspectives pour poursuivre cette étude.

II. Matériels et méthodes

2.1 Méthodes bactériologiques

Les souches d'*E.coli* et de *B.subtilis* utilisées sont listées dans la Table 1. La Table 2 p.71 donne la liste des plasmides, vecteurs et recombinants contenant les interruptions construites au cours de ce travail.

Espèce	Nom	Genotype	Références
E.coli	IPBC 1118c	F'(traD36 lacI ^q Δ(lacZ) M15 proA ⁺ B ⁺) supE thi Δ(lac-proAB) ΔhsdR	Souche du laboratoire (=JM101 hsdR)
	DY329	W3110 ΔlacUI69 nadA::Tn10 gal490 λcl857 Δ(cro-bioA)	(Yu <i>et al.</i> , 2000)
	BL21 pLys	F ⁻ ompT gal (dcm) (lon) hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ _{DE3} pLysS	Souche du laboratoire
B.subtilis	SSB1002	Bs 168Trp ⁺	Souche du laboratoire

Table 1: Souches utilisées et leurs génotypes

Le milieu riche utilisé pour *E.coli* et *B.subtilis* est LB. Les antibiotiques étaient utilisés aux concentrations pour *E.coli* d'ampicilline à 100 µg/ml (sauf plasmide dérivé de pXE1 simple copie où 50 µg/ml sont utilisés), de spectinomycine à 50 µg/ml et pour *B.subtilis*, la spectinomycine à 100 µg/ml. La résistance à l'érythromycine était sélectionnée sur milieu MLS (Erythromycin 0,5 µg/ml, lincomycin 10 µg/ml). Le milieu minimum utilisé pour *B.subtilis* était basé sur le milieu MOPS préconisé par Neidhardt pour *E.coli* (Neidhardt *et al.*, 1974) auquel nous avons ajouté du NH₄SO₄ 20 mM, et Citrate Ammonium Ferrique (CAF) à 0.022 mg/ml selon les recommandations de I. Martin-Verstraete (Martin-Verstraete *et al.*, 1995). Pour *B.subtilis*, les sucres étaient ajoutés pour le Glc à 0.5%, pour le GlcN et le GlcNAc à 25 mM. Le même MOPS milieu contenant du KGlutamate 0.8% et du Succinate 0.6% était utilisé pour les cultures sans sucres. Du Cas-amino-acids (= Cas) à 0.5% était ajouté pour les cultures de dosage b-gal et la préparation d'ARNm.

La transformation d'*E.coli* était faite par la méthode classique utilisant le CaCl₂. Pour rendre *B.subtilis* compétente, une préculture était faite dans 3 ml de LB. Le lendemain, les

bactéries étaient diluées à une densité optique (DO) à 0.04 dans 20 ml de milieu MD medium [tampon citrate phosphate 1X (3 mM citrate, 105 mM phosphate), Glc 2%, L-Trp 0.05 mg/ml, CAF 0.011 mg/ml, Potassium aspartate 2 mg/ml, MgSO₄ 3 mM] plus 0.075% caséine hydrolysate et poussées à 37°C jusqu'au point de transition entre la phase exponentielle vers la phase stationnaire (une DO à 650 nm (A_{650}) d'environ 1-1.2). Puis elles ont été cultivées pendant 90 minutes à 37°C. Un volume de 10ml était centrifugé à 6000 rpm, 10 minutes à température ambiante. Le surnageant était mis de côté et le culot était repris dans 1 ml de surnageant plus 115 µl de Glycérol 80%. Les bactéries compétentes étaient aliquotées et congelées à -80°C. Pour transformer, un aliquote de 50 µl de *B.subtilis* compétentes était repris dans 200 µl de MD medium sans caséine hydrolysate auquel était ajouté environ 0.25 µg de plasmide répliquative ou 2.5 µg de plasmide intégratif ou 5 µg d'ADN chromosomique et laissés pousser 20 minutes à 37°C. Au bout de ce temps, nous ajoutions 200 µl de milieu 2xTY et laissons pousser 90 minutes à 37°C. Les clones étaient sélectionnés sur une des boites contenant le milieu spécifique.

2.2 Interruption des gènes et mise en place du système de cassette excisable par l'enzyme Flippase chez *B.subtilis*

2.2.1 Clonage des régions chromosomiques de *B.subtilis*

a) Les régions du chromosome de *B.subtilis* contenant les gènes d'intérêt, *nag* et *gam* et leurs régulateurs (*ybgA*, *yvoA*), étaient d'abord clonés dans un vecteur pJRD184 (plasmide multicopie dans *E.coli*, non répliquable en *B.subtilis*). Trois régions étaient clonées contenant les gènes *ybgA-gamAP*; *hprK - nagAB yvoA* et *nagP*. Le gène *ptsG* était aussi cloné.

Les différentes régions étaient amplifiées par PCR sur l'ADN de *B.subtilis* avec des oligos portant un site de restriction (Table 2 p.71). Les fragments étaient ensuite purifiés avec le kit « Nucléospin extract II ».

Le mélange PCR était composé de tampon HF 1X fournis par Finnzymes, dNTP 0.2mM, oligo 0.8 pmoles/µL, ADN 30ng/µl, enzyme Phusion (selon les recommandations de Finnzymes) dans un volume final de 50 µl et le programme était composé des cycles sous deux conditions :

98°C	30 secondes	
98°C	10 secondes	} x 10
56°C	15 secondes	
72°C	30 secondes /kb	
98°C	10 secondes	} x 20
62°C	15 secondes	
72°C	30 secondes /kb	
72°C	7 minutes	

Le fragment *ybgA gamAP* était purifié sur gel d'agarose, digéré aux extrémités par les enzymes de restriction (ER) BamHI-XbaI (donc les sites étaient inclus dans les oligos). Le vecteur pJRD184 était digéré par les mêmes enzymes. L'opéron *hprK nagAB yvoA* était digéré à l'extrémité 5' par l'enzyme de restriction BamHI. Le vecteur pJRD184 était digéré par les ER BamHI-StuI dont StuI donne une extrémité bout franc pour permettre à l'extrémité 3' bout franc de l'opéron *nag* de se lier au vecteur. Le vecteur était déphosphorylé par l'enzyme « Antarctique phosphatase ». Les fragments étaient ensuite ligués dans leur vecteur pJRD184 respectif par l'enzyme « T4 DNA Ligase » puis transformés dans *E.coli* IBPC1118c (JM101 Δ *hsdR*) (rendue compétente par traitement au CaCl₂). Les colonies portant un plasmide étaient sélectionnées sur une boîte LB ampicilline 100 μ g/ml (LB Amp100) à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et la présence des inserts contrôlés par « miniPCR » (une PCR analytique dans un petit volume utilisant les bactéries entières comme source de matrice d'ADN). Pour la miniPCR sur colonies, nous avons employé des oligos correspondant aux séquences plasmidiques entourant le site de clonage ainsi que des oligos se trouvant dans le fragment inséré. Une colonie était resuspendue dans 100 μ l d'eau, vortexée puis 1 μ l était utilisé dans une miniPCR contenant un volume final de 5 μ l (Tampon Thermopol 1X fourni par Biolabs, dNTP 0,25mM, oligos 1 pmoles/ μ l, enzyme Taq (0,5 unités) (selon les recommandations de Biolabs)) en utilisant des oligos permettant d'amplifier la région à vérifier dont le programme est:

94°C	2 minutes	
92°C	30 secondes	} x 25
53°C	30 secondes	
72°C	1 minute/kb	
72°C	7 minutes	

Les plasmides contenant des insertions étaient nommés pJRD/*ybgA gamAP* et pJRD/*nagAP yvoA*. Ils étaient purifiés avec le kit « Nucleospin Plasmid » et la totalité des inserts a été séquencée avec les oligos séparés par 700-800 pb pour permettre de vérifier toute la région des inserts.

Aussi nous avons construit des versions portant des inserts plus courts pour obtenir des plasmides correspondant à pJRD/*nagAB* ou pJRD/*nagB*. Les fragments *nagB* ou *nagAB* étaient amplifiés à partir du plasmide pJRD/*hprK nagAB yvoA* avec l'enzyme Phusion et les oligos BsNag4-8 ou BsNag5-8. Les inserts étaient phosphorylés par la Polynucléotide kinase (PNK). Le vecteur pJRD184 était digéré par l'ER EcoRV pour obtenir des bouts francs puis il était déphosphorylé. Les fragments étaient ligués avec le vecteur pJRD184, transformés dans *E.coli* IBPC1118c et sélectionnés sur une boîte LB Amp100 à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et les inserts contrôlés par miniPCR avec des oligos correspondant aux séquences plasmidiques entourant le site de clonage ainsi que des oligos se trouvant dans le fragment inséré (par exemple, les oligos BsNag1B- BsNag2Xba pour vérifier la région *hprK nagAB yvoA* et les oligos BsNag4-8 pour vérifier les gènes *nagAB*). Les fragments étant en bouts francs, ils pouvaient être insérés dans les deux sens. La mini-PCR nous permettait de distinguer l'orientation. Deux exemples des plasmides avec une structure correcte étaient purifiés.

b) Le fragment *nagP* était amplifié sur l'ADN de *B.subtilis* avec l'enzyme Phusion et les oligos 5'NagP NcoI- 3'NagP BamHI.

Nous n'avons pas réussi à cloner *nagP* dans un vecteur multicopie chez *E. coli*. Nous avons donc utilisé le plasmide pXE1, simple copie. Le fragment *nagP* était digéré aux extrémités par les ER NaeI-StuI (le gène *nagP* était toujours entier mais le fragment était plus petit). Le vecteur pXE1 (Table 2) était digéré par l'ER XbaI, polymérisé en bouts francs par la T4 DNA polymérase en présence des dNTPs et déphosphorylé. Le fragment était ligué avec le vecteur pXE1, transformé dans *E.coli* IBPC1118c et sélectionné sur une boîte LB Amp 50 µg/ml (LB Amp50) à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et les inserts contrôlés par miniPCR avec les oligos entourant le site d'insertion dans pXE1 (XE1-RBP22). Les fragments étant en bouts francs, ils pouvaient être insérés dans les deux sens. La mini-PCR nous permettait de distinguer l'orientation. Les plasmides étaient nommés pXE/*nagP*. Deux exemples des plasmides avec une structure correcte et une orientation différente de l'insert étaient purifiés.

Le fragment *ptsG* était amplifié sur l'ADN de *B.subtilis* avec l'enzyme HD Advantage et les oligos PtsG2XbaI- PtsG4BamHI. Le fragment *ptsG* était digéré aux extrémités par les ER XbaI-BamHI. Le vecteur pXE1 était digéré par les ER XbaI-BamHI et déphosphorylé. Le fragment était ligué avec le vecteur pXE1, transformé dans *E.coli* IBPC1118c et sélectionnés sur une boîte LB Amp50 à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et les inserts contrôlés par miniPCR avec les oligos entourant le site d'insertion dans pXE1 (PtsG2 XbaI-XE1). Les plasmides étaient nommés pXE/*ptsG* et purifiés.

La totalité des inserts a été séquencée avec les oligos séparés par 700-800 pb pour permettre de vérifier la séquence des inserts.

Les gènes *nagP* et *ptsG* étaient clonés dans un vecteur simple copie pXE1 chez *E.coli* car ce sont des protéines membranaires donc la surproduction chez *E.coli* à partir d'un vecteur multicopie risque d'être nocive (l'hypothèse pour laquelle nous n'avons pas eu de problème pour cloner *gamP* est qu'il n'est probablement pas toxique car il amène son propre régulateur répresseur transcriptionnel, YbgA).

2.2.2 Remplacement des gènes *gam* et *nag* par les cassettes de résistance à la spectinomycine dans les plasmides.

Deux types de remplacement étaient utilisés:

- Remplacement de l'ORF

Au départ, nous avons voulu réalisé des constructions permettant de remplacer la phase ouverte de lecture (ORF) du gène d'intérêt sur un plasmide par la phase ouverte du gène de résistance Spectinomycine par recombinaison in vivo (Technique "recombineering" par les méthodes de Datsenko et Wanner et de Yu *et al.* (Datsenko & Wanner, 2000, Yu *et al.*, 2000). Dans les inserts *gamA::spec* et *nagB::spec*, l'ORF de la cassette spectinomycine était exprimé par le promoteur et les sites de démarrage de la traduction de *gamA* et *nagB*. Ces constructions étaient faites dans les plasmides pJRD/*ybgA gamAP* et pJRD/*nagAB* transformés dans la souche *E.coli* DY329.

Nous avons amplifié l'ORF (cadre ouvert de lecture) du gène *spec* du plasmide pDG1727 avec des oligos 5'*gamASpec*/3'*gamASpec* et 5'*nagBSpec*/3'*nagBSpec* portant à leur extrémité 5', 50 pb correspondant à l'extérieur du gène *gamA* ou *nagB* jusqu'au codon de démarrage et de terminaison et fusionné à leur extrémité 3' avec 30 pb correspondant aux

extrémités 5' ou 3' de l'ORF du gène de résistance Spectinomycine. Les 50 pb aux extrémités servaient de cible pour la recombinaison. Le fragment était purifié avec le kit « Nucleospin Extract II ». Nous avons eu des difficultés à amplifier la cassette spectinomycine avec l'enzyme « Phusion ». Nous avons essayé avec l'enzyme « Taq » et obtenions l'insert mais le risque d'erreurs lors de l'amplification étant importante, nous avons donc décidé d'utiliser l'enzyme « HD Advantage ». Cette enzyme amplifie l'insert avec peu de risque d'erreur et s'est montrée être très efficace pour l'amplification de la cassette spectinomycine.

Les cassettes *gamA::spec* ou *nagB::spec* étaient insérées par électroporation dans les bactéries DY329 électrocompétentes contenant les plasmides pJRD/*ybgAgamAP* ou pJRD/*nagAB* ou pJRD/*nagB*. DY329 porte un lambda défectueux qui exprime les gènes *red*, *beta*, *gamma* qui permettent la recombinaison efficace entre un ADN linéaire et sa cible (Yu et al., 2000). Pour rendre les bactéries électrocompétentes, une préculture dans 3 ml de LB Amp100 était lancée. Le lendemain, 0.35 ml de préculture était diluée dans 35 ml de LB Amp100 et laissée pousser à 30°C à une densité optique (DO) à 650 nm (A_{650}) de 0.5. Un choc thermique était fait à 42°C pendant 15 minutes sous agitation pour exprimer les gènes de la recombinaison et au bout de ce temps, l'erlen contenant la culture était mis dans un bain glacé. Un volume de 30 ml était centrifugé pendant 5 minutes à 6500 rpm à 4°C. Le surnageant était jeté et le culot repris dans 3 ml d'eau très pure froide. Les 3 ml étaient répartis dans 3 tubes Eppendorfs froids (lavage 1), centrifugés rapidement à 11000 rpm à 4°C. Les étapes de lavage étaient répétées encore deux fois (3 lavages). A l'issue du troisième lavage, le culot était repris dans 100 µl d'eau froide et les bactéries sont électrocompétentes. Pour réaliser l'électroporation, 100 ng d'ADN étaient mis dans des cuvettes d'électroporation froides sur la glace. Un volume de 50 µl de cellules électrocompétentes était ajouté. Les cuvettes étaient mises dans un électroporateur et un pulse (1800 Volt) déclenché. Tout suite après, 1 ml de LB (température ambiante) était ajouté et mélangé aux cellules et à l'ADN. Les 1 ml étaient transférés dans un tube Falcon de 10 ml et laissés pousser 90 minutes à 30°C sous agitation. Les bactéries transformées étaient sélectionnées sur des boîtes LB Spectinomycine 50 µg/ml (LB Spec50) à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et le remplacement du gène *gamA* ou *nagB* sur le plasmide par le gène *spec* était contrôlé par miniPCR avec un oligo s'hybridant à l'extrémité de l'insert (5' *gamA spec* par exemple) et un autre oligo s'hybridant sur le plasmide (souvent l'oligo RBP22 était utilisé) mais il était aussi vérifié avec les oligos portant l'extrémité *spec* (par exemple, 5' *gamA spec*-3' *gamA spec*) ce qui permettait de vérifier que le gène *spec* avait bien remplacé le gène d'intérêt et qu'il était

inséré au bon endroit dans le plasmide. Deux exemples des plasmides avec une structure correcte ont été purifiés.

Mais ce type d'insertion de la résistance à la spectinomycine ne permettait pas d'introduire facilement des mutations dans d'autres gènes pour cumuler par exemple les mutations dans les deux opérons *nagAB* ou *gamAP*. Nous avons donc voulu adapter chez *B.subtilis*, le système existant chez *E.coli* avec les cassettes excisables portant des extrémités FRT reconnues par l'enzyme « Flippase » (Datsenko & Wanner, 2000).

- Pour cela, nous avons construit un plasmide pBR/PS4-1FRTKan::*Spec*.

La cassette kanamycine entourée des sites FRT était amplifiée par PCR sur le plasmide pKD13 (Datsenko & Wanner, 2000) par les oligos PS4 et PS1 qui hybridait à l'extérieur des sites FRT, reconnus par la Flippase, et produisaient un fragment avec l'ordre PS4-FRT-kan-FRT-PS1. L'enzyme utilisée était la « Phusion » et le programme était:

98°C	30 secondes	}	x 25
98°C	10 secondes		
53°C	15 secondes		
72°C	30 secondes/kb		
72°C	7 minutes		

Le fragment était ensuite purifié avec le kit « Nucléospin extract II » puis phosphorylé par la PNK et cloné dans pBR322, coupé avec l'ER EcoRV et déphosphorylé pour produire le plasmide pBR/PS4-1 FRT kan.

Pour remplacer la cassette kanamycine (qui n'est pas exprimée chez *B.subtilis*) avec la cassette spectinomycine, nous avons utilisé une nouvelle approche qui permettait d'échanger un gène par une cassette de résistance. Cette méthode, appelé clonage par "Overlap extension PCR cloning" (OEPCR) (Bryksin & Matsumura, 2010) consiste à faire une PCR dans laquelle nous mettons en présence le plasmide portant le gène que l'on veut remplacer (la matrice) avec un fragment d'ADN portant la cassette avec les extensions de 50 pb sur les deux extrémités (Méga-primer) (Fig.10). Ces extensions servent d'amorces et sont ciblées vers le gène à remplacer.

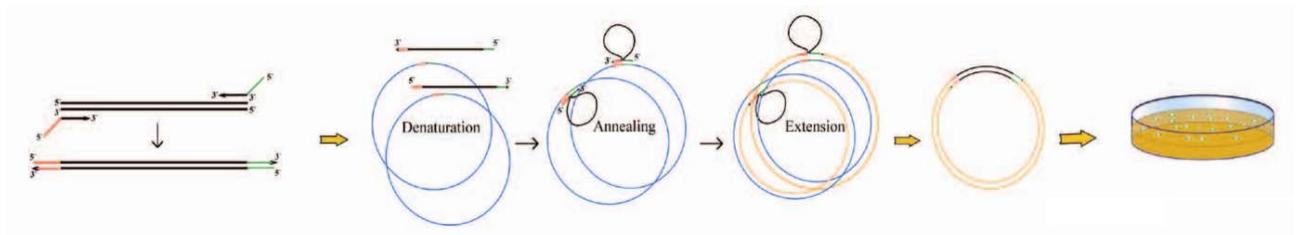


Figure 10 : Principe de la méthode « Overlap extension PCR cloning ». (Bryksin & Matsumura, 2010)

Nous avons amplifié la cassette complète de la résistance à la spectinomycine sur pDG1727 (1.3 kb) portant son promoteur et son terminateur avec les oligos 5'kan-spec et 3'kan-spec portant 50 bp aux extrémités 5', qui cible les extrémités de la cassette de résistance de la kanamycine, et 30 bp aux extrémités 3' pour hybrider sur la cassette spectinomycine, en utilisant l'enzyme HD Advantage (la seule enzyme efficace pour amplifier la cassette spectinomycine). Le fragment (Kan-spec) amplifié était purifié et utilisé dans l'OEPCR avec le plasmide pBR/PS4-1 *FRT kan* et servait comme "méga-primer". Le plasmide et l'amorce (Kan-spec) étaient dénaturés, ce qui permettait à chaque brin de l'amorce de s'hybrider sur chaque brin du plasmide par le biais des 50 pb à chaque extrémité du gène kanamycine. Pendant la PCR, il y a extension sur tout le long des deux brins du plasmide.

Le protocole consiste à mettre 3-30 ng de plasmide vecteur + 50 fois en excès molaire du méga-primer dans un volume final de 10 µl. Nous utilisons pour la PCR, l'enzyme Phusion et le programme suivant :

98°C	2 minutes	} x 25
98°C	30 secondes	
43°C	30 secondes	
68°C	1minute et 30 secondes/kb	
68°C	1minute et 30 secondes/kb	

Le fragment amplifié était la taille entière du plasmide qui pouvait être 5-10 kb, ce qui entraînait que le temps de la PCR durait de 4-8 h. A l'issue de cette PCR (qui permet une amplification arithmétique et non exponentielle), chaque simple brin contenant la cassette spectinomycine à un bout d'un brin, pouvait s'hybrider avec le simple brin contenant la cassette spectinomycine à l'autre bout du brin complémentaire. Nous obtenions un plasmide

avec des « nicks » sur les deux côtés de la cassette spectinomycine non fermé. Le mélange de l'OEPCR était ensuite transformé dans *E.coli* qui comble les délétions en répliquant l'ADN pour synthétiser le plasmide portant le gène d'intérêt délété et remplacé par la cassette de résistance à la spectinomycine. Ceci avait produit le plasmide pBR/ *PS4-1 FRT Kan::Spec*, qui contenait la cassette spectinomycine entourée de 50 pb résiduels de la cassette kan plus les sites FRT et les séquences correspondants à PS4 et PS1.

Ce plasmide était utilisé par la suite pour amplifier la cassette FRT-spec avec des amorces portant les extrémités du gène que nous souhaitions remplacer et les fragments FRT (Fig. 11). Ensuite, la cassette FRT-spec portant les extrémités du gène que nous souhaitions remplacer était utilisée dans une autre expérience d'OEPCR avec un plasmide portant les gènes *nag* ou *gam* de *B.subtilis* pour remplacer le gène choisi.



Figure 11 : Structure de la cassette FRT-spec. Insert portant la cassette spectinomycine plus les séquences FRT (reconnues par l'enzyme "Flippase") fusionnées à 50 pb de chaque extrémité du gène d'intérêt.

Par exemple pour le remplacement du gène *gamP*, l'insert *gamP::PS4-1 FRT spec* était amplifié à partir de la construction pBR/*PS4-1Kan::Spec* portant la cassette Spectinomycine plus les extrémités FRT par le biais d'amorces correspondant à 50 pb de l'extrémité 5' ou 3' du gène d'intérêt fusionné aux oligos PS1 ou PS4 (Fig.11). Les points de jonction des 50 pb, qui ciblaient le gène à remplacer, avec PS4 et PS1, permettait l'amplification du fragment choisi soigneusement pour permettre qu'après excision par la Flippase, l'ADN qui restait (appelé le "scar"), constituait une petite phase ouverte qui démarrait au codon de démarrage du gène remplacé et terminait au codon de terminaison de la traduction.

Nous avons donc utilisé l'OEPCR avec pour matrice pJRD/*ybgA gamAP* et pour insert (méga-primer), *gamP::PS4-1 FRT spec*. A l'issue de cette PCR, 2 µl étaient transformés dans *E.coli* IBPC1118c pour amplifier le plasmide pJRD/*gamA::spec FRT* et sélectionner sur LB Spec50 Amp100 à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et l'insert contrôlé par miniPCR avec un oligo s'hybridant à l'extrémité de l'insert (5'GamP PS4 par

exemple) et un autre oligo s'hybridant sur le plasmide (souvent l'oligo RBP22 était utilisé pour le plasmide pJRD et XE1 pour le plasmide pXE1). Il était aussi vérifié avec un oligo portant l'extrémité FRT et un oligo à l'extérieur du gène (par exemple, 5'GamP PS4-Gam9) ce qui permettait de vérifier que le gène *spec* avait bien remplacé le gène d'intérêt et qu'il était inséré au bon endroit dans le plasmide. Les plasmides étaient purifiés avec le kit « Nucleospin Plasmid ». Par cette méthode, les gènes suivants ont été remplacés : *gamA*, *gamP*, *gamAP*, *ybgA*, *nagB*, *nagA*, *nagAB*, *yvoA*, *nagP*, *ptsG*.

La table 2 p.71 donne la liste des plasmides contenant les interruptions construites au cours de ce travail.

2.2.3 Remplacement des gènes sur le chromosome de *B.subtilis*.

Les plasmides portant les gènes remplacés par la cassette spectinomycine (soit remplacement de l'ORF, soit excisable) étaient transformés dans *B.subtilis* afin de remplacer les gènes *nag* ou *gam* ou les régulateurs (*ybgA*, *yvoA*) sur le chromosome par double recombinaison homologue. Les clones étaient sélectionnés sur LB Spectinomycine 100 µg/ml (LB Spec100) à 37°C sur la nuit. Les plasmides pJRD184 et pXE1 ne sont pas replicables chez *B.subtilis* donc la seule manière pour avoir la résistance à la spectinomycine est d'insérer le plasmide sur le chromosome soit par double, soit par simple recombinaison. Les colonies étaient purifiées trois fois et nous vérifions la recombinaison sur le chromosome par miniPCR avec une association de paires d'oligos pour vérifier que le remplacement du gène sauvage par la cassette avait été fait en une seule copie (par exemple, nous devons obtenir une région plus courte pour GamP avec les oligos Gam4B-Gam9) et sans intégration du plasmide, nous ne devons rien obtenir avec la paire d'oligos 5'GamP PS4-RBP22.

2.2.4 Construction d'un plasmide exprimant la Flippase chez *B.subtilis* et curage des cassettes FRT *spec*

Nous avons construit un plasmide portant le gène de la Flippase fonctionnant chez *B.subtilis*. Le gène *flp* cloné dans le plasmide pCP20 était sous contrôle du promoteur de cI de lambda et n'était pas exprimé chez *B.subtilis*. Nous avons donc dessiné des oligos nous permettant d'amplifier le gène *flp* sur pCP20 et de le cloner en aval d'un promoteur pSpac_MCS associé avec le gène LacI inductible par IPTG ou d'un promoteur pXyl associé

avec XyR et inducible par le Xylose. Le fragment portant pSpac_LacI était récupéré avec les ER BamHI-EcoRI sur le plasmide pDG148 puis purifié et celui de pXyl XylR par digestion avec les ER BamHI-NruI sur le plasmide pHMX3 puis purifié. Dans un premier temps, ces deux fragments portant le promoteur et son répresseur étaient clonés dans un vecteur pYH224, répliquable chez *B.subtilis* et portant une origine de répllication thermosensible à 42°C.

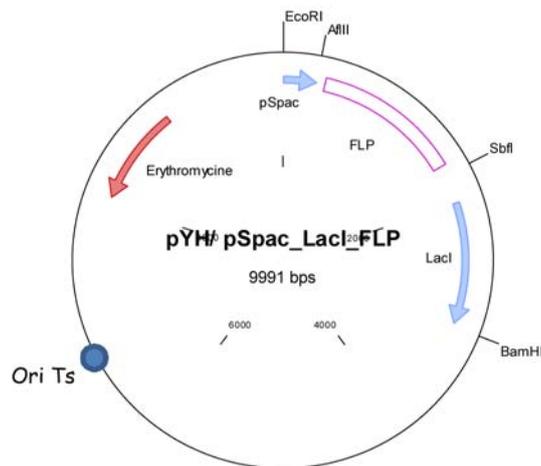


Figure 12 : Structure du plasmide pYH/pSpac_LacI flp. Le plasmide pYH/pSpac_LacI flp est dérivé de pYH224 portant une origine thermosensible (rond bleu). Le promoteur pSpac est contrôlé par lacI (Flèche bleu) en amont du gène de la Flippase (boite magenta). Le gène de résistance est l'érythromycine (flèche rouge).

Pour introduire le pSpac + lacI dans pYH224, le plasmide était digéré par les ER BamHI-EcoRI, déphosphorylé, ligé avec l'insert et transformé dans *E.coli* IBPC1118c. Pour introduire le pXyl + XylR dans pYH224, le plasmide était digéré par les ER BamHI-SmaI, déphosphorylé, ligé avec l'insert et transformé dans *E.coli* IBPC1118c. Les transformants étaient sélectionnés sur LB Amp100, purifiés et vérifiés par miniPCR. Pour introduire le gène de la Flippase en amont du promoteur pSpac ou pXyl, la Flippase était amplifiée à partir de pCP20 utilisant les oligos FLP AflIII/ SbfI ou FLP MluI/BamHI. Le fragment FLP AflIII/ SbfI et le plasmide pYH/pSpac_LacI étaient digérés avec les ER AflIII-SbfI. Pour la construction avec pXyl, le vecteur et l'insert FLP étaient digérés avec les ER MluI-BamHI. Ils étaient ligés puis transformés dans *E.coli* IBPC1118c, sélectionnés sur LB Amp100, vérifiés par miniPCR puis purifiés. Les plasmides obtenus, pYH/pSpac_LacI flp (Fig. 12) et pYH/pXyl_XylR flp, étaient ensuite transformés dans les mutants de *B.subtilis* contenant les cassettes spectinomycine entourées des sites FRT et sélectionnés sur LB MLS à 30°C. Les bactéries étaient purifiées sur des boîtes LB contenant soit de l'IPTG 0.5mM, soit du xylose

(pour faire exprimer la Flippase) à 42°C pendant la nuit pour chasser le plasmide (Fig. 13). La Flippase reconnaît les extrémités FRT et recombine entre les deux répétitions en éliminant l'ADN qui se trouve entre les sites FRT. Les bactéries poussant à 42°C étaient ensuite purifiées 1 ou 2 fois à 37°C. L'absence du plasmide et de la cassette spectinomycine étaient vérifiées sur boîtes LB MLS et LB Spec100. Nous avons vérifié que les deux plasmides Flp fonctionnaient mais nous utilisons de préférence le pYH/p*Spac_LacI_flp*. Une faible activité du promoteur p*Spac* en absence d'IPTG permettait de commencer l'excision dès la transformation à 30°C.

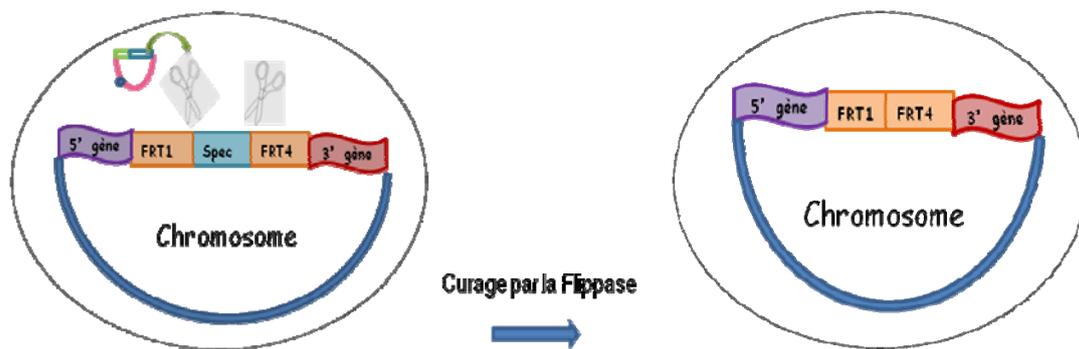


Figure 13 : Curage de la cassette Spectinomycine. Plasmide pYH/p*Spac_LacI_flp* en rose.

L'élimination de la cassette est vérifiée par des miniPCRs appropriées. Un fragment d'ADN chevauchant le gène excisé était amplifié sur les bactéries. Le fragment purifié était envoyé à séquencer. Nous nous sommes rendus compte du soin qu'il faut apporter pour le choix des oligos permettant d'amplifier la cassette spectinomycine au début pour s'assurer que l'ADN formant le scar résiduel fait une petite protéine d'une trentaine d'acides aminés qui commence au AUG et termine au TAA du gène remplacé (Fig.14). Et ceci afin de réduire les effets de type polarité sur les gènes en aval.



Figure 14 : Exemple de séquence portant les 50 pb amorce/ ps4-scar-ps1-50 pb.

Les séquences en jaune sont les véritables séquences chromosomiques en amont et en aval du gène remplacé, dans ce cas *gamA*. Les séquences des oligos PS4 et PS1 sont soulignées en cyan et en rose et le site simple FRT après curage en vert foncé. La traduction de la petite phase ouverte restante est indiquée avec le codon de démarrage ATG en vert et de terminaison TAA en rouge.

2.3 Miniprep d'ADN chromosomique de *B.subtilis*

Un volume d'1 ml d'une culture presque saturée en TY 2X était centrifugé. Le culot était lavé, resuspendu et recentrifugé avec 1ml de TE 1X contenant NaCl 0.1 M à température ambiante. Le culot était resuspendu dans 150 µl de Sucrose 25%/Tris pH 8 50 mM/EDTA 5 mM, avec 50 µl de lysozyme (10 mg/ml) et 1 µl de RNaseA (10 mg/ml) puis incubé 15 à 30 minutes à 37°C. Un volume de 200 µl de SDS 1%/Protéinase K (1 mg/ml)/Tris pH8 50 mM/EDTA 400 mM était ajouté et incubé 2 heures à 50°C. Un mélange de 400 µl de Phénol/CHCl₃ (3:1) était ajouté, agité 5 minutes et centrifugé 10 min à 13000 rpm. Le surnageant correspondant à l'ADN était prélevé et mélangé avec 40 µl de LiCl 10 M et 1 ml EtOH, précipité 15 minutes à -20°C et centrifugé 10 minutes à 13000 rpm. Le culot était rincé avec 1 ml EtOH 70%, centrifugé 2 minutes. Le culot était ensuite séché sous vide 3 minutes puis repris dans 200 µl de TE 1X ou d'eau. L'ADN fait par cette technique était utilisé pour transformer dans *B.subtilis* sauvage ou dans nos mutants, les mutations présentent dans d'autres souches de *B. subtilis* comme le *ptsG::cm* (Stulke et al., 1997) ou le *ptsI::kan* (cadeau de J. Deutscher).

2.4 Extraction d'ARN de *B.subtilis*

Les bactéries ont été poussées dans du MOPS CAF/NH₄ avec ou sans sucres à une densité optique (DO) à 650 nm (A_{650}) d'environ 0.8. Un volume de 25 ml était prélevé, centrifugé et congelé à -20°C. Les ARN totaux étaient extraits par la méthode de phénol froid (Mayford & Weisblum, 1989). Le culot (20 DO) était resuspendu dans 1 ml de tampon TE

(Tris 10 mM-EDTA 1 mM) 1X froid et les cellules étaient cassées en présence de 3.5 g billes de verre (425-600 µm, SIGMA, G8772), de 0.5 ml de mélange de Chloroforme : alcool isoamylique (24 :1), de 0.125 ml de SDS 20% et de 3 ml d'eau saturée en phénol (pH5) en vortexant 3x1 minute avec au moins 1 minute d'intervalle dans la glace. Elles étaient centrifugées 10 minutes, 8000 rpm à 4°C. Le surnageant était ensuite transféré dans 3 ml d'eau saturée en phénol froid (pH5), vortexé 3x1 minute avec au moins 1 minute d'intervalle dans la glace puis centrifugé. Le surnageant était précipité en présence de 400 µl de LiCl (chlorure de lithium) 10 M et 4 ml d'isopropanol, 60 minutes à -20°C. Le mélange était centrifugé 10 minutes, 8000 rpm à 4°C et le surnageant était éliminé. Le culot était séché sous vide. Il était resuspendu dans 400 µl d'eau, traité avec 40 µl de tampon RQ1 DNase et 2 µl de RQ1 DNase (M610A, 1000 unités selon les recommandations de Proméga) pendant 30 minutes à 37°C pour éliminer l'ADN. Un volume de 400 µl d'eau saturée en phénol (pH5) était ajouté et le mélange est vortexé 1 minute puis centrifugé 10 minutes, 13000 rpm à température ambiante. Le surnageant était transféré dans un tube contenant 400 µl d'eau saturée en phénol et 200 µl de mélange de Chloroforme : alcool isoamylique (24 :1), centrifugé 10 minutes, 13000 rpm à température ambiante. Le surnageant était mis en présence de 1200 µl d'éthanol plus 40 µl de LiCl 10 M, vortexé 1 minute et précipité sur la nuit à -20°C.

Le lendemain, la suspension était centrifugée 10 minutes, 13000 rpm à température ambiante. Le culot était lavé avec 200 µl d'éthanol 75% puis il était séché sous vide. Le culot était repris dans 50 µl d'eau stérile sans RNase. La concentration était mesurée en utilisant un NanoVue. Le rendement devait être entre 1-5 mg/ml et le rapport 260/280 était au environ de 2. L'ARN était gardé à -20°C.

2.5 Marquage des oligos ou du pBR322 digéré par MspI par la T4 polynucleotide kinase (PNK)

Les oligos marqués étaient utilisés comme sondes pour les Northern blots et l'extension d'amorce.

Le marquage d'un oligo permettait de synthétiser un fragment marqué à un bout pour la réaction d'empreinte à la DNase I. pBR322 digéré par MspI (Biolabs) ou le 1 KB plus ladder (Invitrogene) étaient utilisés comme marqueurs de taille sur les gels. Le marquage consistait à mélanger 4 µl d'oligo à 10 µM ou de marqueur 1kb Plus ladder, 2 µl de tampon de réaction PNK 10X, 2 µl de DTT 10mM, 3 µl de [γ -³²P] ATP (166 µCi/µl, 7000

mCi/mmmole) et 1,5 µl de T4 PNK 10 U/µl (selon les recommandations de Biolabs) dans un volume final de 20 µl. Le mélange était incubé au bain marie 30 minutes à 37°C. Pour être utilisé comme sonde pour une hybridation dans un Northern Blot, 30 µl d'eau étaient ajoutés et l'oligo était purifié sur colonne G25. Pour être utilisé dans une expérience d'extension d'amorce, le mélange était extrait en présence de 80 µl de NaAc 0.1 M avec 50 µl de phénol et 50 µl de mélange de Chloroforme : alcool isoamylique (24 :1) puis centrifugé 10 minutes à température ambiante. Le surnageant était transféré dans un nouveau tube Eppendorf auquel étaient ajoutés 250 µl d'éthanol et 1 µl de NaPO₄ 10 mM puis congelé en carboglace 30 minutes. Pour utiliser comme amorce pour faire une PCR pour l'empreinte à la DNase I, l'oligo était précipité sans extraction phénolique. Le tube était centrifugé 10 minutes à 4°C. Le surnageant était éliminé, le culot séché sous vide pendant 5 minutes. Le culot était ensuite resuspendu dans 30 µl d'eau sans RNase.

2.6 Northern Blot

Avant chaque manipulation, la cuve, les supports et les peignes étaient décontaminés avec une solution du peroxyde d'hydrogène à 3.5% durant 45 minutes. Un volume de 10 µg/ARN mélangé avec 7 µl de Formamide dyes (formamide contenant les colorants bleu de bromophénol et xylène cyanol dénaturant) était chauffé 7 minutes à 80°C et déposé sur un gel natif de agarose 0.8% en TBE 1X avec du bromure d'Ethidium à (0.4 µg/ml) et migré à 50-70 volts durant environ 2 h-2 h 30. Le gel était démoulé et la migration des ARNs 16S et 23S vérifié aux UV. Le transfert du gel sur membrane Hybond H⁺ était réalisé par capillarité en mode « downward » (transfert du haut vers le bas) (Fig.15). Le gel était immergé 10 minutes dans du tampon SSC 5X (0.75 M NaCl, 75 mM trisodium citrate ajusté à pH 7.0 avec HCl). Dans une coupelle en fer était placé un paquet de mouchoirs sur lequel étaient posés 3 papiers Whatman 3MM de la taille du gel, la membrane de la taille du gel, le gel, 3 papiers Whatman. Puis le tout recouvert d'un papier Whatman formant un pont dont chaque extrémité trempait dans un tampon SSC 5X/NaOH 0.01N. Tous les papiers Whatman et la membrane étaient préalablement trempés dans du tampon SSC 5X. Sur l'ensemble était placé un support et un poids. Le transfert se faisait sur la nuit à température ambiante (Fig. 15).

A Typical Downward Nucleic Acid Transfer System

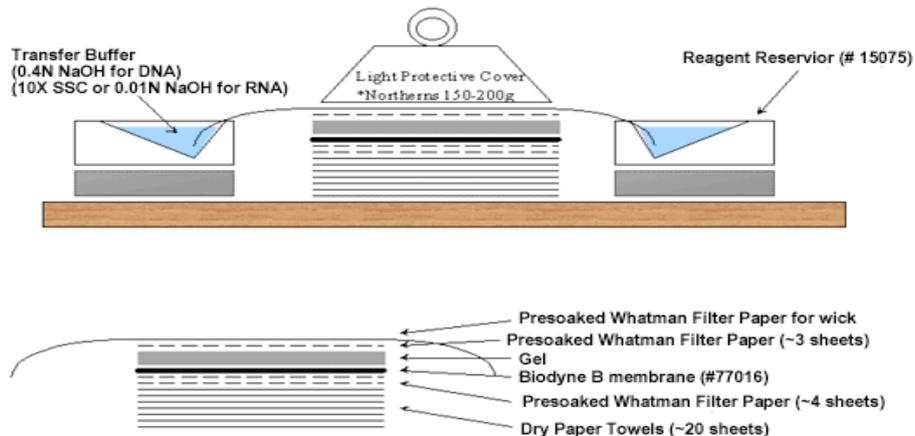


Figure 15 : Northern blot : système de transfert d'acides nucléiques du haut vers le bas.

Le lendemain, la membrane était démolée et séchée 15 minutes à température ambiante. Elle était mise sur une lampe UV (254 nm) pendant 5 minutes pour fixer l'ARN de manière covalente sur la membrane.

L'étape d'hybridation consistait d'abord à pré-hybrider la membrane dans 8-10 ml de tampon d'hybridation ULTRAHyb-oligo (Ambion, Cat N° 8663) à 42°C durant 1 heure minimum. Puis les 50 µl de sondes marqués et purifiés sur colonne G25 auparavant étaient ajoutés dans le tampon et l'hybridation se faisait sur la nuit à 42°C.

Le lendemain, le mélange d'hybridation était éliminé et la membrane rincée 1 fois rapidement dans du tampon SSC 2X/SDS 0.1% puis incubée 10 minutes à 42°C dans le même tampon et enfin rincée 5 fois dans du tampon SSC 0.2X/SDS 0.1%. La membrane était séchée 2 minutes à température ambiante et exposée dans une cassette phosphorImager sur la nuit puis révélée par l'appareil TYPHOON.

2.7 Extension d'amorces ou transcription inverse

Avant la manipulation, les plaques pour couler les gels sont nettoyées, siliconées et nettoyées avec de l'éthanol. Un grand gel (30 x 40 cm) d'acrylamide [19 :1] 6% ou 8% /TBE 1X/Urée 7M est coulé.

L'extension d'amorce commençait par l'hybridation qui consistait à mélanger 15 µg d'ARN total, 1 µl d'oligo marqué au [γ 32 P] ATP (purifié par précipitation après extraction par le phénol et le mélange de Chloroforme : alcool isoamylique (24 :1)) et 0.5 µl de tampon

AMV-RT 5/10X (du kit de la AMV reverse transcriptase Finnzymes) dans un volume de 5 µl. Le mélange était chauffé 5 minutes à 70°C, congelé en carboglace puis décongelé sur glace 15-20 minutes avant l'extension. Pour l'extension, un mélange de 0.5 µl de tampon AMV-RT 5/10X, 4 µl de dNTPs 2.5 mM, 0.5 µl de DTT 10 mM et 0.1 µl d'AMV (reverse transcriptase) était ajouté au précédent et incubé 30 minutes à 42°C. La réaction de transcription inverse était stoppée en ajoutant 10 µl de Formamide dyes. Puis le mélange était vortexé, centrifugé et chauffé 2 minutes à 90°C et refroidi dans la glace. Un volume de 5-8 µl de réaction était déposé sur le gel d'acrylamide dénaturant à 6% ou 8% selon la taille attendue des produits de l'extension et mis à migrer à 60 watts pendant 2 heures. Le gel était ensuite décollé de la plaque de verre par le biais d'un papier Whatman et un film transparent était mis par-dessus la face non couverte. Le gel était séché sous vide 1 h à 80°C, exposé dans une cassette Phosphorimager sur la nuit et révélé par l'appareil TYPHOON.

2.8 Construction des fusions *lacZ*

Nous avons utilisé deux types de plasmides. Le premier, pHM2, permettait de faire une fusion transcriptionnelle où le gène *lacZ* était exprimé à partir du promoteur du gène cloné mais avec les signaux de traduction propres au gène *lacZ* sur le plasmide (en effet le *lacZ* exprimé chez *B.subtilis* est un hybride *spoVG-lacZ*). Par contre, le second, pHM14 faisait une fusion traductionnelle permettant de regarder la synthèse de *lacZ* à partir des signaux transcriptionnels et traductionnels du gène étudié. Ces plasmides étaient non répliquables et les fusions s'intégraient facilement par double recombinaison dans la région *amyE* codant l'amylase chez *B.subtilis*.

Nous avons amplifié la région correspondante entre 250 et 500 pb en amont et le début 5' du gène d'intérêt sur le plasmide portant les gènes sauvages par le biais d'oligos décrits dans la table 3. L'oligo en amont portait un site EcoRI et celui en aval un site BamHI. Nous avons digéré l'insert et le vecteur avec les ER BamHI-EcoRI. Les mêmes fragments étaient ligués dans les deux vecteurs. Pour pHM2, le gène n'était pas directement fusionné à *lacZ* et il y avait environ 300 pb entre le site BamHI et le début du gène *lacZ* et pour pHM14, le gène était directement fusionné à *lacZ*. Nous avons transformé les ligations dans *E.coli* IBPC1118c et sélectionnées sur une boîte LB Amp50, Xgal à 30°C sur la nuit. Les colonies bleues étaient purifiées trois fois et l'insert contrôlé par miniPCR. Les plasmides étaient purifiés avec le kit « Nucleospin Plasmid ». Puis ils étaient transformés dans *B.subtilis* sauvage et dans les souches de *B.subtilis* portant les délétions dans les gènes des régulateurs,

yvoA, *ybgA* ou les deux. Les fusions entre *gamA*, *nagA*, *nagP*, *hprK*, *ybgA* et *lacZ* étaient construites.

2.9 Préparation des extraits bactériens pour le dosage de la β -galactosidase et du Western Blot

Les cultures étaient faites dans le cas de *B.subtilis* sauvage en MOPS Cas CAF NH₄ avec Glc, GlcN, GlcNAc ou KGlutamate/Succinate et pour les constructions de *B.subtilis* délétés pour les régulateurs putatifs, les cultures étaient faites uniquement en KGlutamate/succinate. Les bactéries ont été poussées à une densité optique (DO) à 650 nm (A_{650}) d'environ 0.8. Un volume de 20 ml était prélevé puis centrifugé à 8000rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le culot était lavé et resuspendu dans 2 ml de tampon Z (Na₂HCO₃ 60 mM/ NaH₂CO₃ 40 M/KCl 10 mM/MgSO₄ 1 mM) sans β -mercaptoéthanol froid. Ces 2 ml étaient répartis dans deux tubes Eppendorf et centrifugés à 12000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Chaque culot, en théorie de 10 ml à 0.8-1 DO soit une DO totale de 8-10, était gardé à -80°C.

Pour les dosages de la β -galactosidase, les extraits étaient préparés soit par la méthode des billes, soit par sonication. Par la méthode des billes, le culot était repris dans 1 ml de tampon Z sans β -mercaptoéthanol froid et 500 μ l de billes de verre froides (106 μ m, SIGMA, G4649). Les cellules étaient cassées dans un appareil agitateur pendant 10 minutes à 30 pulses/seconde et centrifugées 15 minutes, 13000 rpm à 4°C. Puis 500 μ l de surnageant étaient récupérés et mis dans un nouveau tube Eppendorf. Nous dosions de suite les protéines et l'activité β -galactosidase. Les expériences ont montré que l'activité diminuait après stockage.

Par sonication, nous pouvions préparer en même temps, les extraits pour le dosage β -galactosidase mais aussi les extraits pour le Western Blot. Le culot était repris dans 100 μ l de tampon Z sans β -mercaptoéthanol (soit 0.1 DO/ μ L) puis soniqué pendant 3 minutes avec une alternance de 15 secondes de pulse et de conservation dans la glace en utilisant le système des tubes immergés dans de l'eau glacée dans le Cup-horn.

Pour doser la β -galactosidase, un volume de 60 μ l était prélevé et 540 μ l de tampon Z sans β -mercaptoéthanol étaient ajoutés. L'ensemble était centrifugé 15 minutes, 13000 rpm à 4°C et 500 μ l de surnageant étaient récupérés et mis dans un nouveau tube Eppendorf. Nous utilisons ce lysat clarifié pour effectuer le dosage des protéines et le dosage β -galactosidase.

Pour les Western Blot, nous utilisons les 40 μl restants de sonicat concentré non-clarifié. Une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ du reste du sonicat non-clarifié (soit 10 μl de sonicat dilué dans 90 μl de tampon Z sans β -mercaptoéthanol) était quantifié en protéines par dosage Bradford. Le reste du sonicat concentré non-clarifié était congelé à -20°C . Les concentrations obtenues nous permettaient ensuite de calculer le volume de protéines à charger sur le gel soit normalement 0.4-0.5 DO (40 μg c'est-à-dire 4-5 μl du sonicat concentré).

2.10 Dosage des protéines par la méthode de Bradford et dosage de la β -galactosidase

Les dosages Bradford et β -galactosidase étaient réalisés en microplaques de 96 puits.

- Dosage Bradford :

Le volume final était de 210 μl . Une gamme étalon avec la BSA (Bovine Serum Albumin) (Pierce) (2 mg/ml) allant de 0.1 à 1 mg/ml était réalisée. Dans une plaque 96 puits sur la glace, un volume de 10 μl des extraits était déposé en duplicate ainsi que la gamme étalon en triplicat. Un témoin avec eau et un avec tampon Z sans β -mercaptoéthanol étaient aussi déposés dans la plaque. Ensuite, 200 μl de solution Bradford diluée au $1/5^{\text{ème}}$ était ajoutée par puits. La microplaque était laissée pendant 5 minutes à température ambiante et la densité optique était lue à 595 nm dans un lecteur de plaque.

- Dosage de l'activité β -galactosidase :

En microplaque, nous utilisons un volume de 210 μl pour la mesure cinétique. Après un temps fixe (soit 30 min – 2 h), nous stoppons la réaction avec du Na_2CO_3 1 M pour faire un volume de 310 μl . Nous réalisons d'abord une gamme de dilutions des extraits protéiques pour évaluer quels extraits étaient très actifs et pour lesquels la couleur jaune saturait rapidement. Les extraits étaient dilués dans du tampon Z avec du β -mercaptoéthanol (40 mM) pour arriver à un volume final de 175 μl . Nous ajoutons un témoin de tampon Z avec du β -mercaptoéthanol dans 4 puits. La microplaque était incubée à 28°C pendant 15 minutes puis nous ajoutons 35 μl d'ONPG (orthonitrophényl- β -galactoside) (4 mg/ml) par puits. Nous réalisons une cinétique avec une agitation avant chaque prise de DO à $A_{415\text{nm}}$ toutes les deux

minutes durant 30 minutes. A l'issu des 30 minutes, nous stoppions la réaction avec 100 µl de Na₂CO₃ 1 M et mesurons la DO finale.

Nous sélectionnions ensuite deux concentrations ne saturant pas et refaisons une mesure cinétique et une mesure en point final sur une durée de 1 heure.

Pour calculer l'activité spécifique, nous réalisons le calcul suivant :

$$A = \frac{DO_{415nm} \times V}{\epsilon \times C \times h \times v \times T}$$

- A = Activité spécifique en nmoles/min/mg de protéines
- C = Concentration protéique obtenue par Bradford en mg/ml
- v = Volume Extrait en ml
- V = Volume Réaction en ml : 0.21 ml si cinétique ou 0.31 ml si point final
- ϵ = Coefficient d'extinction molaire de l'ONP en l/mol/cm
 - Si cinétique : $\epsilon = 0.0025$ l/mol/cm
 - Si point final en présence de Na₂CO₃ : $\epsilon = 0.0045$ l/mol/cm
- h = hauteur de liquide dans les cuves des microplaques Greiner en cm = Trajet optique
 $h = \text{Volume (ml)} / (\pi \times R^2)$ $R = 3.5 \text{ mm} = 0.35 \text{ cm}$
 - Si cinétique : V= 0.21 ml et h = 0.6 cm
 - Si point final en présence de Na₂CO₃ : V= 0.31 ml et h = 0.89 cm

2.11 Western Blot

La quantité de protéines chargées sur le gel était normalement identique soit 40 µg, calculée avec l'activité Bradford, environ 4-5 µl. Les échantillons étaient mélangés avec deux fois leur volume du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) dyes 2X (SDS 25 %, Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), Glycérol 25%, et Bleu de Bromophénol 0.01%) et dénaturés 5 minutes à 95°C, vortexés, centrifugés. Puis ils étaient déposés sur un gel SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant) 12.5% (27.5:1) dans du tampon Tris-Glycine 1X SDS 1X. La migration était réalisée à 150 volts pendant environ 2 heures.

Le gel était démoulé et le transfert du gel sur membrane de nitrocellulose (Hybond C super) était réalisé par transfert électrophorétique: le gel et la membrane étaient mis dans une cassette pour le transfert sur la membrane.

Le support pour faire le sandwich était mis dans du tampon de transfert (gardé à 4°C) Tris 20 mM/Glycine 150 mM/Ethanol 20% et l'assemblage suivant était réalisé : sur le côté négatif, nous mettions à la suite un spontex, 2 papiers Whatmans 3MM, le gel, la membrane, 2 Whatmans et un spontex. Le support était refermé et mis dans la cuve de transfert contenant le tampon de transfert. Le transfert était réalisé à 16 volts, 12 mA sur la nuit à 4°C.

Le lendemain, la membrane était démoulée et colorée avec du rouge ponceau pour vérifier le transfert et rincée au PBS 1X/ Tween 0.1%. La membrane était saturée 1 heure à température ambiante dans du PBS 1X/ Tween 0.1%/Lait 5% et rincée 2x 5 minutes au PBS 1X/ Tween 0.1%. La membrane était ensuite incubée avec l'anticorps primaire (soit anti-GamA, soit anti-NagB Bs) dilué au 1/50000^{ème} dans du PBS 1X/ Tween 0.1%/ Lait 5% pendant 1 heure à température ambiante puis lavée 2 x 30 secondes au PBS 1X/ Tween 0.1%, 1x 15 minutes au PBS 1X/ Tween 0.1% et 3x 5 minutes au PBS 1X/ Tween 0.1%.

Puis elle était incubée avec l'anticorps secondaires (Anti- lapin couplé à la peroxydase HRP de Sigma, A6154) dilué au 1/10000^{ème} PBS 1X/ Tween 0.1%/ Lait 5% pendant 1 heure à température ambiante et lavée 2x 30 secondes au PBS 1X/ Tween 0.1%, 1x 15 minutes au PBS 1X/ Tween 0.1% et 3x 5 minutes au PBS 1X/ Tween 0.1%. La membrane était révélée en utilisant le kit ECL Advance et la chimiluminescence mesurée grâce à l'appareil Chemidoc.

2.12 Purification protéique

Les gènes *yvoA* et *ybgA* fusionnés à une étiquette de 6 histidines étaient amplifiés sur le plasmide portant les gènes sauvages par le biais d'une amorce portant l'extrémité 5' du gène avec un site NdeI au codon de démarrage d'intérêt et une amorce portant l'extrémité 3' du gène d'intérêt fusionné à l'étiquette histidines et un site BamHI. Ils étaient digérés par les ER NdeI-BamHI puis clonés chacun dans un plasmide pJES307 digéré par les mêmes ER. Les plasmides étaient ensuite transformés, amplifiés dans *E.coli* IBPC1118c et sélectionnés sur une boîte LB Amp100 à 30°C sur la nuit. Les colonies étaient purifiées trois fois et l'insert contrôlé par miniPCR. Les plasmides étaient purifiés avec le kit « Nucleospin Plasmid » et les inserts étaient séquencés. Les plasmides étaient ensuite transformés dans une souche BL21 pLys, en sélectionnant sur une boîte LB Amp50 à 30°C sur la nuit. Nous avons essayé plusieurs souches dérivées de BL21 et BL21 pLys était la souche dans laquelle les protéines étaient les plus induites.

Un test d'induction des protéines était effectué. Les bactéries portant les transformants frais sur boîte de pétri étaient gratées et reprises dans 3 ml LB Ampicilline 250 µg/ml. La

densité optique diluée au 1/100^{ème} était mesurée à A650 puis un volume de la suspension était dilué dans 200 ml pour obtenir 0.1 DO. La culture était poussée jusqu'à 0.5 DO. Un volume de 1ml était prélevé, centrifugé et le culot gardé à -20°C et correspondait aux constructions non induites. Puis 200 µl d'IPTG 0.1 M étaient ajoutés pour induire la production de protéines durant 3 h. Un volume de 1ml était prélevé, centrifugé et le culot gardé à -20°C et correspondait aux constructions induites. Les 200 ml de cultures étaient centrifugés 10 minutes à 7000 rpm à 4°C. Le culot était repris dans 10 ml de tampon Tris-HCl 20 mM pH8 et 5 ml étaient répartis dans deux tubes Falcons de 15 ml et centrifugés 10 minutes à 7000 rpm à 4°C. Le surnageant était éliminé et les culots conservés à -80°C.

Pour vérifier l'induction, les culots de 1 ml de culture avant et après induction étaient repris dans un tampon de sonication (Tris 20 mM pH8/NaCl 50 mM/ β -mercaptoethanol 1mM) pour avoir 0.1 DO. Les suspensions étaient soniquées 3x30 secondes avec 30 secondes dans la glace entre chaque sonication. Un volume de 30 µl correspondant à l'extrait total était récupéré puis le reste des sonicats était clarifié par centrifugation 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant correspondait aux protéines solubles. Un volume de 0.4 DO soit 8 µl d'extrait total ou soluble mélangé avec 8 µl de SDS Dyes 2X était chauffé à 95°C pendant 5 minutes et déposé sur un gel SDS-PAGE 12.5%. Une fois l'induction vérifiée, un culot de 100 ml (=200 DO) était resuspendu dans 2.5 ml de tampon de lyse Tris I (Tris 20 mM pH8/lysozyme 5 mg.ml⁻¹/1/2 tablette de protéase inhibitor Roche) et incubé sur la glace pendant 30 minutes. Ensuite 2.5 ml de tampon de lyse Tris II (Tris 20 mM pH8/NaCl 1 M/imidazole 2 mM/glycérol 20%/Triton 100X 1%) était ajouté au mélange et incubé sur la glace 30 minutes. Le mélange était soniqué 6x30 secondes avec 30 secondes dans la glace entre chaque sonication. Un volume de 50 µl était récupéré et correspondait à l'extrait total (4 DO). Le sonicat était clarifié par centrifugation pendant 30 minutes à 10000 rpm à 4°C. Le surnageant était transféré dans un tube falcon de 10 ml et un volume de 50 µl de surnageant était prélevé et correspondait aux protéines solubles (4 DO). Le culot était repris dans 5 ml de Tris 20 mM. Le surnageant était mélangé avec 1 ml de Ni Agarose (dont l'étiquette poly-histidine se lie par chélation avec le nickel) et incubé sous agitation à 4°C pendant 1 heure. Le gel était ensuite chargé dans une colonne. Les protéines non retenues étaient conservées (= Flowthrough). La résine était lavée avec 15 ml de tampon de lavage Tris (Tris 20 mM/NaCl 300 mM/imidazole 20 mM/glycérol 20%). Le liquide de lavage était récupéré après le passage sur la colonne (Lavage 1 et 2). La protéine était ensuite éluée de la colonne avec une plus forte concentration d'imidazole qui décrochait la protéine retenue avec le tag histidines. La colonne était donc d'abord éluée avec 10-15 ml de tampon d'éluion à 250 mM d'imidazole

(Tris 20 mM/NaCl 300 mM/imidazole 250 mM/glycérol 20%) puis avec 10 ml de tampon d'éluion à 500 mM d'imidazole (Tris 20 mM/NaCl 300 mM/imidazole 500 mM/glycérol 20%). Un volume de 1.5 ml/tube était collecté par le collecteur. Un aliquot des différents éluats était récupéré et le reste était gardé à -20°C.

Un volume de 10 µl de l'extrait total, des protéines solubles, du culot, du Flowthrough et des lavages était mélangé dans 10 µl de SDS Dyes 2X et un volume de 1.5 µl de chaque éluat dilué dans 8 µl de tampon d'éluion à 100 mM d'imidazole était mélangé dans 10 µl de SDS Dyes 2X (Fig. 16). Les mélanges étaient chauffés 5 minutes à 95°C puis déposés sur un gel SDS-PAGE 12.5% afin de vérifier les protéines purifiées et mis à migrer pendant 2 heures à 150 volts. Les éluats contenant la protéine pure étaient ensuite dialysés sur la nuit dans du tampon de dialyse (Tris 20 mM pH8/NaCl 300 mM/glycérol 5%) pour éliminer l'imidazole puis les protéines étaient concentrées sur une colonne Amicon 6-8 kDa.

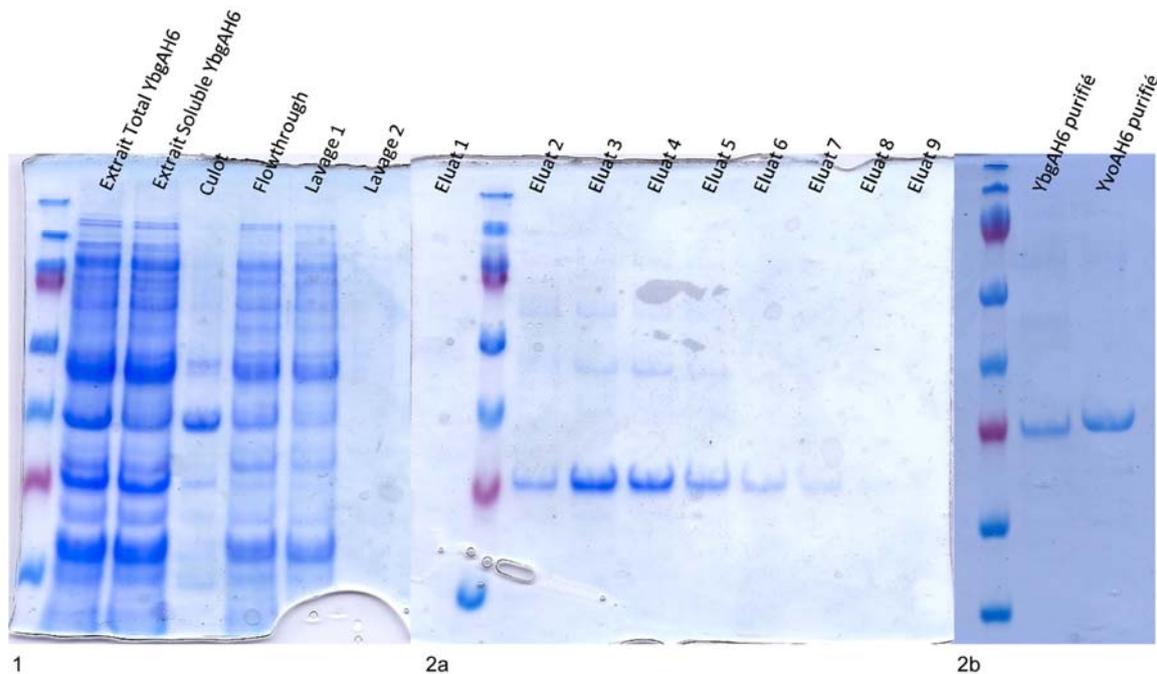


Figure 16 : Exemple des gels de purification des protéines. Les gels 1 et 2a correspondent à l'extraction et l'éluion d'YbgAH6. Le gel 2b correspond aux protéines YbgAH6 et YvoAH6 purifiées et concentrées.

2.13 Empreinte à la DNase I

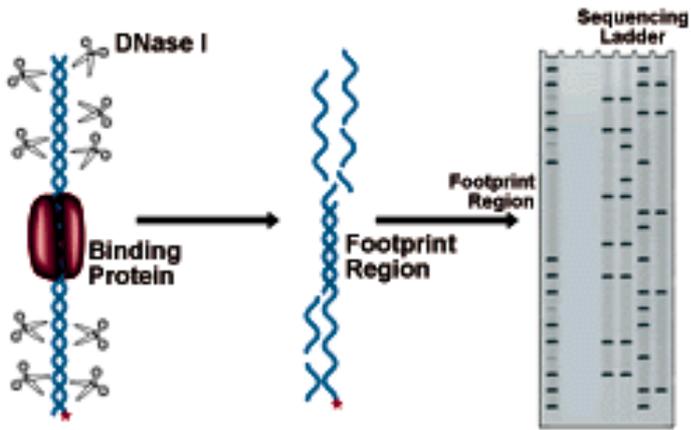
La sonde, un fragment d'ADN marqué à une extrémité, était amplifiée par PCR par l'intermédiaire des paires d'oligos ayant servi pour les fusions *lacZ* (par exemple, GamA13B-YbgA4E pour obtenir l'ADN GamA). Un oligo était marqué à une extrémité (méthode de

marquage et de purification par précipitation (décrite dans le paragraphe 2-6) et un oligo non marqué.

L'ADN et les protéines étaient dilués dans un tampon de liaison 1X (Hepes 25 mM pH8/KGlutamate 100 mM/BSA 0.5 mg/ml).

L'ADN marqué était dilué dans le tampon de liaison 1X pour avoir 20000 cpm/puits et une concentration de l'ordre de 1 nM était ensuite mélangé avec une concentration décroissante de protéine diluée dans le tampon de liaison 1X dans un volume final de 40µl. Les mélanges étaient incubés à température ambiante pendant 15 minutes. Puis l'attaque à la DNase I était réalisée de la manière suivante :

La DNase I (stock à 5 mg/ml) était diluée au 1/5000^{ème} dans du tampon de DNase I (20 mM Tris pH8/MgCl₂ 10 mM/ CaCl₂ 10 mM/KCl 125 mM/DTT 0.1 mM) et un volume de 5 µl était ajouté par tube. Les tubes étaient mis à 37°C pendant exactement 1 minute puis la réaction était stoppée par ajout de 100 µl de phénol pH8. A la fin, 200 µl de DNase I stop (Na acétate 0.5 M pH5/ADN sperme de harreng 10 µg/ml /EDTA 2.5 mM) étaient ajoutés par tube et les tubes étaient centrifugés 10 minutes à 13000 rpm à température ambiante. Les phases aqueuses (240µl) étaient transférées dans un nouveau tube auquel étaient ajoutés 600 µl d'éthanol et congelées dans de la carboglace ou à -80°C durant 45 minutes. Les mélanges étaient ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant était éliminé soigneusement. Nous vérifions qu'il n'y avait pas de radioactivité dans le surnageant et que l'ADN radioactif était bien contenu dans les culots. Les culots étaient séchés sous vide pendant 5 minutes puis ils étaient repris dans 5 µl d'eau stérile. Un volume de 6 µl de formamide dyes était ajouté aux 5 µl. Les mélanges étaient chauffés pendant 2 minutes à 90°C et 5 µl de chaque réaction étaient déposés sur un gel d'acrylamide urée 6% avec un marqueur de poids moléculaire radioactif (pBR322 MspI) ou une réaction de séquence faite avec le même oligo marqué pour préparer la sonde. La migration se faisait à 60 watts (2000 volts) pendant 1 h 30-3 h selon la taille du fragment et la position de la protection attendue. Le gel était ensuite traité comme décrit pour l'extension d'amorce (Fig.17).



www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/31

Figure 17 : Principe de l’empreinte à la DNase I.

Nom	Description	Fonction
		*: constructions <i>in silico</i>
pJRD184		Plasmide multicopie en <i>E.coli</i> , non répliquable en <i>B.subtilis</i>
pJRD/ybgA gamAP	pJRD184 + ybgA gamAP	
pJRD/gamA::Spec	pJRD184 + ybgA gamA::Spec gamP	
pJRD/gamP::Spec FRT	pJRD184 + ybgA gamA gamP::Spec FRT	
pJRD/gamP::FRT *	pJRD184 + ybgA gamA gamP::FRT	
pJRD/gamAP::Spec FRT	pJRD184 + ybgA gamAP::Spec FRT	
pJRD/gamAP::FRT *	pJRD184 + ybgA gamAP::FRT	
pJRD/ybgA::Spec FRT	pJRD184 + ybgA::Spec FRT gamAP	
pJRD/ybgA::FRT *	pJRD184 + ybgA::FRT gamAP	
pJRD/hprK nagAB yvoA	pJRD184 + hprK nagAB yvoA	
pJRD/nagB::Spec	pJRD184 + hprK nagA nagB::Spec yvoA	
pJRD/nagA::Spec FRT	pJRD184 + hprK nagA::Spec FRT nagB yvoA	
pJRD/nagA::FRT *	pJRD184 + hprK nagA::FRT nagB yvoA	
pJRD/nagAB::Spec FRT	pJRD184 + hprK nagAB::Spec FRT yvoA	
pJRD/nagAB::FRT *	pJRD184 + hprK nagAB::FRT yvoA	
pJRD/yvoA::Spec FRT	pJRD184 + hprK nagAB yvoA::Spec FRT	
pJRD/yvoA::FRT *	pJRD184 + hprK nagAB yvoA::FRT	
pXE1		Plasmide simple copie en <i>E.coli</i> , non répliquable en <i>B.subtilis</i>
pXE/nagP	pXE1 BF + nagP	
pXE/nagP::Spec FRT	pXE1 BF + nagP::Spec FRT	
pXE/nagP::FRT *	pXE1 BF + nagP::FRT	
pXE/ptsG	pXE1 + ptsG	
pXE/ptsG::Spec FRT	pXE1 + glc ptsH ptsG::Spec FRT ptsI	
pXE/ptsG::FRT *	pXE1 + glc ptsH ptsG::FRT ptsI	
pBR322		Plasmide multicopie en <i>E.coli</i> , non répliquable en <i>B.subtilis</i>
pBR/Kan (pKD13)	pBR322 + Kan (pKD13)	
pBR/FRT kan::PS4-1	pBR322 + FRT Kan::PS4-1	
pBR/FRT Kan::Spec PS4-1	pBR322 + FRT Kan::Spec PS4-1	
pYH224		Plasmide multicopie en <i>E.coli</i> , répliquable thermosensible en <i>B.subtilis</i> .
pYH/pSpac LacI	pYH224 + pSpac LacI	
pYH/pSpac LacI flp	pYH224 + pSpac LacI flp	
pYH/pXyl XylR	pYH224 + pXyl XylR	
pYH/pXyl XylR flp	pYH224 + pXyl XylR flp	
pHM2		Plasmide multicopie en <i>E.coli</i> , intégrable au locus amy dans <i>B.subtilis</i> (fusion transcriptionnelle avec lacZ)
pHM2/gamA lacZ	pHM2 + gamA lacZ	
pHM2/ybgA lacZ	pHM2 + ybgA lacZ	
pHM2/hprK lacZ	pHM2 + hprK lacZ	
pHM2/nagA lacZ	pHM2 + nagA lacZ	
pHM2/yvoA lacZ	pHM2 + yvoA lacZ	
pHM2/nagP lacZ	pHM2 + nagP lacZ	
pHM14		Plasmide multicopie en <i>E.coli</i> , intégrable au locus amy dans <i>B.subtilis</i> (fusion traductionnelle avec lacZ)
pHM14/gamA lacZ	pHM14 + gamA lacZ	
pHM14/ybgA lacZ	pHM14 + ybgA lacZ	
pHM14/hprK lacZ	pHM14 + hprK lacZ	
pHM14/nagA lacZ	pHM14 + nagA lacZ	
pHM14/yvoA lacZ	pHM14 + yvoA lacZ	
pHM14/nagP lacZ	pHM14 + nagP lacZ	
pJES307		Plasmide multicopie en <i>E.coli</i> , non répliquable en <i>B.subtilis</i>
pJES/ybgA 6H	pJES307 + ybgA 6 Histidines	
pJES/yvoA 6H	pJES307 + yvoA 6 Histidines	
pCP20		Portant le gène flp
pDG1727		Portant la cassette spectinomycine
pDG148		Portant le promoteur pSpac lacI
pHMX3		Portant le promoteur pXyl XylR

Table 2 : Récapitulatif de toutes les constructions plasmidiques réalisées. Nous n'avons pas curé les cassettes spec sur les plasmides, ce sont des constructions *in silico* (*) pour faciliter l'analyse des délétions sur le chromosome. Ces constructions *in silico* ont été faites avec le logiciel Clone Manager.

Clonage des régions du chromosome de Bs		Gène/Région	Matrice
Gam4 BamHI	GTCAGGATCCGGACGGAACAGCAGCAC	<i>ybgA gamAP</i>	ADN chromosomique <i>B. subtilis</i>
Gam5 XbaI	CTAGTCTAGAGGTCAGCCGACACCTGG		
BsNag1 BamHI	CTGAGGATCCTTCAGATCCCTTGACGCG	<i>hprK nagAB yvoA</i>	ADN chromosomique <i>B. subtilis</i>
BsNag2 XbaI	CTAGTCTAGACATCCGCTGGATGAATCAGG		
BsNag4	CGAACCTTTGCCACGATATG	<i>nagAB</i>	pJRD/ <i>hprK nagAB yvoA</i>
BsNag8	AGAAACATATCGTCCGGCAC		
BsNag5	GATTATCGCATCCATGGGGC	<i>nagB</i>	pJRD/ <i>hprK nagAB yvoA</i>
5'NagP NcoI	CTGACCATGGAAGCGCTTCTTCCTTCAC	<i>nagP</i>	ADN chromosomique <i>B. subtilis</i>
3'NagP BamHI	GTCAGGATCCAGTCAGCCATTACTTGG		
5' FLP AflII	GATCCTTAAGCTAACACCGTGGTGTGAC	<i>flp</i> (pYH224+pSpac)	pCP20
3'FLP SbfI	CAGTCTCGCAGGACAGTCGCACCTATATCTGC		
5'FLP Mhl	GATCACGGCTCTAACACCGTGGTGTGAC	<i>flp</i> (pYH224+pXyl)	pCP20
3'FLP BamHI	CTGAGGATCCAGTCGCACCTATATCTGC		
ptsG2 XbaI	GACTTCTAGACATTGCGTGTGACAGCATTATCGC	<i>ptsG</i>	ADN chromosomique <i>B. subtilis</i>
ptsG 4 BamHI	AAGCGGATCCAGCGTTCATGAATCAGTGTG		
Remplacement des gènes <i>gam</i> et <i>nag</i> par les cassettes de résistance à la spectinomycine dans les plasmides.			
5'GamA Spec	GGTCATAACAAATATGGTGTCTTCTATCTTTGAGGGGGTGCACATGAATACATACGAACAAATTAATAAAGTG	<i>gamA::spec</i>	pDG1727
3'GamA Spec	CAGAAATTGAAATGGCTTTTAAACATGACAGTCTCCTTTATTGGTATAAATTTTTTAATCTGTATTAAATAGTTTA		
5'BsNagB Spec	ATTTGCCCGGAAACATTTGATTTATCCAAAGGAGGTCAGCAGATGAATACATACGAACAAATTAATAAAGTG	<i>nagB::spec</i>	pDG1727
3'BsNagB Spec	CGGAATAGCGGATTTTATTGATATTCATAAAGTCAGATGTCCTTTTATAATTTTTTAATCTGTATTAAATAGTTTA		
Remplacement des gènes <i>gam</i> et <i>nag</i> de <i>B. subtilis</i> par les gènes portant les cassettes spectinomycine			
5'NagA PS4	GTCTGAAAAAGAGTAAAAAAGGTTTCAAATTCAGAAAGGGGGATCATATGTTCCGGGGATCCGTCGACC	<i>nagA::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3'NagA PS1	TTCCATATCTTCATATCTTGGTCAGCCTCCTTGGATATAAATGCAATGTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>nagAB::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3'NagB PS1	ATTGATATTCTAAGTCAGCATGTTCTTTCAAGGCTTAAATGACCGCGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		
5'yvoA PS4	GATTGATCGTGAAGCCGCTCATTAAGACCTTGAAGGAACATGCTGACTTATGATCCGGGGATCCGTCGACC	<i>yvoA::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3'yvoA PS1	GAAAGACGATCCATATAGTGGCAAAATGTATAACGGTCCGCTTGTATACGGAATGTGAGGCTGGAGCTGCTTC		
5'NagP PS4	CACTAGATATCTTATGGTATATTTGAAAAAAGGGTATGAGGGGGATGGGTATGATCCGGGGATCCGTCGACC	<i>nagP::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3'NagP PS1	GCGGAGAGTTCCTCTCCGCTTTTTATTGACAGCAGCCCTCAATTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		
5'GamA PS4	GGTCATAACAAATATGGTGTCTTCTATCTTTGAGGGGGTGCACATGTTCCGGGGATCCGTCGACC	<i>gamAP::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
5'GamP PS4	GCTCAAAAATTAAGAGTGCATCTTCTATAACACAATAAAGGAGAGTGTATGATCCGGGGATCCGTCGACC	<i>gamP::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3'GamP PS1	CGAAAAAGTCCCGCAGCAGGGGGGACTTTTTACTTCAATTTGAATGTGCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		
5'ybgA PS4	GGTATTATGGTCTCAATGAAAAAAGACGGATTGCATACAGAAAGGGGAAATGAAATGATCCGGGGATCCGTCGACC	<i>ybgA::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3'ybgA PS1	GATATGACTGTTCTACGGTGAATTCGTTCCGCTCCTCCGCTGTAATAATTTGCGCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		
5' ptsG PS4	GATTTTATGCTGAAGGTGACACTAGTAAAAAGAGGAGTCAATTCATGATCCGGGGATCCGTCGACC	<i>ptsG::spec FRT</i>	pBR/ <i>Kan : Spec PS4-1</i>
3' ptsG PS1	CATCTGACAAAGCAGCGCTACTAACACCCCTATTTTTCAATCTTCAAAATATGTTAGGCTGGAGCTGCTTC		
Northern Blot			
Bs NagA 14 NB	CGGCAAAATGGTGAAGATCACCTCGCAATCACTGCTGAC		
Bs NagP 15 NB	CATCCACCAAGCGGTATCCTTCACAGTCAGTCG		
GamA 11 NB	GCTGGTACATCTGCTGACAGGACCTTCAGCCATC		
GamP 12 NB	CGCCTTGTGACGGCTTGTCCGCTTGTGACATGTG		
ptsG 5 NB	CAGTCACAGCAGACGAGTGATACAAGCATCAAGG		
ybgA 1 NB	CGCAGGCGCTCCGACATTTGGTAAATGATCCGCTG		
yvoA 1 NB	TTCTCCGTTGGTGGACCGCTTGGCTCAAGCTC		
Réverse transcription			
BsNagA 13 RT	GTCATTGATCCGACATAGCCG		
BsNagP 12 RT	GCGCAAGGATAATCCAACCGC		
NagP 17 RT	TGCAGGATCCGATGGCAATACCGATCGC		
hprK 1 RT	GCACAGAGATCCATTCGCTGC		
GamA 10 RT	ATACAAGCCGACCGGTGTG		
ybgA 2 RT	CATTCCGCTGATATTGCCCG		
Fusion lacZ			
GamA 13 BamHI	AGCTGGATCCTTACAGAGTCTTCGTAGTGC	<i>gamA-lacZ</i>	pJRD/ <i>ybgA gamAP</i>
ybgA 4 EcoRI	AGCTGAATTCGGCAGCTGATCATTCCGCTG		
GamA 14 EcoRI	GGCTGAATCTTACAGAGTCTTCGTAGTGC	<i>ybgA-lacZ</i>	pJRD/ <i>ybgA gamAP</i>
ybgA 3 BamHI	AGCTGGATCCCGCAGCTGATCATTCCGCTG		
BsNagA 18 BamHI	ATATGGATCCTTGGCCGTTCTGTTG	<i>nagA-lacZ</i>	pJRD/ <i>hprK nagAB yvoA</i>
hprK 3 EcoRI	CAGAGAATTCACCGCTCCCTCGGGTAATATG		
BsNagA 19 EcoRI	ATATGAATCTTGGCCGTTCTGTTG	<i>hprK-lacZ</i>	pJRD/ <i>hprK nagAB yvoA</i>
hprK 2 BamHI	GAGAAGATCCAGCGCTCCCTCGGGTAATATG		
NagP 20 BamHI	AGCGGATCCGCAATCGGAGCATAAATGAC	<i>nagP-lacZ</i>	pXE/ <i>nagP</i>
NagP 21 EcoRI	CCTTCGAATCTTGATCGTTGTTACAATC		
Marquage des protéines avec un tag histidines			
ybgA NdeI	GCAGCATATGACAGCTTTATATTCTGTTATCAAG	<i>ybgAH6</i>	pJRD/ <i>ybgA gamAP</i>
ybgAH6 BamHI	CGCTGGATCCTTAATGGTGTGGTGTGATGATGATGACTGTTCTACGGTGAATTCG		
yvoA NdeI	GCAGCATATGAATATCAATAAACAATCGCCTATTC	<i>yvoAH6</i>	pJRD/ <i>hprK nagAB yvoA</i>
yvoAH6 BamHI	CGCTGGATCCTTAATGGTGTGGTGTGATGTTGAAAGCAGTCCATATAGTGGACAAATG		
Oligos génériques			
RBP22	CCGAAAAAGTCCACCTGACGTC		
HP905 (lacZ)	GATTAAAGTTGGTAAACGCCAGGGT		
XE1	GGTTGGCTCCAATATTGTTATATTC		
PS4	ATTCGGGGATCCGTCGACC		
PS1	ATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		

Table 3 : Récapitulatif de tous les oligos utilisés. Les sites de restrictions ajoutés aux extrémités 5' pour faciliter les clonages sont en rouge.

III. Résultats

3.1 Etude des fonctions des gènes *nag* et *gam* chez *B.subtilis*

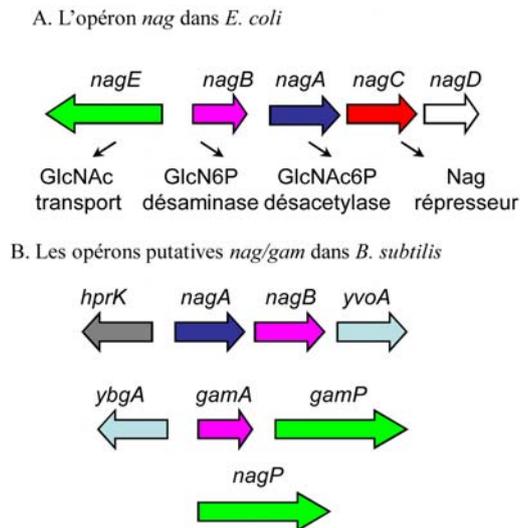


Figure 8: Les gènes codant les protéines homologues sont représentés avec des ombrages de même couleur. Rose, GlcN6P désaminase; bleu foncé, GlcNAc6P désacetylase; vert, transporteur PTS; bleu clair, régulateurs type GntR et rouge, répresseur.

Comme décrit dans l'introduction et dans la figure 8, les gènes potentiellement impliqués dans l'utilisation des sucres aminés se trouvent dans trois régions du chromosome de *B.subtilis*. De plus, il y a deux copies des homologues du gène *nagB*, codant la désaminase, et de *nagE*, codant le transporteur PTS de la GlcNAc, chez *E.coli*. Afin d'étudier et de mieux comprendre les fonctions de ces gènes groupés dans les opérons *gam* et *nag* chez *B.subtilis*, nous avons d'abord délété chaque gène individuellement en le remplaçant avec un gène de résistance à la spectinomycine. Nous avons construit un système qui permet par la suite de délèter les cassettes spectinomycine pour que nous puissions créer des doubles et des triples mutants afin d'étudier d'abord l'effet de leur absence sur la croissance en présence des sucres GlcN ou GlcNAc. Dans un premier temps nous avons vérifié le résultat de Reizer (Reizer et al., 1999) que *B.subtilis* pousse plus lentement sur GlcNAc (temps de doublement (TD) autour de 100 min) que sur GlcN (TD 55 min) qui est l'inverse de la situation chez *E.coli* (Alvarez-Anorve et al., 2009, Alvarez-Anorve et al., 2005)

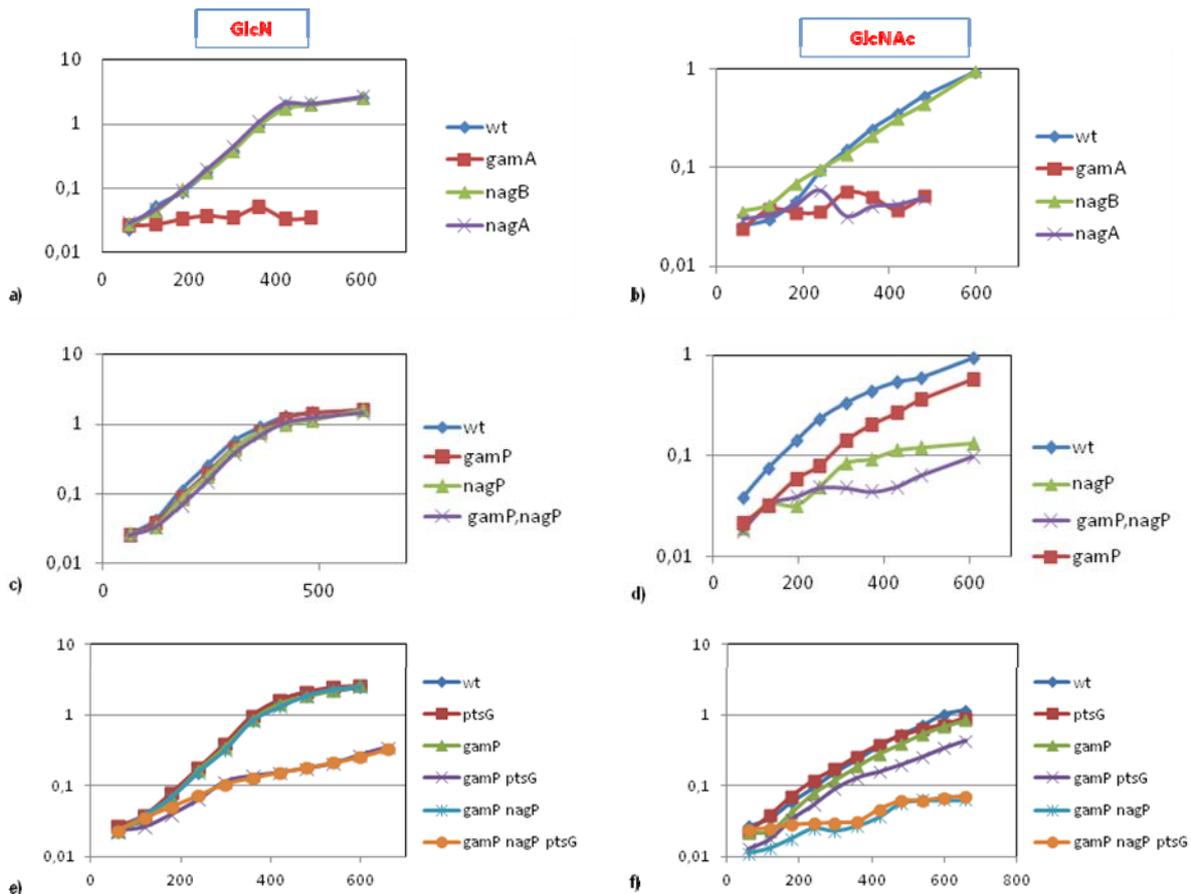


Figure 18 : Croissance des mutants sur GlcN et GlcNAc. a) Croissance des mutants des gènes codant les enzymes désacétylase (*nagA*) et désaminases (*nagB*, *gamA*) sur GlcN. b) Croissance des mutants des gènes codant les enzymes désacétylase (*nagA*) et déaminases (*nagB*, *gamA*) sur GlcNAc. c) Croissance des mutants des gènes codant les transporteurs NagP et GamP sur GlcN. d) Croissance des mutants des gènes codant les transporteurs NagP et GamP sur GlcNAc. e) Croissance des mutants des gènes codant les transporteurs NagP, GamP et PtsG sur GlcN. f) Croissance des mutants des gènes codant les transporteurs NagP, GamP et PtsG sur GlcNAc. Axe des ordonnées: densité optique ; Axe des abscisses : temps en minutes.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à étudier l'effet de l'absence des enzymes NagA (la désacétylase) et NagB, GamA (les déaminases) sur la croissance en présence des sucres GlcN et GlcNAc. Nous avons donc mis en culture des mutants délétés pour ces gènes et regardé la croissance sur GlcN et GlcNAc. Nous avons pu observer que les mutants, *nagA* et *nagB*, n'ont aucun effet sur la croissance sur GlcN tandis que l'absence de *gamA* inhibe fortement cette croissance (Fig. 18a). Par contre, *gamA* et *nagA* inhibent la croissance sur GlcNAc tandis que *nagB* n'a aucun effet (Fig. 18b). Donc *nagA* inhibe la croissance sur GlcNAc ce qui est attendu car il est le seul gène codant une GlcNAc6P désacétylase, *gamA* est nécessaire pour la croissance sur GlcN et GlcNAc et *nagB* n'est pas requis pour la croissance dans ces conditions.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux transporteurs GamP et NagP. Nous avons donc regardé l'effet des mutants délétés pour chacun de ces gènes ou les deux sur l'utilisation de ces sucres. Nous avons pu observer que les simples mutants, *gamP* et *nagP*, n'ont aucun effet sur la croissance sur GlcN (Fig. 18c). Tandis que *gamP* inhibe très légèrement la croissance sur GlcNAc, *nagP* inhibe fortement la croissance sur GlcNAc et le double mutant *gamPnagP* inhibe encore plus la croissance sur ce sucre (Fig. 18d).

Au vu de ces résultats, puisque ni GamP, ni NagP n'inhibaient la croissance sur GlcN, nous avons essayé de chercher un autre transporteur de ce sucre et nous nous sommes donc intéressés au transporteur PtsG qui est homologue à GamP. Nous avons regardé l'effet du mutant *ptsG* sur la croissance sur GlcN et GlcNAc. D'abord, nous avons testé la mutation d'insertion *ptsG::cm* procurée par I. Martin-Verstraete qui est une délétion du domaine IIA de *ptsG* (Stulke et al., 1997). La mutation a provoqué un fort ralentissement de croissance sur GlcN en présence de la mutation *gamP*. Donc nous avons fait la délétion complète du gène en utilisant la méthode de la cassette spectinomycine excisable. Les deux mutations donnaient des résultats similaires. Nous avons donc observé que *ptsG* seul n'a pas d'effet sur GlcN par contre le double mutant *ptsG gamP* et le triple mutant *ptsG gamP nagP* inhibaient fortement la croissance sur GlcN (Fig. 18e). *nagP* n'a aucun effet sur GlcN. Le mutant *ptsG* n'a aucun effet sur GlcNAc (Fig. 18f). Les temps de doublement (TD) moyens de toutes ces souches sont rapportés dans la Fig. 19.

Donc seuls *gamP*⁺ et *ptsG*⁺ sont responsables de la croissance sur GlcN et chacun peut supporter la croissance à vitesse maximale. Par contre, *nagP*⁺ et *gamP*⁺ sont nécessaires pour la croissance maximale sur GlcNAc et seule la double mutation *gamP nagP* inhibe la croissance sur GlcNAc. Même dans les triples mutants, il y a toujours une croissance lente (TD autour de 4 h) sur GlcN et GlcNAc impliquant l'existence d'autres transporteurs capables d'une absorption lente des sucres aminés. Nous avons d'ailleurs testé une mutation dans le gène *ptsI::kan* procurée par J. Deutscher qui a quasiment inhibé toute la croissance sur GlcN et GlcNAc (temps de doublement autour de 10 h) indiquant que le transport résiduel dans les souches *ptsG*, *gamP*, *nagP* est de type PTS.

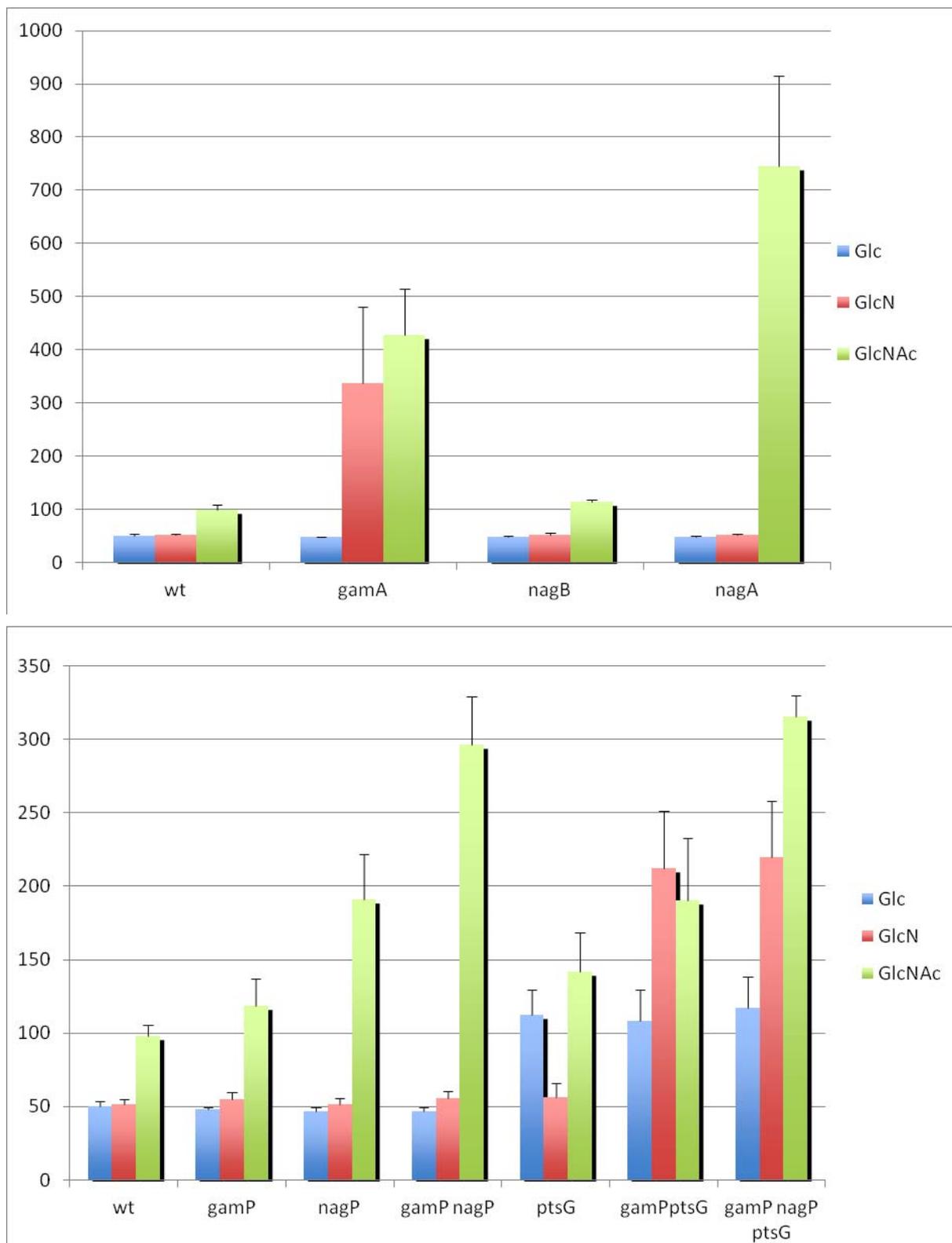


Figure 19 : Histogramme des temps de doublement (TD) en minutes des mutants en croissance sur GlcN et GlcNAc. Effet des mutations dans les enzymes (a) et dans les transporteurs (b) sur la croissance sur GlcN/GlcNAc. Moyenne des résultats de deux à quatre cultures. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types.

3.2 Etudes de l'expression des gènes *nag* et *gam*

3.2.1 Identification des transcrits

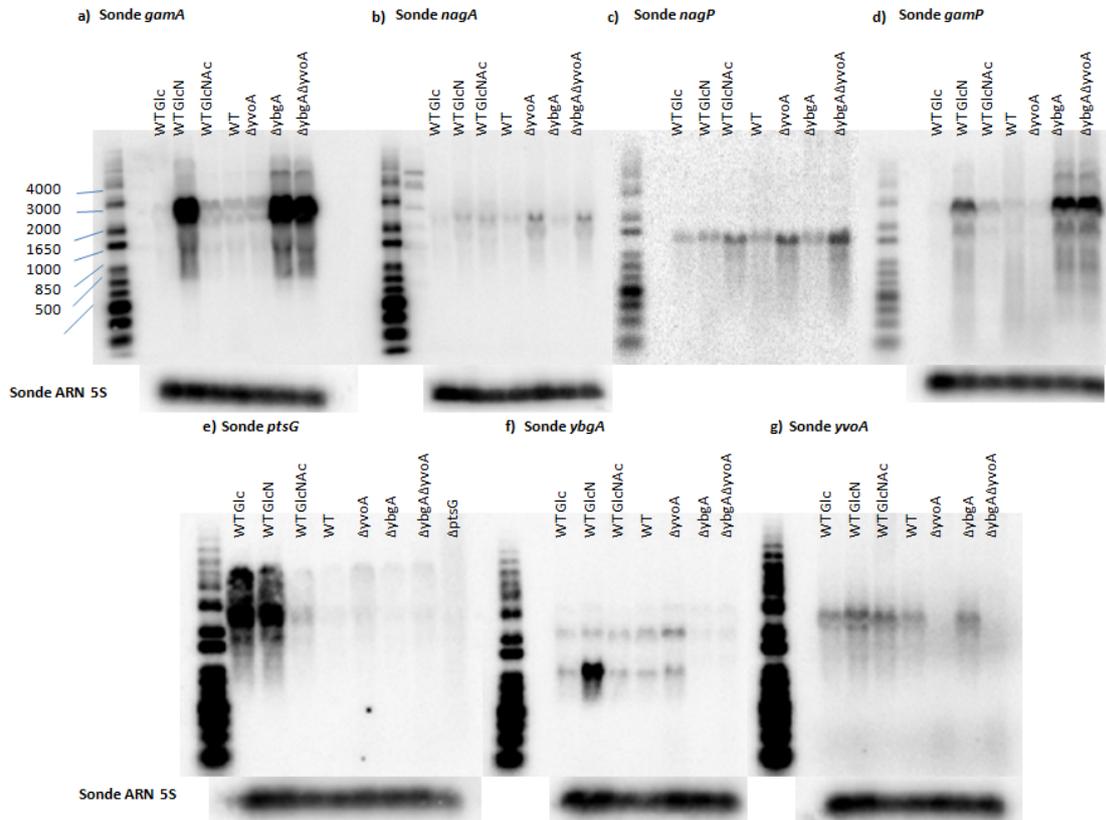


Figure 20 : Northern Blot pour déterminer la taille des transcrits. a) Transcrit *gamA*. b) Transcrit *nagA*. c) Transcrit *nagP*. d) Transcrit *gamP*, e) Transcrit *ptsG*, f) Transcrit *ybgA* et g) Transcrit *yvoA*. Les ARNs totaux isolés des souches *B. subtilis* portant la fusion *gamA-lacZ* ont été séparés sur gel d'agarose. Piste 1 : marqueur 1kb plus ladder ; Piste2 : marqueur de poids moléculaire non radioactif 1 Kb ladder, Piste 3-6 : ARN issue de *B. subtilis* sauvage (WT) (*yvoA*+ *ybgA*+); Piste 3 : culture en Glc ; Piste 4 : culture en GlcN ; Piste 5 : culture en GlcNAc, Piste 6 : culture en KGlutamate/Succinate, Piste 7 : ARN issu de *B.subtilis* muté pour *yvoA* en culture en KGlutamate/Succinate, Piste 8 : ARN issu de *B.subtilis* muté pour *ybgA* en culture en KGlutamate/Succinate, Piste 9 : ARN issu de *B.subtilis* muté pour *yvoA/ybgA* en culture en KGlutamate/Succinate. Sonde *ptsG* : contrôle négatif : Piste 9 : ARN issu de *B.subtilis* muté pour *ptsG* en culture en KGlutamate/Succinate Le marqueur non radioactif doit réagir non spécifiquement avec quelques sondes marqués, ce qui explique les bandes dans les pistes 2 des figures a et b. La sonde ARN 5S est un témoin positif.

Une fois que les fonctions de ces gènes dans l'utilisation des sucres aminés étaient étudiées, nous nous sommes intéressés à la régulation de leur expression. Nous avons d'abord regardé la taille des transcrits provenant des différents gènes. Pour cela, nous avons fait des Northern Blots en utilisant comme sondes des oligonucléotides de 35-40 pb spécifiques au

premier gène des trois opérons (*gamA*, *nagA* et *nagP* et aussi *ptsG* de l'opéron *ptsGHI*). L'emplacement des gènes *ybgA* et *yvoA*, membre de la famille des facteurs de transcription GntR, au sein des opérons *gamAP* et *nagAB* fait penser qu'ils pourraient être impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes *gam* et *nag*. Bertram *et al.* ont montré qu'YvoA pourrait être le represser de *nagA* et de *nagP* et ils ont proposé des sites de fixation en amont de leurs gènes (Bertram *et al.*, 2011). Nous avons donc préparé les ARNs totaux des bactéries sauvages et mutés dans *ybgA*, *yvoA*, poussées dans différentes conditions soit pour la souche sauvage en présence de Glc, GlcN, GlcNAc, KGlutamate/Succinate et pour les mutants en présence de KGlutamate/Succinate.

Les expériences de Northern Blot en Fig. 20a montraient que la sonde *gamA* détecte un transcrit d'environ 2.5-3.0 kb (kilobases). Ce transcrit est d'une taille comprenant les gènes *gamA* et *gamP* 2.7 kb. On remarque la forte surexpression du gène *gamA* en présence de GlcN (facteur de 40) et en absence du régulateur putatif associé, YbgA (facteur de 60). Le gène de ce régulateur est transcrit en sens opposé des gènes *gamAP*. Nous avons noté que dans les échantillons avec des faibles niveaux d'expression de *gamA*, nous observons 2 bandes, ce qui est un artefact lié à la quantité d'ARN chargé sur le gel (10 µg) et le chevauchement du transcrit avec l'ARNr 23S. Un transcrit de la même taille est détecté dans les mêmes conditions en utilisant *gamP* comme sonde (Fig. 20d).

La sonde *nagA* détecte un transcrit d'environ 2.5 kb. Ce transcrit pourrait comprendre les gènes, *nagA*, *nagB* et *yvoA* (Fig.20b). Un faible transcrit d'environ 2 kb pourrait correspondre aux deux premiers gènes, *nagA* et *nagB*. Le gène *nagA* est à peine détectable dans les ARNs préparés à partir des cultures en glucose. Il est plus exprimé (facteur de 2-3) en présence des sucres aminés et en absence du régulateur putatif YvoA (facteur de 5).

Nous avons ensuite regardé les transporteurs NagP et PtsG. La sonde *nagP* a détecté un transcrit d'environ 1.4 kb qui correspond bien à la taille du gène *nagP*. Le gène *nagP* est surexprimé en présence de GlcNAc (facteur de 4) et en absence du régulateur putatif, YvoA (facteur de 5-7) (Fig.20c). La sonde *ptsG* révélait deux transcrits, un supérieur à 4 kb qui doit correspondre au transcrit de l'opéron *ptsGHI* et un autre d'environ 2.1 kb qui pourrait correspondre au gène *ptsG*. Le gène *ptsG* semble être surexprimé en présence de Glc (facteur de 25) et de GlcN (facteur de 20) et légèrement surexprimé en GlcNAc (facteur de 3) (Fig.20e). L'augmentation de l'expression de *ptsG* par la croissance sur GlcN est un résultat nouveau qui doit être confirmé par d'autres techniques.

Nous avons regardé aussi les transcrits des régulateurs YbgA et YvoA. La sonde *ybgA* détecte un transcrit d'environ 1kb qui correspond à la taille du gène *ybgA*. Le gène *ybgA* est surexprimé en GlcN (facteur de 7) et est exprimé constitutivement dans les autres sucres et en absence d'*yvoA* (Fig.20f). Il n'est pas détectable dans les mutants *ybgA* ce qui est attendu. Une deuxième bande d'environ 2.5 kb pourrait correspondre à un ARNm plus long incluant les gènes *ybgB* et *ilvE* en aval du gène d'*ybgA*.

La sonde *yvoA* détecte un transcrit d'environ 2.5 kb. Comme dit précédemment pour la sonde *nagA*, ce transcrit pourrait comprendre les gènes, *nagA*, *nagB* et *yvoA*. Le niveau du messager d'*yvoA* ne semble pas être significativement différent dans les conditions étudiées (maximum facteur de 1.5) (Fig.20g). Il n'est pas détectable dans les mutants *yvoA* ce qui est attendu.

3.2.2 Site de démarrage des transcrits *gamA*, *nagA* et *nagP*

Nous avons ensuite voulu identifier la région promotrice de ces gènes. Pour cela, nous avons utilisé la technique de l'extension d'amorce. Nous avons utilisé des amorces internes proches de l'extrémité 5' (<100 pb) de la phase codante des gènes *gamA*, *nagA*, et *nagP*. Nous avons également étudié *hprK* qui est exprimé dans le sens opposé de *nagAB* et *ybgA* exprimé dans le sens opposé de *gamAP* (Fig8). Pour localiser précisément les sites de démarrage, nous avons fait un séquençage de l'ADN en utilisant les mêmes sondes.

Les expériences d'extension d'amorce en Fig. 21a montraient que le site +1 du gène *gamA*, se trouve à -63 bases du codon d'initiation AUG. Nous avons pu identifier un promoteur de type σ^A (TTGACA-18 pb-TAAATT) dont l'espacement entre la boîte -35 et -10 est inhabituel pour *B.subtilis* (18 pb au lieu de 17 pb). Le transcrit seulement détecté en présence de GlcN correspond bien avec la forte surproduction détecté par le Northern Blot. Pour le transcrit *nagA*, le site +1 se trouve à -28 bases du codon d'initiation AUG et le gène semble être exprimé dans les trois sucres qui est en accord avec les Northern Blots (Fig. 21b). Nous proposons comme promoteur pour *nagA*, les séquences -35 et -10, TAGATC-17 pb-TAAAAT. Pour le transcrit *hprK*, le site +1 se trouve à -45 bases du codon d'initiation AUG et nous pouvons proposer pour les séquences -35 et -10, TTTAGG-17 pb-TAAAAT (Fig. 21c). Les sites de démarrage de la transcription de *hprK* et *nagA* sont séparés par 111 pb, ce qui peut suggérer une co-régulation potentielle. Pour le transcrit *nagP*, le site +1 se trouve à -35 bases du codon d'initiation AUG et nous proposons comme promoteur pour les séquences

-35 et -10, TTGGTA-17 pb-TATATG (Fig. 21d). Le gène est surexprimé en présence de GlcNAc comme vu dans les Northern Blots.

Nous avons ensuite déterminé la région promotrice du gène *ybgA* qui est transcrit en sens inverse du reste de l'opéron *gamAP* (Fig.21e). Les expériences d'extension d'amorce en Fig. 21e montraient que le site +1 du gène *ybgA*, se trouve à -41 bases du codon d'initiation AUG et nous pouvons proposer pour les séquences -35 et -10, TTTCAT-17 pb-TATTAT. Nous n'avons pas cherché un promoteur spécifique pour *yvoA* car il fait parti d'un grand transcrit à la suite des gènes *nagAB*. Et le Northern blot n'a donné aucune indication d'un petit transcrit spécifique pour *yvoA* (les sites de démarrage sont indiqués sur la Fig.26 qui sera présentée plus bas dans la discussion).

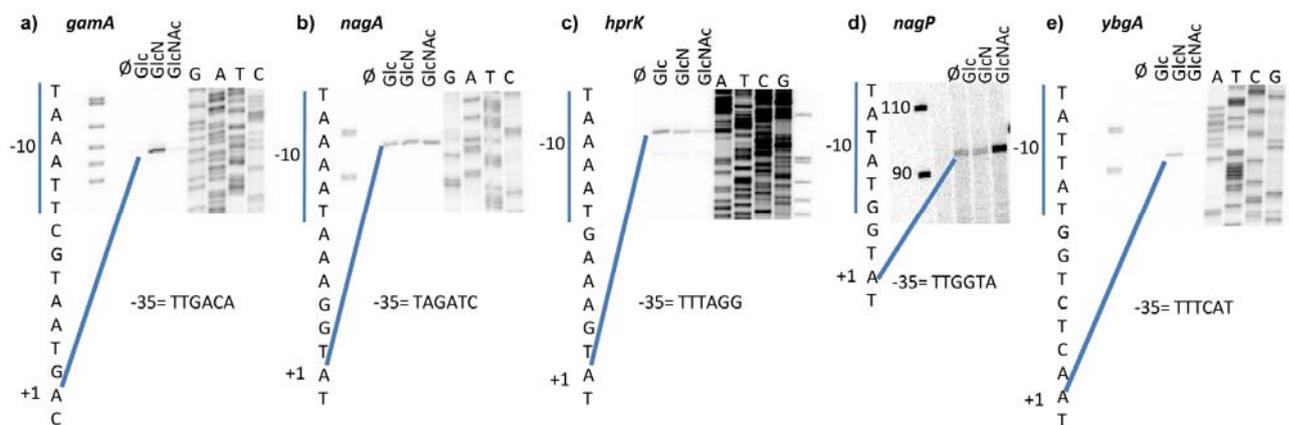


Figure 21 : Identification des sites de démarrage des transcrits *gam* et *nag*. ADNc obtenus par extension d'amorce et détecté par sonde a) GamA10RT. b) NagA13RT. c) HprK1RT. d) NagP17RT. e) YbgA2RT. Les ADNc obtenus ont été analysés sur gel d'acrylamide dénaturant. Piste 1 : marqueur pBR322 MspI ; Piste 2 : vide, Piste 3 : ARN issu de *B.subtilis* sauvage en culture en Glc ; Piste 4 : ARN issu de *B.subtilis* sauvage en culture en GlcN ; Piste 5 : ARN issu de *B.subtilis* sauvage en culture en GlcNAc. Les pistes GATC sont les séquences des mêmes régions faites avec l'oligo ayant servi d'amorce pour la transcription inverse et avec le kit Thermo Sequenase Cycle Sequencing (USB).

3.2.3 Quantification de l'expression des gènes par dosage des fusions avec *lacZ*

Pour permettre de comparer quantitativement l'expression des gènes *nag* et *gam* dans les différentes conditions (Glc, GlcN et GlcNAc), nous avons construit des fusions avec le gène rapporteur *lacZ*. Deux types de fusions ont été construits, soit une fusion traductionnelle (fusion de protéines) soit transcriptionnelle (fusion d'opérons) sur des plasmides (pHM14 et pHM2) qui sont ensuite insérés au niveau du locus *amyE* dans le chromosome de *B.subtilis*

sauvage. Les deux types de fusion donnaient des résultats similaires concernant leurs facteurs d'induction pendant la croissance sur les sucres aminés, suggérant que toute la régulation est transcriptionnelle. Nous reportons ici ceux obtenus avec la fusion d'opéron.

Une partie de l'extrémité 5' des gènes étudiés était insérée avant le gène *lacZ* dans le plasmide pHM2 pour produire des fusions d'opéron, *gamA-lacZ*, *nagA-lacZ*, *nagP-lacZ*, *hprK-lacZ* et *ybgA-lacZ*. Nous avons d'abord étudiés l'expression de ces gènes en présence des sucres Glc, GlcN et GlcNAc.

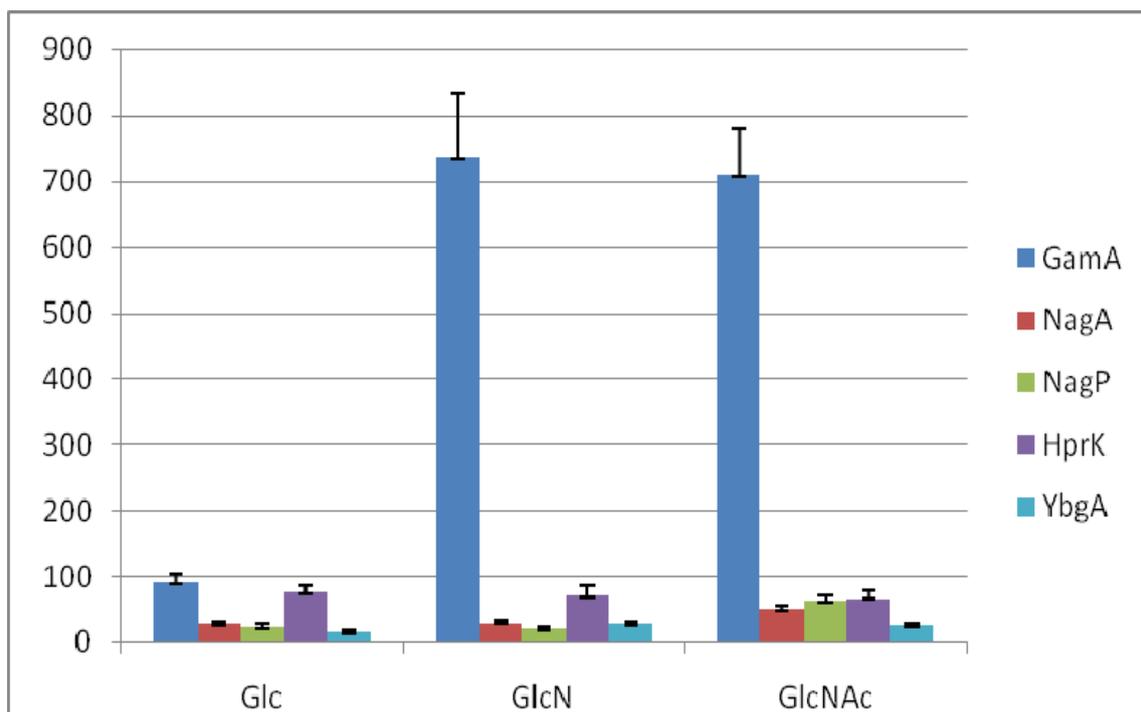


Figure 22 : Activité β -galactosidase des fusions *lacZ* transcriptionnelles dans *B.subtilis* sauvage en présence des sucres Glc, GlcN et GlcNAc. pHM2/*gamA-lacZ* (Bleu foncé), pHM2/*nagA-lacZ* (Rouge), pHM2/*nagP-lacZ* (vert), pHM2/*hprK-lacZ* (violet) et pHM2/*ybgA-lacZ* (Bleu turquoise). Une moyenne a été faite sur les résultats de trois à quatre tests. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types. Axe verticale : activité spécifique.

Les expériences de mesure de l'activité β -galactosidase (Fig. 22) montraient que le niveau d'expression de *gamA* en GlcN et en GlcNAc est 8 fois supérieur à celui obtenu en Glc. Le niveau d'expression de *nagA* en GlcNAc est 2 fois supérieur à celui obtenu en Glc et GlcN. Le niveau d'expression de *nagP* en GlcNAc est 3 fois supérieur à celui obtenu en Glc et GlcN. Le niveau d'expression de *hprK* est quasi-identique entre les trois sucres. Et le niveau d'expression de *ybgA* en GlcN et en GlcNAc est 2 fois supérieur à celui obtenu en Glc.

Nous avons également regardé l'expression des fusions des opérons *gam* et *nag* en absence des régulateurs YbgA et YvoA. Nous avons incorporé les plasmides portant des fusions de ces gènes dans les souches mutées pour l'un ou l'autre ou ces deux régulateurs.

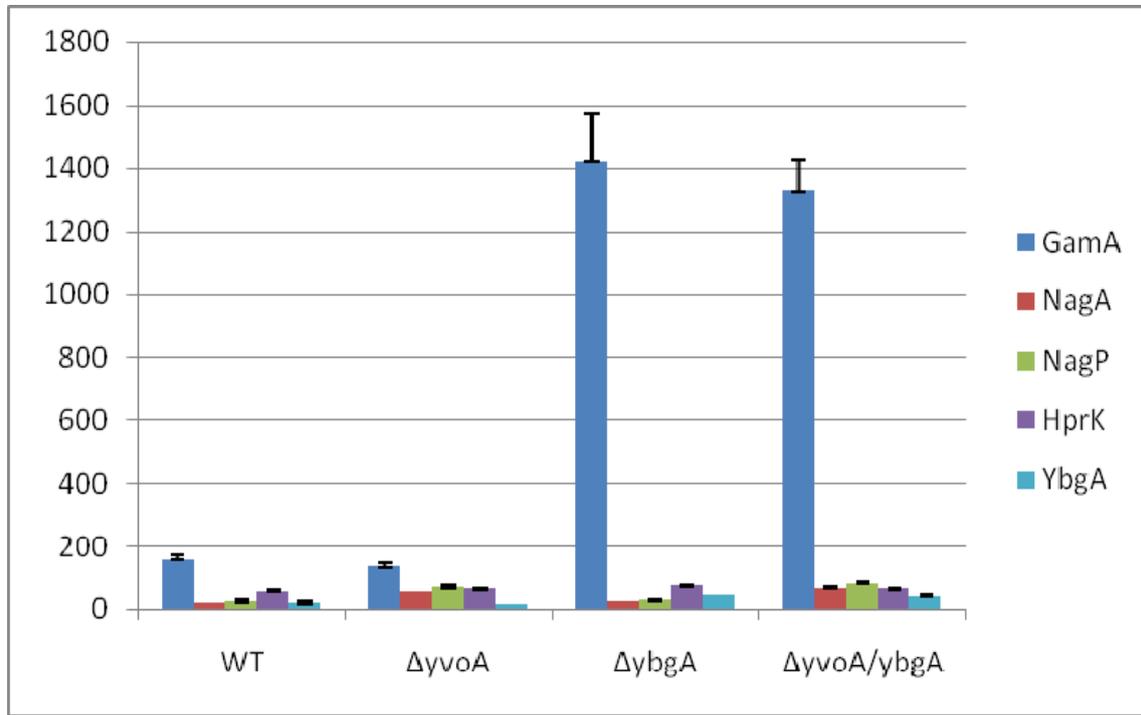


Figure 23 : Activité β -galactosidase des fusions *lacZ* transcriptionnelles dans *B.subtilis* mutée pour *yvoA*, pour *ybgA* et *yvoA+ybgA*. pHM2/*gamA-lacZ* (Bleu foncé), pHM2/*nagA-lacZ* (Rouge), pHM2/*nagP-lacZ* (vert), pHM2/*hprK-lacZ* (violet) et pHM2/*ybgA-lacZ* (Bleu turquoise). Une moyenne a été faite sur les résultats de trois à quatre tests. Axe verticale : activité spécifique. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types.

Les expériences de mesure de l'activité β -galactosidase en Fig. 23 montraient que le niveau d'expression de *gamA* en absence d'*ybgA* et en absence d'*ybgA* et d'*yvoA* est 8 fois supérieur à celui obtenu chez le sauvage. Le niveau d'expression de *nagA* en absence d'*yvoA* et en absence d'*ybgA* et d'*yvoA* est 3 fois supérieur à celui obtenu chez le sauvage. Le niveau d'expression de *nagP* en absence d'*yvoA* et en absence d'*ybgA* et d'*yvoA* est 3 fois supérieur à celui obtenu chez le sauvage. Le niveau d'expression d'*hprK* est quasi-identique en absence d'*ybgA* ou d'*yvoA* ou les deux. Comme vue avec le Northern Blot, *gamA* est soumis à une forte induction lors de la croissance sur GlcN, mais il n'existe pas une bonne corrélation entre l'activité β -galactosidase et le taux d'ARNm. Par contre, *nagA* et *nagP* sont plus faiblement induits avec un facteur de 2 à 5. Une autre différence entre le northern blot et les tests β -

galactosidase est l'absence d'induction de l'ARNm de *gamA* par GlcNAc quand les fusions *lacZ* montrent une induction identique dans les deux sucres (GlcN et GlcNAc).

Malgré sa présence près de l'opéron *nagAB*, *hprK* ne semble pas être soumis à une régulation ni par les sucres aminés ni par YbgA ou YvoA.

Pour confirmer ces résultats, nous avons fait des Western blots en utilisant les anticorps contre GamA et NagB.

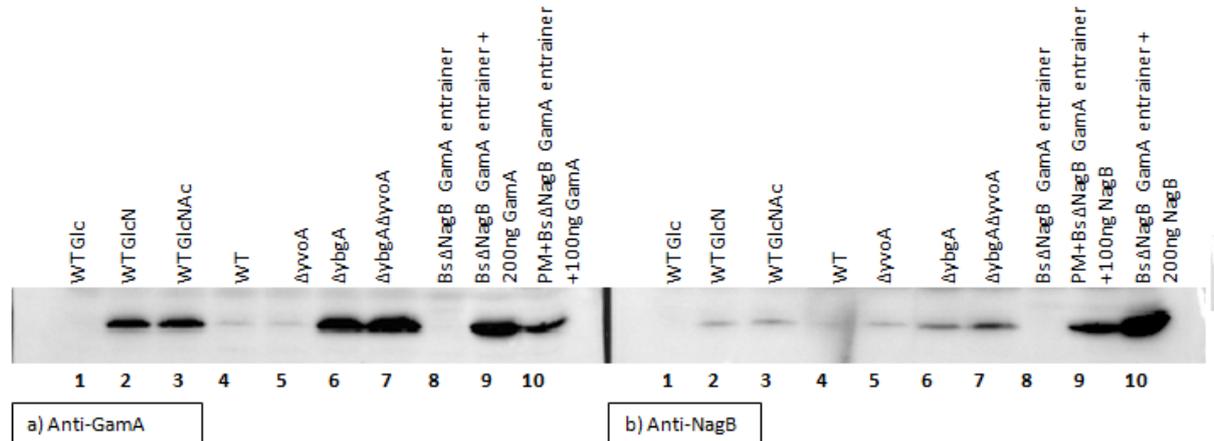


Figure 24 : Quantification par Western Blot de GamA et de NagB dans *B.subtilis* sauvage (cultivés dans différentes conditions) et muté pour les régulateurs, YbgA ou YvoA. a) Anticorps anti-GamA, b) Anticorps anti-NagB. Piste 1 : *B.subtilis* sauvage (WT) en Glc, Piste 2 : *B.subtilis* sauvage en GlcN, Piste 3 : *B.subtilis* sauvage en GlcNAc, Piste 4 : *B.subtilis* sauvage en KGlutamate/Succinate, Piste 5 : *B.subtilis* muté en *yvoA* en KGlutamate/Succinate, Piste 6 : *B.subtilis* muté en *ybgA* en KGlutamate/Succinate, Piste 7 : *B.subtilis* muté en *yvoA* et en *ybgA* en KGlutamate/Succinate, Piste 8 : *B.subtilis* muté pour *nagB* et *gamA*, Piste 9a et 10b : *B.subtilis* muté pour *nagB* et *gamA*+ 200 ng de protéine GamA (a) ou NagB (c), Piste 9b et 10a : *B.subtilis* muté pour *nagB* et *gamA*+ 100 ng de protéine GamA (a) ou NagB (c). Piste 1 à 7 : Extraits à 40 µg et sont dérivés des souches portant la fusion *gamA-lacZ*.

Les expériences de Western blot en Fig.24 montraient que la protéine GamA est surexprimée en présence de GlcN et un peu moins en présence de GlcNAc (Fig.24a). De plus, elle est surexprimée en absence d'*ybgA* (Fig.24a). La protéine NagB est légèrement exprimée en présence de GlcN et de GlcNAc (Fig.24b) et en absence d'*ybgA* et très faiblement en absence d'*yvoA* (Fig.24b). Le motif d'expression des protéines GamA et NagB correspond au pattern d'expression des fusions (Fig. 22,23). En particulier, la protéine GamA est surproduite pendant la croissance sur GlcN et GlcNAc et dans les souches *ybgA*. Le niveau de protéine NagB est plus faible mais son niveau semble être augmenté pendant la croissance sur GlcN et GlcNAc et dans les souches *ybgA*. La fusion *nagA-lacZ* (*nagB* est le deuxième gène de

l'opéron *nagAB yvoA*) est plus exprimé dans les souches *yvoA*. La détection de NagB dans les souches poussées en GlcN et les mutants *ybgA* pourrait être le résultat d'une réaction croisée entre l'anti-corps Anti-NagB et GamA surproduit dans ces conditions.

Les résultats de l'activité des fusions *lacZ* et du Western blot pour *gamA* montrent clairement que ce dernier est exprimé en présence de GlcN mais aussi en présence de GlcNAc ce qui est contradictoire avec les premiers résultats du Northern Blot et de l'extension d'amorce. Pour l'instant, nous n'avons pas d'explication pour cette contradiction.

3.2.4 Identifications des régions régulatrices fixant YbgA et YvoA des gènes *gamA*, *nagA* et *nagP*.

Les expériences décrites donnent de fortes présomptions que YbgA et YvoA pourraient être les régulateurs directs des opérons *gamAP*, *nagAB* et *nagP*.

Afin d'identifier les régions de fixation des régulateurs sur les gènes et de voir si les sucres Glc6P, GlcN6P et GlcNAc6P ont un effet sur la fixation de ces protéines, nous avons réalisé des expériences d'empreinte à la DNase I.

Les fragments de l'ADN marqués à une extrémité couvrant le début des gènes structuraux et 100-200 pb des régions en amont étaient mélangés avec des concentrations variables des deux protéines (Fig. 25). Les expériences d'empreinte à la DNase I en Fig. 25a et b montraient qu'YbgA se fixe sur deux régions distinctes proches de l'extrémité 5' du transcrit *gamA* et entre -60 et -100. La région protégée de 40 pb couvrant le +1 et le -10 est séparée par une bande hypersensible (Fig. 26). De plus, six bandes hypersensibles séparées par environ 10 pb sont observées sur le gel dans la région -60 à -100 (Fig. 25a et b). YbgA se fixe à partir de 25 nM. YvoA se fixe également sur la région de -60 à -100 de *gamA* mais plus faiblement aux concentrations à partir de 125 nM (Fig.25a). La forte fixation d'YbgA sur le promoteur de *gamA* est cohérente avec les études de régulation décrites ci-dessus montrant une dérégulation de *gamA* dans les souches *ybgA*.

YbgA ne fixe ni *nagA* ni *nagP* (Fig.25d et e). Le motif de protection par YvoA sur ces ADNs est aussi complexe. À faible concentration (25 nM), YvoA fixe une région de *nagA* et *nagP* d'environ 40 pb qui se trouve au niveau des -10 et -35 des promoteurs de ces gènes. Lorsque la quantité d'YvoA augmente, la région protégée s'agrandit (comparé aux pistes 9-11 de la Fig 25d et de la Fig 25e) pour finir de protéger tout le fragment d'ADN (piste 5 de la Fig. 25d, et 6 de la Fig. 25e). Ceci indique qu'YvoA a la capacité de polymériser sur toute la longueur des ADNs de *nagA* et *nagP*. De plus, nous observons trois bandes hypersensibles sur

nagP au début du transcrit (positions +5, 15 et 25) et au moins une bande hypersensible (et peut-être plus) dans la même région de *nagA*. Ces dernières observations semblent montrer qu'YvoA se fixe spécifiquement à faible concentration et de façon non spécifique à forte concentration sur *nagA* et *nagP* (Fig.26). La protection de *nagA* et de *nagP* par YvoA est en accord avec les résultats des Northern blots et des fusions lacZ qui montrent une augmentation de l'expression pendant la croissance des souches délétés pour *yvoA*.

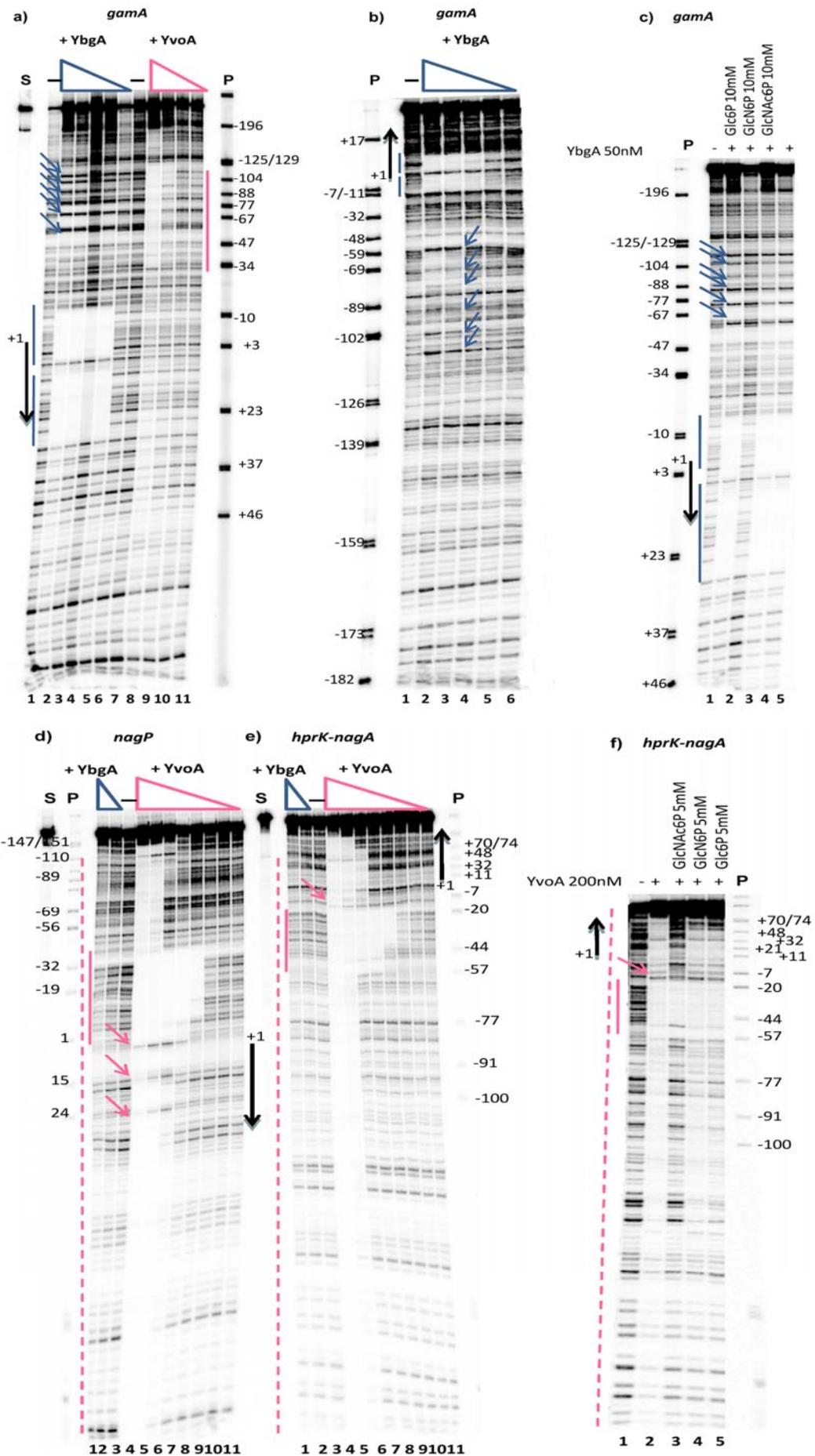


Figure 25: Identification des sites de fixation d'YbgA et d'YvoA sur les régions régulatrices de *gamA*, *nagA-hprK* et *nagP* et l'effet de Glc6P, GlcN6P, GlcNAc6P par empreinte à la DNase I. Les ADNs avec les protéines indiqués sont mélangés et traités avec la DNase I comme décrit dans le Matériels et Méthodes, et analysés sur gel d'acrylamide 6%. a) ADN *gamA* (Fragment PCR YbgA4E-GamA13B*) marqué côté *gamA* mis en présence d'une concentration décroissante d'YbgA (piste 2 : 250, piste 3 : 125, piste 4 : 62.5, piste 5 : 31.25, piste 6 : 15.3nM); d'YvoA (piste 8 : 125, piste 9 : 62.5, piste 10 : 31.25, piste 11 : 15.3nM). Pistes 1 et 7 : aucunes protéines; b) Fragment YbgA4E*-GamA13B marqué côté *ybgA* mis en présence d'une concentration décroissante d'YbgA (piste 2: 100, piste 3 : 50, piste 4 : 25, piste 5 : 12.5, piste 6 : 6.25nM). piste1 : aucunes protéines; c) Fragment YbgA4E-GamA13B* marqué coté *gamA* mis en présence d'une concentration fixe d'YbgA (50nM) (pistes 1-4) et une concentration fixe (10mM) des sucres Glc6P (piste 2), GlcN6P (piste 3), GlcNAc6P (piste 4). Piste 5 : aucunes protéines ; d) ADN *nagP* (Fragment PCR NagP20B-NagP21E*) marqué côte *nagP* mis en présence d'une concentration décroissante d'YbgA (piste 1 : 400, piste 2 : 200nM) ou d'YvoA (piste 4 : 400, piste 5 : 200, piste 6 : 100, piste 7 : 50, piste 8 : 25, piste 9 : 12.5, piste 10 : 6.25, piste 11 : 3.1nM), piste 3 : aucunes protéines, e) ADN *nagA-hprK* (Fragment PCR BsNag4*-NagA13RT) marqué coté *hprK* mis en présence d'une concentration décroissante d'YbgA (piste 1 : 400, piste 2 : 200nM) ou d'YvoA (piste 4 : 400, piste 5 : 200, piste 6 : 100, piste 7 : 50, piste 8 : 25, piste 9 : 12.5, piste 10 : 6.25, piste 11 : 3.1nM), piste 3 : aucunes protéines; -f) ADN *nagA-hprK* (Fragment PCR BsNag4*-NagA13RT) marqué coté *hprK* mis en présence d'une concentration fixe d'YvoA (200nM) et une concentration fixe (5mM) des sucres Glc6P (piste 3), GlcN6P (piste 4), GlcNAc6P (piste 5). Piste 1 : aucunes protéines; piste2 : *nagA-hprK* +YvoA 200nM. S = les sondes non digérées. M = marqueur, pBR322 digéré avec MspI. Les tailles des fragments indiqués sont relatives au point de départ des transcrits (+1) pour *gamA* (a, b, c), *nagP* (d) et *nagA* (e, f) dont la position (+1) est montrée avec une flèche. Les flèches en bleues et en roses indiquent les bandes de clivage hypersensibles de la DNaseI en présence de YbgA et YvoA.

Pour essayer d'identifier les signaux d'induction qui empêchent la fixation sur l'ADN de ces deux régulateurs, nous avons répété les empreintes en présence des sucres aminés phosphorylés (Fig.25c et f). Pour YbgA fixant *gamA*, la protection autour du +1 est enlevée en présence de GlcN6P mais les six bandes hypersensibles en amont du promoteur de *gamA* sont toujours présentes.

Pour YvoA fixant *hprK-nagA*, la protection non spécifique d'YvoA est enlevée en présence de GlcNAc6P (Fig.25f) mais pas la protection spécifique couvrant les 40 pb autour du promoteur.

IV. Discussion

Nous avons commencé cette étude afin de comparer le métabolisme des sucres aminés entre *E.coli* et *B.subtilis* et de voir les différences au niveau des fonctions des gènes et de leurs régulations. À première vue, des gènes homologues à ceux présents chez *E.coli*, existent chez *B.subtilis* mais certains sont dupliqués et leur organisation sur le chromosome est différente.

Les données au départ montraient qu'*E.coli* pousse plus vite sur GlcNAc que sur GlcN et que la situation est inverse chez *B.subtilis*, c'est-à-dire qu'elle pousse plus vite sur GlcN que sur GlcNAc. Donc une étude de la fonction et de la régulation des gènes impliqués dans ce métabolisme chez *B.subtilis* semble intéressante. De plus, des deux gènes *nagB* présents chez *B.subtilis* (*gamA* et *nagB*), ni *nagB* (Vincent et al., 2005), ni *gamA* (Alvarez-Anorve et al. non publié) ne codent pour une enzyme allostérique. Donc nous espérons par le biais de cette étude, apporter des informations complémentaires sur l'allostérie chez *E.coli*.

Des études plus approfondies sur la synténie entre les différentes espèces de *Bacillus* ont été faites par un de nos collaborateurs, Jacques Oberto. Ces résultats ont montré que les gènes *nagAB* sont présents dans toutes les espèces sauf dans *B.tusciae* et que leur organisation est souvent similaire. Le gène *nagP* est présent dans toutes les espèces. Par contre, les gènes *gamAP* sont présents uniquement chez *B.subtilis* et *gamP* est l'homologue le plus proche du gène *ptsG* des autres espèces de *Bacillus*.

4.1 Fonction des gènes *gam* et *nag*.

L'annotation de gènes de *B.subtilis* comme *gamAP*, *nagAB* et *nagP* présuppose que les gènes *gamAP* sont responsables de la croissance sur GlcN et les gènes *nagAB* et *nagP* de la croissance sur GlcNAc. Notre étude a montré que cette interprétation est loin d'être complète. Concernant l'utilisation du GlcNAc, le gène *nagA* (codant pour la seule GlcNAc6P desacetylase) s'avère nécessaire, mais *nagB*, co-transcrit avec lui, n'est pas nécessaire et sa délétion n'a aucun effet. Le gène *gamA* est requis pour la croissance sur GlcN (Fig.18a et b) et en grande partie de celle sur GlcNAc car dans une souche délétée pour *gamA*, nous ne voyons qu'une croissance faible résiduelle sur GlcNAc dépendant de *nagB*. Les gènes *gamAP* uniques chez *B.subtilis* sont responsables de la croissance sur GlcN (Fig.18c), mais *gamP*

peut être délété car son homologue *ptsG* (52% d'identité dans les régions chevauchantes), le transporteur du Glc, est aussi capable de transporter la GlcN (Fig.18e).

Comme pour la GlcN, deux transporteurs sont capables de permettre l'utilisation du GlcNAc, *gamP* et *nagP*, mais la mutation de l'un ou l'autre réduit la croissance sur GlcNAc et la mutation des deux ensembles a un plus grand effet (Fig.18d). Donc les deux transporteurs sont nécessaires pour le transport optimal de GlcNAc. La mutation de *ptsG* n'a aucun effet supplémentaire par rapport au double mutant *nagP gamP* pour la croissance sur GlcNAc. (Fig. 18f). Il reste une croissance résiduelle sur GlcN et GlcNAc (DT 200-300 min) plus forte qu'avec les mutations *nagA* ou *gamA* seules (DT> 400 min) (Fig.19a et b), ce qui fait penser que d'autres transporteurs pourraient être capables de transporter la GlcN et la GlcNAc. C'est probablement un autre système PTS car la mutation *ptsI* élimine toute la croissance sur GlcN ou GlcNAc (DT> 800 min) (données non montrées).

Nous pouvons noter que *nagP* ne code que pour le domaine IICB du PTS, il a donc besoin d'un domaine IIA. Il utilise peut-être le domaine IIA de PtsG ou de GamP. D'autre part, nous avons observé que la mutation *ptsG* provoque un léger ralentissement de la croissance sur GlcNAc, mais uniquement dans les souches *nagP*⁺, ce qui pourrait indiquer que NagP utilise le domaine IIA de PtsG. (Fig. 18f). Il y a un autre domaine IIA orphelin (*ypqE*) dans le chromosome de *B.subtilis* qui pourrait être utilisé par *nagP* (Reizer et al., 1999).

Comme dit précédemment, *gamA* et *gamP* sont présents uniquement chez *B.subtilis* et ce sont ces deux gènes qui sont majoritairement utilisés pour l'utilisation de GlcN et GlcNAc.

4.2 Régulation des gènes *gam* et *nag*.

Les résultats de Northern Blot confirment la co-expression des gènes *gamA* et *gamP*. L'opéron *gamAP* est induit au moins 10 fois par une croissance sur GlcN comme le montrent les Northern blots, la transcription inverse, les tests de β -galactosidase de la fusion *gamA-lacZ* et les Western blots en présence de GlcN et de GlcNAc pour *gamA*. Ces résultats sont en accord avec nos études *in vivo* qui indiquaient un rôle important de *gamA* et de *gamP* pour la croissance sur GlcN et sur GlcNAc. Mais nous avons observé une contradiction entre les tests de β -galactosidase et les Northern blots pour l'induction de *gamA* par GlcNAc. Comme décrit précédemment dans le chapitre des résultats, nous observons une induction de *gamA* en présence de GlcN et aussi en présence de GlcNAc (facteur 8) lors des tests de β -galactosidase et les Western blots (Fig.22 et 24a), mais nous ne retrouvons pas ces résultats avec les Northern blots et l'extension d'amorce qui ne montrent une augmentation de l'ARNm de

gamA qu'en présence de GlcN (facteur d'environ 50) (Fig.20a et 21a). Pourtant, les ARNs sont extraits de la même culture utilisée pour doser la β -galactosidase et pour analyser les protéines par Western blot. Ce problème n'est pas résolu pour le moment. On peut également noter que les Western blots indiquent clairement que l'expression de GamA est induite pendant la croissance sur GlcNAc. Ceci montre que l'induction de la fusion *gamA-lacZ* n'est pas un artefact lié à l'utilisation des fusions avec la β -galactosidase.

L'opéron *gamAP* fait 2.7 kb. La taille du transcrit détecté contenant *gamA* et *gamP* est compatible au démarrage de la transcription identifié par transcription inverse qui se trouve à 63 pb en amont du codon de démarrage AUG précédé par un promoteur dont les séquences -35 et -10 seraient TTGACA-18 pb-TAAATT (Fig.21a). Ce transcrit semble s'arrêter au niveau du terminateur Rho indépendant après *gamP* soit la séquence « AAAAGTCCCCCTGCTGCGGGGGACTTTT ». Les mutations dans le gène *ybgA* localisé en amont et divergent de *gamAP*, provoquent une surexpression des ARNm de *gamAP* (facteur 50) (Fig.20a et d) et des fusions *gamA-lacZ* (facteur 8) (Fig.23 et 24a), en accord avec l'idée qu'il code pour le répresseur de l'opéron.

Les gènes *nagAB* sont plus faiblement induits comme le montrent les Northern blots, la transcription inverse et les tests de β -galactosidase. L'analyse des ARNs par Northern blot ou par transcription inverse montre plutôt une expression constitutive avec une petite augmentation en présence de GlcNAc (facteur 3) (Fig.20b et 21b). Les Northern blots montrent que *nagAB* est co-transcrit avec *yvoA* (Fig. 20g). L'opéron *nagAB yvoA* fait 2.7 kb. La taille du transcrit détecté avec la sonde *nagA* correspond aux gènes *nagA*, *nagB* et *yvoA* dont le site +1 de *nagA* se trouve 28 pb en amont du codon de démarrage AUG et dont les séquences -35 et -10 du promoteur seraient TAGATC-17 pb-TAAAAT (Fig.21b). La phase ouverte de *yvoA* ne commence que 17 pb après *nagB* et le Northern blot utilisant *yvoA* comme sonde n'a pas détecté un transcrit spécifique pour *yvoA* (Fig. 20g), ce qui fait penser qu'il est exprimé à partir d'un long transcrit *nagAB yvoA*. Il pourrait donc être autorégulé. *yvoA* est séparé du gène suivant, *yvnB*, par 19 pb. Le gène *yvnB*, exprimé dans le sens opposé d'*yvoA*, représente un site de collision des ARN polymérases. La séquence intergénique «TAAAAAAGCCTCCAACCCTTTTIA» (les codons STOP sont soulignés) contient des séries de 5 ou 7T dans les deux directions mais on ne distingue pas une structure tige boucle qui constituerait un terminateur rho-indépendant classique.

Nous avons observé lors de nos analyses par Western blots que NagB est plus surexprimé en absence d'*ybgA* que d'*yvoA* ; ceci pourrait être un artefact dû à une réaction croisée des anticorps anti-NagB sur GamA.

Le gène *nagP* fait 1.4 kb. La taille du transcrit *nagP* correspond bien au gène *nagP* dont le site +1 se trouve 35 pb en amont du codon de démarrage AUG et est précédé par un promoteur dont les séquences -35 et -10 seraient TTGGTA-17 pb-TATATG (Fig.21d). Le transcrit semble s'arrêter au niveau du terminateur après *nagP*, correspondant à la séquence « AAAAGCGGAGAGGGCAACCTCTCCGCTTTT ».

L'induction des ARNm *nagAB* et *nagP* est moins forte (2-6 fois) (Fig.20b et c) que *gamAP* (environ 50 fois) (Fig.20a et d) par toutes les techniques utilisées. La mutation *yvoA* provoque une surexpression de *nagA* et *nagP* (4-6 fois) cohérente avec l'idée que ce gène code pour le répresseur de ces opérons (Fig.20b, c et Fig.23).

Le fait que l'activité de la fusion *gamA-lacZ* soit augmentée de 8 fois alors que la fusion *nagA-lacZ* n'augmente que 2 fois et la fusion *nagP-lacZ* 2 à 3 fois par rapport au sauvage (Fig.22) suggère qu'une raison pour laquelle *B.subtilis* pousse plus lentement sur GlcNAC que sur GlcN serait une carence en enzymes NagA et NagB et probablement en substrat GlcNAc6P (via NagP).

L'expression des autres gènes exprimés dans le sens opposé, à partir des mêmes régions régulatrices, a été étudiée. La présence des gènes *hprK*, exprimé dans le sens divergent par rapport à *nagAB*, et *ybgA*, exprimé dans le sens divergent par rapport à *gamAP* (Fig. 8) nous a conduit à nous demander s'ils étaient soumis aux mêmes régulations que *nagAB* et *gamAP*.

hprK, (codant pour la kinase qui régule l'activité d'HPr (protéine PTS générale), dans son rôle régulateur de la répression catabolique chez les bactéries à Gram positif) est exprimé constitutivement selon la hiérarchie Glc> GlcN> GlcNAc (Fig.21c et 22). Le site +1 de son promoteur se trouve à 45 pb en amont du codon de démarrage AUG et dont les séquences -35 et -10 seraient TTTAGG-17 pb-TAAAAT. D'autre part, une fusion *hprK-lacZ* montre une activité constante en absence d'*yvoA* et d'*ybgA*, ce qui semble montrer que *hprK* n'est pas régulé par ces deux protéines (Fig.23).

Les résultats de Northern Blot et d'extension d'amorce montraient que le site +1 du gène *ybgA*, se trouve à 41 pb en amont du codon de démarrage AUG et dont les séquences -35 et -10, seraient TTTCAT-17 pb-TATTAT (Fig.21e). Ce gène est surexprimé en présence de

GlcN (facteur 7) mais pas en présence des autres sucres (Fig.20f). On ne voit pas les transcrits dans une souche *ybgA* car le gène est délété mais l'activité d'une fusion *ybgA-lacZ* en *trans* indique que l'expression de *ybgA* est augmentée pendant la croissance en GlcN et en GlcNAc (Fig.22) et dans la souche *ybgA* (Fig. 23) mais seulement par un facteur 2 à 3. Encore une fois, les facteurs d'induction sont plus forts pour les ARNm que pour les fusions avec la β -galactosidase. En tout cas, il semble qu'*ybgA* pourrait être autorégulé mais ceci rest à confirmer.

Nous avons montré que PtsG est impliqué dans le transport de GlcN et qu'il est aussi efficace que GamP. L'expression du gène *ptsG* a été étudiée auparavant (Stulke et al., 1997). Il est exprimé avec les gènes *ptsHI* à partir d'un promoteur situé dans le gène codant pour l'anti-terminateur, *gltT*. Un terminateur est repérable après *ptsI*. La taille de ce transcrite est de 4.5 kb. L'opéron peut également être exprimé à partir du promoteur en amont de *gltT*, ce qui pourrait expliquer le manque d'un signal franc pour *ptsG*. Le signal obtenu avec la sonde *ptsG* semble être plus fort en Glc (facteur 25) et GlcN (facteur 20) qu'en GlcNAc (facteur 3), ou dans le milieu de base sans sucre (KGlutamate/succinate) (Fig. 20e). Mais le signal est un "smear" plutôt qu'une bande nette. Trois sondes différentes produisent le même motif (données non montrées), donc il semble caractéristique de l'ARNm de *ptsG*. Un enrichissement du signal autour de 2 kb pourrait correspondre à un transcrite contenant seulement le gène *ptsG*. Bien que nous puissions observer un signal plus fort avec les sucres Glc et GlcN, il n'y a pas d'augmentation avec les mutations *yvoA* ou *ybgA* (Fig.20e) ce qui semble indiquer que *ptsG* ne fait pas partie du régulon *gam/nag* chez *B.subtilis*. En outre, le fait que la mutation *ptsI* inhibe complètement la croissance, alors que la mutation *gamP ptsG* permet une croissance résiduelle (Fig.18e et 19b), montre qu'il pourrait y avoir un autre type de transport PTS intervenant dans le transport du GlcN.

En regardant les données dans leur ensemble, nous sommes frappés par la forte induction des gènes *gamAP* pendant la croissance sur GlcN et le faible changement du niveau d'expression de *nagAB* et *nagP*. Nous avons pu comparer les résultats des études de croissance et d'expression des gènes mesurées par Northern blot, extension d'amorce et avec des fusions *lacZ*. Nous observons donc une corrélation entre le test de β -galactosidase, les Western blots et la croissance pour *gamA* en présence de GlcN et de GlcNAc, mais nous ne retrouvons pas cette corrélation au niveau de l'ARNm par Northern blot et extension d'amorce. Pour *nagP* et *nagA* nous trouvons une corrélation entre tous les résultats. Pour

nagB, nous trouvons une corrélation sauf avec le Western Blot où *nagB* devrait être surexprimé en absence d'*yvoA* et non en absence d'*ybgA* ; ceci pourrait être un artefact dû à une réaction croisée des anticorps anti-NagB sur GamA.

4.3 La régulation par YvoA et YbgA

Les expériences de Northern blot et de β -galactosidase indiquent qu'*YvoA* et *YbgA* sont respectivement les régulateurs de *nagAB*, *nagP* et de *gamAP*. Pour savoir si la régulation par *YbgA* et *YvoA* est directe, une étude d'empreinte par la DNase I a été réalisée afin d'identifier les régions de fixation d'*YbgA* et d'*YvoA*.

Ces deux régulateurs sont les protéines homologues de la famille GntR mais n'ont que 31% d'identité entre eux. Les 2 protéines ne se fixent pas à l'ADN de la même manière. *YbgA* semble avoir 2 modes de fixation. Il protège deux régions de 20 pb séparées par un site hypersensible couvrant le +1 et le -10 de *gamA* et il protège une autre région entre les positions -55 à -110 avec 6 bandes hypersensibles séparées par environ 10 pb (Fig.25a, b). L'apparition des bandes hypersensibles séparées par 10-11 pb pourrait indiquer la formation d'un complexe nucléo-protéique contenant une boucle d'ADN. Ces régions sont montrées sur la Fig.26. Nous avons pu identifier un site consensus pour la fixation d'*YbgA* qui pourrait être «TAAATT.GT.AT.ACAA » qui apparaît deux fois sur le "brin du haut" dans la région autour de +1 et deux fois, mais moins bien conservé, sur le "brin du bas" dans la région -52 à -107 du promoteur *gamA*. Cette région couvre le -10 et le -35 du promoteur d'*ybgA* et pourrait expliquer l'autorégulation observée. *YbgA* ne se fixe pas en amont de *nagA* et *nagP* (Fig.25d, e). Les séquences protégées par *YbgA* ne sont pas des palindromes mais forment des répétitions directes, au moins dans la région autour du +1.

Nous avons étudié la fixation d'*YvoA* sur les régions régulatrices de *nagA*, de *nagP* et de *gamA*. *YvoA* semble se fixer faiblement sur une région allant de -30 vers -110 et de +25 vers +45 par rapport au promoteur de *gamA*. Le site distal couvre la région promotrice d'*ybgA* (Fig.25a). La fixation n'est détectable qu'à hautes concentrations d'*YvoA* et aucune régulation d'*ybgA* par *YvoA* n'est observée suggérant que cette fixation est un artefact *in vitro*. Les régions promotrices de *nagA* et de *nagP* contiennent un site de forte affinité pour *YvoA* qui semble initier la protection des régions sur toute la longueur de l'ADN. *YvoA* à faible concentration se fixe sur une région de *nagA* et de *nagP* d'environ 40 pb qui se trouve au niveau des +1, -10 et -35 du promoteur de *nagP* (Fig.25d) et au niveau de -10 et -35 de *nagA* (Fig.25e). Trois bandes hypersensibles dans *nagP* sont observées au début de la

transcription vers les positions +5, 15 et 25 et au moins une bande hypersensible (et peut-être plus) est observée dans la même région de *nagA*. Lorsque la quantité d'YvoA augmente, la région est protégée sur tout le fragment d'ADN ce qui indique qu'YvoA peut polymériser sur tout le fragment, mais les trois bandes hypersensibles au début de *nagP* persistent. YvoA semble donc avoir une fixation spécifique à faible concentration et une fixation non spécifique à forte concentration.

Les sucres aminés étant des sucres PTS, il semblait possible que les inducteurs d'YbgA et d'YvoA soient les sucres aminés phosphorylés (GlcN6P, GlcNAc6P). Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de ces sucres sur la fixation des régulateurs par empreinte à la DNase I et également par retard sur gel (EMSA = electrophoretic mobility shift assay) (données non montrées). En présence de GlcN6P, YbgA semble perdre sa protection sur *gamA* (Fig.25c) La présence de Glc6P ou GlcNAc6P n'a aucun effet sur la protection. Les effets des sucres phosphorylés sur la fixation d'YvoA sont plus complexes. En présence de GlcNAc6P, YvoA semble perdre sa protection non spécifique sur *hprK-nagA* mais pas sa protection spécifique couvrant les 40 pb autour du promoteur (Fig.25f). Le gel retard a confirmé ces résultats car nous avons toujours observé un complexe sans perdre la fixation spécifique d'YvoA.

You *et al.* avaient proposé en 2005, une séquence consensus chez *B.subtilis* pour la fixation d'YvoA en amont de *nagP* (AATTGGTATAGACTACTAG) et de l'opéron *nagAB* (AGCTGGTCTAGACTACTAG) qui sont les séquences protégées par YvoA que nous avons trouvé (You *et al.*, 2005).

Par la suite, Resch *et al.* en 2010, ont étudié DasR, régulateur activant la cascade de signaux allant du GlcNAc à la production d'antibiotiques chez *Streptomyces coelicolor*, puis se sont intéressés à son homologue chez *B.subtilis*, YvoA (38% d'identité). Ils ont présenté la structure cristallographique d'YvoA avec un site de liaison à un effecteur (Resch *et al.*, 2010). Ils ont montré qu'YvoA est capable de se fixer sur un court fragment d'ADN portant une séquence très similaire à l'opérateur de DasR, les sites *dre* (DasR responsive element). Ces sites se trouvent en amont de *nagP* et de *nagAB* et correspondent aux séquences consensus identifiées par You *et al.* En 2011, Bertram *et al.* ont dénommé YvoA, NagR, pour son rôle répresseur sur les gènes *nag* et ils ont proposé un site consensus pour YvoA, basé sur celui de son homologue DasR mais légèrement différent, chez *Bacillus* (ATTGGTATAGAc/ta/cACT) et chez *Streptomyces* (Ag/cTGGTCTAGACCACT). Pour confirmer que cette séquence est le site de liaison, ils ont montré par une expérience de retard

sur gel qu'YvoA se fixe sur le site *dre* de *nagA*. Et ils ont proposé que GlcN6P est le sucre phosphorylé capable d'inhiber cette fixation (Bertram et al., 2011). Ils utilisaient un oligo de 35 pb, qui ne porte que le site consensus, donc ils ne pouvaient pas voir l'effet de la polymérisation tout au long de l'ADN que nous avons vu avec l'empreinte.

De plus, l'identité du signal d'induction n'est pas claire dans ces deux articles car Resch *et al.* observent une fixation faible du GlcNAc6P sur YvoA par ITC (Isothermal Titration Calorimetry) (Resch et al., 2010) tandis que Bertram *et al.* proposent que GlcN6P soit l'effecteur car ils ont observé la perte de fixation d'YvoA sur l'opérateur *nagA* en présence de GlcN6P par gel retard (Bertram et al., 2011). Il faut rappeler que l'inducteur de DasR chez *S. coelicolor* est GlcN6P (Rigali *et al.*, 2006). Nos résultats avec des techniques plus précises d'empreinte à la DNase I et de retards sur gel avec les régions régulatrices de *nagP* et de *nagA* semblent indiquer que ni le GlcN6P, ni le GlcNAc6P ne sont capables d'inhiber la fixation spécifique d'YvoA proche du site de démarrage de la transcription de *nagA*. Par contre, nous avons pu observer que le GlcNAc6P est capable de supprimer la protection non spécifique à haute concentration d'YvoA (Fig. 25f). La contradiction, entre nos résultats et ceux de Resch *et al.* et de Bertram *et al.*, n'est pas encore résolue. Par contre, nous retrouvons bien la protection dans les régions des sites consensus pour YvoA définis par Bertram *et al.* (Fig.26).

V. Conclusions et Perspectives

Notre étude montre que malgré les homologies au niveau des protéines impliquées dans le métabolisme des sucres aminés chez *E.coli* et *B.subtilis*, l'organisation des gènes correspondants et leurs modes de régulations sont bien différents. Il y a aussi des différences au niveau des protéines. Chez *E.coli*, la désaminase NagB est un hexamère de sous-unités identiques allostériques et la désacétylase NagA est un tétramère de sous unités identiques. La désaminase NagB de *B.subtilis* est monomérique et non allostérique (Vincent et al., 2005) et elle semble n'être quasiment pas utilisée. La désacétylase NagA est dimérique et semble être faiblement induite en présence de GlcNAc. Mais il est surprenant que les gènes survenus plus tard dans l'évolution du génome de cette bactérie, *gamAP* codant pour une GlcN6P désaminase et pour un transporteur type PTS, semblent être les gènes les plus utilisés pour le métabolisme du GlcNAc et du GlcN. NagP transporte, en collaboration avec GamP, le GlcNAc. D'autre part, GamP transporte aussi le GlcN avec l'aide de son homologue PtsG. Un autre type de transport PTS pourrait intervenir puisqu'il existe toujours une croissance résiduelle en absence des différents transporteurs. HprK, protéine PTS générale chez *B.subtilis*, ne semble pas jouer un rôle spécifique dans le métabolisme des sucres aminés et son expression n'est pas soumise à une régulation par YbgA ou YvoA.

Par contre, les protéines YbgA et YvoA, semblent être les régulateurs de leurs opérons respectifs. Nous avons pu proposer un site consensus pour YbgA et nous avons retrouvé les sites consensus prédits par Bertram *et al.* D'autre part, les deux protéines YvoA et YbgA semblent avoir un mode de fixation complexe et non similaire sur les gènes qu'elles contrôlent. YbgA se fixe sur deux régions avec des caractéristiques différentes. Vers le démarrage de la transcription, YbgA protège une quarantaine de pb avec une bande hypersensible au milieu. Plus en amont, il produit un profil de 6 bandes hypersensibles séparées par à peu près 10 pb. YvoA protège une région de 30 pb produisant une ou des bandes hypersensibles d'un seul côté de la région protégée.

Malgré le fait qu'ils sont tous les deux membres de la famille GntR, YvoA et YbgA semblent se fixer sur l'ADN de manière très différente. Les empreintes sont différentes et alors qu'YvoA donne plusieurs bandes de retard sur gel EMSA, nous n'avons pas pu détecter une bande de retard avec YbgA. Une autre différence concerne leur signal d'induction. Une hypothèse raisonnable serait que l'inducteur d'YbgA est le GlcN6P mais nous n'avons pas

réussi à mettre en évidence la perte totale de la fixation d'YvoA en présence de sucres phosphorylés. Donc il y a plusieurs aspects fonctionnels de ces deux protéines qu'il serait intéressant d'analyser plus en détail. Par exemple, les deux types de fixation d'YbgA aux deux sites présents en amont de *gamA* qui semblent bien distincts. Pour YvoA, il y a une série de complexes détectables sur gel retard avec *nagA* et *nagP* qui correspondent probablement à la polymérisation d'YvoA sur l'ADN (ce qu'YbgA ne fait pas). Il serait intéressant d'analyser les régions protégées dans chaque bande afin de confirmer les sites de fixation d'YvoA. Une analyse par empreinte à la DNaseI peut être faite sur les complexes isolés par gel retard, c'est-à-dire les découper sur gel, les purifier et les analyser sur gel de séquence afin d'identifier les régions protégées dans chaque complexe. D'autre part, les sites de fixation ne sont pas des palindromes. Une mutagenèse dans les sites de fixation permettrait de définir les bases importantes permettant la fixation des répresseurs sur les régions régulatrices de *gamA*, *nagA* et *nagP*.

Nous ne connaissons pas l'inducteur d'YvoA car ni le GlcNAc6P ni le GlcN6P ne semblent le déplacer de son site de forte affinité. Existe-t-il un autre signal d'induction? Une indication vient de l'analyse de l'ARN des souches mutées dans *nagA*. Les résultats préliminaires des Northern blots montrent que les mutations dans *nagA* jouent sur l'expression de *nagP*, impliquant donc un effet sur la synthèse du signal inducteur comme c'est le cas pour *nagA* chez *E.coli*. Chez *E. coli*, *nagA* est impliqué dans le recyclage du peptidoglycane (PG), et il y a une accumulation du GlcNAc6P issue du recyclage dans le mutant *nagA*. S'il y a le même effet chez *B.subtilis*, peut-être est-ce un indice de recyclage du PG chez ce Gram positif?

Le manque de signal inducteur n'explique pas la faible croissance sur GlcNAc car même dans une souche mutée pour *yvoA* la croissance n'est pas améliorée. Une autre hypothèse est que la faible induction de *nagA* par le GlcNAc (alors qu'il code pour la GlcNAc6P désacétylase) pourrait être due à un promoteur faible. Pour vérifier cela, une expérience à venir serait de mettre les gènes *nagAB* sous contrôle d'un promoteur inductible (type pSpac) afin de voir si l'induction par l'IPTG améliore la croissance sur GlcNAc.

Dans la discussion, nous avons signalé que NagP, composé d'un seul domaine IICB, pourrait interagir avec le domaine IIA de PtsG ou de GamP ou avec le domaine IIA orphelin d'YpqE. Il serait intéressant de tester cela en introduisant une fusion *nagP-lacZ* dans des souches portant des mutations dans les domaines IIA de *gamP*, *ptsG* ou *ypqE* et voir l'effet du GlcNAc. De plus, la croissance résiduelle en absence de *ptsG* sur les divers sucres laisse à

penser qu'il doit y avoir un autre type de transport PTS. Il serait donc intéressant d'identifier ce transporteur.

Cette étude a permis d'avoir une vue globale sur l'utilisation des sucres aminés chez *B.subtilis*. L'analyse génomique initiale, ayant repéré les gènes codant pour les protéines sensées intervenir dans l'utilisation des sucres aminés, n'était pas suffisante pour identifier les fonctions réelles de ces gènes. De plus, les gènes arrivés tardivement dans le génome de *B.subtilis* ont pris une place primordiale dans l'utilisation des sucres aminés chez cette bactérie. Il reste beaucoup d'informations à clarifier et il faut compléter les résultats décrits.

Annexes

❖ Estimation du coût total de l'expérimentation mise en œuvre :

Le projet de 3 ans a été financé par une ANR.

Le budget pour les séquençages et la synthèse des oligos est estimé à 5 000 euros.

Le budget pour les consommables, les produits de biologie moléculaire et les petits équipements est estimé à 94 000 euros.

Pour l'instant, après 20 mois, 58% du coût total a été dépensé (comprenant d'autres études associées sur la même ANR), soit un coût de 51 620 euros.

Bibliographie

- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback & S. Iwata, (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301: 610-615.
- Aiba, H., (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* 10: 134-139.
- Alvarez-Anorve, L. I., D. A. Alonzo, R. Mora-Lugo, S. Lara-Gonzalez, I. Bustos-Jaimes, J. Plumbridge & M. L. Calcagno, (2011) Allosteric kinetics of the isoform 1 of human glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1846-1853.
- Alvarez-Anorve, L. I., I. Bustos-Jaimes, M. L. Calcagno & J. Plumbridge, (2009) Allosteric regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase (NagB) and growth of *Escherichia coli* on glucosamine. *J Bacteriol* 191: 6401-6407.
- Alvarez-Anorve, L. I., M. L. Calcagno & J. Plumbridge, (2005) Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *J Bacteriol* 187: 2974-2982.
- Amster-Choder, O., (2005) The bgl sensory system: a transmembrane signaling pathway controlling transcriptional antitermination. *Curr Opin Microbiol* 8: 127-134.
- Aymerich, S., G. Gonzy-Treboul & M. Steinmetz, (1986) 5'-noncoding region sacR is the target of all identified regulation affecting the levansucrase gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 166: 993-998.
- Aymerich, S. & M. Steinmetz, (1992) Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10410-10414.
- Bates, C. J. & C. A. Pasternak, (1965a) Further Studies on the Regulation of Amino Sugar Metabolism in *Bacillus Subtilis*. *Biochem J* 96: 147-154.
- Bates, C. J. & C. A. Pasternak, (1965b) The Incorporation of Labelled Amino Sugars by *Bacillus Subtilis*. *Biochem J* 96: 155-158.
- Bertram, R., S. Rigali, N. Wood, A. T. Lulko, O. P. Kuipers & F. Titgemeyer, (2011) Regulon of the N-acetylglucosamine utilization regulator NagR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 193: 3525-3536.
- Boos, W. & H. Shuman, (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 204-229.

- Bryksin, A. V. & I. Matsumura, (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* 48: 463-465.
- Buse, M. G., (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1-E8.
- Bustos-Jaimes, I., A. Sosa-Peinado, E. Rudino-Pinera, E. Horjales & M. L. Calcagno, (2002) On the role of the conformational flexibility of the active-site lid on the allosteric kinetics of glucosamine-6-phosphate deaminase. *J Mol Biol* 319: 183-189.
- Calcagno, M., P. J. Campos, G. Mulliert & J. Suastegui, (1984) Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 787: 165-173.
- Contesse, G., M. Crépin, F. Gros, A. Ullmann, and J. Monod, (1969) On the mechanism of catabolite repression. In: The lactose operon. J. R. B. a. D. Zipser (ed). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 401-415.
- Dambach, M. D. & W. C. Winkler, (2009) Expanding roles for metabolite-sensing regulatory RNAs. *Curr Opin Microbiol* 12: 161-169.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
- De Reuse, H., A. Kolb & A. Danchin, (1992) Positive regulation of the expression of the *Escherichia coli* pts operon. Identification of the regulatory regions. *J Mol Biol* 226: 623-635.
- Debarbouille, M., I. Martin-Verstraete, A. Klier & G. Rapoport, (1991) The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both sigma 54- and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2212-2216.
- Deutscher, J., C. Francke & P. W. Postma, (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 939-1031.
- Edwards, T. E., D. J. Klein & A. R. Ferre-D'Amare, (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr Opin Struct Biol* 17: 273-279.
- Fu, D., A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski & R. M. Stroud, (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290: 481-486.
- Fujita, Y., (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 245-259.

- Fujita, Y., Y. Miwa, A. Galinier & J. Deutscher, (1995) Specific recognition of the Bacillus subtilis gnt cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol Microbiol* 17: 953-960.
- Gorke, B. & J. Stulke, (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6: 613-624.
- Hamel, L. P. & N. Beaudoin, (2010) Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Planta* 232: 787-806.
- Horjales, E., M. M. Altamirano, M. L. Calcagno, R. C. Garratt & G. Oliva, (1999) The allosteric transition of glucosamine-6-phosphate deaminase: the structure of the T state at 2.3 Å resolution. *Structure* 7: 527-537.
- Hurley, J. H., H. R. Faber, D. Worthylake, N. D. Meadow, S. Roseman, D. W. Pettigrew & S. J. Remington, (1993) Structure of the regulatory complex of Escherichia coli IIIIGlc with glycerol kinase. *Science* 259: 673-677.
- Huskisson, E. C., (2008) Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis. *J Int Med Res* 36: 1161-1179.
- Kalamorz, F., B. Reichenbach, W. Marz, B. Rak & B. Gorke, (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlnS expression depends on the small RNA GlnZ and involves the novel protein YhbJ in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 65: 1518-1533.
- Keyhani, N. O. & S. Roseman, (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1473: 108-122.
- Kimata, K., T. Inada, H. Tagami & H. Aiba, (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the ptsG gene encoding major glucose transporter in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 29: 1509-1519.
- Kimata, K., Y. Tanaka, T. Inada & H. Aiba, (2001) Expression of the glucose transporter gene, ptsG, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in Escherichia coli. *EMBO J* 20: 3587-3595.
- Kuhnau, S., M. Reyes, A. Sievertsen, H. A. Shuman & W. Boos, (1991) The activities of the Escherichia coli MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J Bacteriol* 173: 2180-2186.
- Kundig, W., S. Ghosh & S. Roseman, (1964) Phosphate Bound to Histidine in a Protein as an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52: 1067-1074.

- Lee, S. J., W. Boos, J. P. Bouche & J. Plumbridge, (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J* 19: 5353-5361.
- Lengeler, J. W. & K. Jahreis, (2009) Bacterial PEP-dependent carbohydrate: phosphotransferase systems couple sensing and global control mechanisms. *Contrib Microbiol* 16: 65-87.
- Lin, E. C. C., (1996) Dissimilatory Pathways for Sugars, Polyols, and Carbohydrates. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. F. C. Neidhardt (ed). Washington, DC: ASM Press, pp. 314.
- Mahadevan, S., A. E. Reynolds & A. Wright, (1987) Positive and negative regulation of the *bgl* operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169: 2570-2578.
- Mahadevan, S. & A. Wright, (1987) A bacterial gene involved in transcription antitermination: regulation at a rho-independent terminator in the *bgl* operon of *E. coli*. *Cell* 50: 485-494.
- Martin-Verstraete, I., M. Debarbouille, A. Klier & G. Rapoport, (1994) Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J Mol Biol* 241: 178-192.
- Martin-Verstraete, I., J. Stulke, A. Klier & G. Rapoport, (1995) Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* 177: 6919-6927.
- Mayford, M. & B. Weisblum, (1989) Conformational alterations in the *ermC* transcript in vivo during induction. *EMBO J* 8: 4307-4314.
- McVicker, G., L. Sun, B. K. Sohanpal, K. Gashi, R. A. Williamson, J. Plumbridge & I. C. Blomfield, (2011) SlyA protein activates *fimB* gene expression and type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* 286: 32026-32035.
- Meadow, N. D., P. Coyle, A. Komoryia, C. B. Anfinsen & S. Roseman, (1986) Limited proteolysis of III_{Glc}, a regulatory protein of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system, by membrane-associated enzymes from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 261: 13504-13509.
- Monod, J., (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. In. Paris, France: Hermann et Cie, pp.
- Montero-Moran, G. M., S. Lara-Gonzalez, L. I. Alvarez-Anorve, J. A. Plumbridge & M. L. Calcagno, (2001) On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry* 40: 10187-10196.

- Morita, T., W. El-Kazzaz, Y. Tanaka, T. Inada & H. Aiba, (2003) Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278: 15608-15614.
- Morita, T., Y. Mochizuki & H. Aiba, (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4858-4863.
- Nam, T. W., S. H. Cho, D. Shin, J. H. Kim, J. Y. Jeong, J. H. Lee, J. H. Roe, A. Peterkofsky, S. O. Kang, S. Ryu & Y. J. Seok, (2001) The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *EMBO J* 20: 491-498.
- Neidhardt, F. C., P. L. Bloch & D. F. Smith, (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* 119: 736-747.
- Oliva, G., M. R. Fontes, R. C. Garratt, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno & E. Horjales, (1995) Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. *Structure* 3: 1323-1332.
- Park, Y. H., B. R. Lee, Y. J. Seok & A. Peterkofsky, (2006) In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281: 6448-6454.
- Pas, H. H. & G. T. Robillard, (1988) S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EIIMtl. *Biochemistry* 27: 5835-5839.
- Pastan, I. & R. L. Perlman, (1969) Repression of beta-galactosidase synthesis by glucose in phosphotransferase mutants of *Escherichia coli*. Repression in the absence of glucose phosphorylation. *J Biol Chem* 244: 5836-5842.
- Plumbridge, J., (1995) Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the glmUS operon and requires two separated NagC binding sites. *EMBO J* 14: 3958-3965.
- Plumbridge, J., (1998a) Control of the expression of the manXYZ operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol* 27: 369-380.
- Plumbridge, J., (1998b) Expression of ptsG, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. *Mol Microbiol* 29: 1053-1063.
- Plumbridge, J., (1999) Expression of the phosphotransferase system both mediates and is mediated by Mlc regulation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33: 260-273.

- Plumbridge, J., (2001) Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 371-380.
- Plumbridge, J., (2009a) An alternative route for recycling of N-acetylglucosamine from peptidoglycan involves the N-acetylglucosamine phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191: 5641-5647.
- Plumbridge, J., (2009b) Regulation of carbon assimilation in bacteria. In: *The Encyclopedia of Microbiology*. M. Schaechter (ed). Elsevier, pp. 375-394.
- Plumbridge, J. & A. Kolb, (1993) DNA loop formation between Nag repressor molecules bound to its two operator sites is necessary for repression of the nag regulon of *Escherichia coli* in vivo. *Mol Microbiol* 10: 973-981.
- Plumbridge, J. & A. Kolb, (1998) DNA bending and expression of the divergent nagE-B operons. *Nucleic Acids Res* 26: 1254-1260.
- Plumbridge, J. & E. Vimr, (1999) Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 47-54.
- Plumbridge, J. A., (1989) Sequence of the nagBACD operon in *Escherichia coli* K12 and pattern of transcription within the nag regulon. *Mol Microbiol* 3: 505-515.
- Plumbridge, J. A., (1990) Induction of the nag regulon of *Escherichia coli* by N-acetylglucosamine and glucosamine: role of the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in expression of the regulon. *J Bacteriol* 172: 2728-2735.
- Plumbridge, J. A., (1991) Repression and induction of the nag regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of nagC and nagA in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* 5: 2053-2062.
- Plumbridge, J. A., O. Cochet, J. M. Souza, M. M. Altamirano, M. L. Calcagno & B. Badet, (1993) Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175: 4951-4956.
- Postma, P. W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R., (1996) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. F. C. Neidhardt (ed). Washington, DC: ASM Press, pp. 1149-1174.
- Reizer, J., S. Bachem, A. Reizer, M. Arnaud, M. H. Saier, Jr. & J. Stulke, (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): 3419-3429.

- Resch, M., E. Schiltz, F. Titgemeyer & Y. A. Muller, (2010) Insight into the induction mechanism of the GntR/HutC bacterial transcription regulator YvoA. *Nucleic Acids Res* 38: 2485-2497.
- Rigali, S., H. Nothhaft, E. E. Noens, M. Schlicht, S. Colson, M. Muller, B. Joris, H. K. Koerten, D. A. Hopwood, F. Titgemeyer & G. P. van Wezel, (2006) The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol* 61: 1237-1251.
- Rigali, S., F. Titgemeyer, S. Barends, S. Mulder, A. W. Thomae, D. A. Hopwood & G. P. van Wezel, (2008) Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep* 9: 670-675.
- Saier, M. H., Jr., (1993) Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 51: 62-68.
- Saier, M. H., Jr. & S. Roseman, (1976) Sugar transport. The *crr* mutation: its effect on repression of enzyme synthesis. *J Biol Chem* 251: 6598-6605.
- Schmalisch, M. H., S. Bachem & J. Stulke, (2003) Control of the *Bacillus subtilis* antiterminator protein GlcT by phosphorylation. Elucidation of the phosphorylation chain leading to inactivation of GlcT. *J Biol Chem* 278: 51108-51115.
- Sohanpal, B. K., S. El-Labany, M. Lahooti, J. A. Plumbridge & I. C. Blomfield, (2004) Integrated regulatory responses of *fimB* to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16322-16327.
- Stulke, J., I. Martin-Verstraete, P. Glaser & G. Rapoport, (2001) Characterization of glucose-repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of the *glcR* gene. *Arch Microbiol* 175: 441-449.
- Stulke, J., I. Martin-Verstraete, M. Zagorec, M. Rose, A. Klier & G. Rapoport, (1997) Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* 25: 65-78.
- Tanaka, Y., K. Kimata & H. Aiba, (2000) A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J* 19: 5344-5352.
- Tchieu, J. H., V. Norris, J. S. Edwards & M. H. Saier, Jr., (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 329-346.
- Vanderpool, C. K., (2007) Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress. *Curr Opin Microbiol* 10: 146-151.
- Vanderpool, C. K. & S. Gottesman, (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* 54: 1076-1089.

- Vincent, F., G. J. Davies & J. A. Brannigan, (2005) Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the NagB superfamily? *J Biol Chem* 280: 19649-19655.
- Vincent, F., D. Yates, E. Garman, G. J. Davies & J. A. Brannigan, (2004) The three-dimensional structure of the N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, NagA, from *Bacillus subtilis*: a member of the urease superfamily. *J Biol Chem* 279: 2809-2816.
- Wadler, C. S. & C. K. Vanderpool, (2007) A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20454-20459.
- Warner, J. B. & J. S. Lolkema, (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 475-490.
- Wells, L., K. Vosseller & G. W. Hart, (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol Life Sci* 60: 222-228.
- White, R. J., (1968) Control of amino sugar metabolism in *Escherichia coli* and isolation of mutants unable to degrade amino sugars. *Biochem J* 106: 847-858.
- White, R. J. & C. A. Pasternak, (1967) The purification and properties of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*. *Biochem J* 105: 121-125.
- Wilson, T. H., P. L. Yunker & C. L. Hansen, (1990) Lactose transport mutants of *Escherichia coli* resistant to inhibition by the phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta* 1029: 113-116.
- You, C., H. Lu, A. Sekowska, G. Fang, Y. Wang, A. M. Gilles & A. Danchin, (2005) The two authentic methionine aminopeptidase genes are differentially expressed in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol* 5: 57.
- Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland & D. L. Court, (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5978-5983.

Résumé

Les sucres aminés sont essentiels chez tous les organismes car ils font partie de nombreuses structures sous-cellulaires des eucaryotes et des bactéries. Les voies du métabolisme des sucres aminés n'ont pas été étudiées en détail dans d'autres organismes qu'*E.coli*. Mais l'analyse de la séquence génomique chez *B.subtilis* a identifié des gènes pouvant être impliqués dans l'utilisation de N-acétylglucosamine (GlcNAc) ou glucosamine (GlcN) dont deux transporteurs PTS (système Phospho-Transférase) homologues à *nagE* d'*E.coli* (GamP et NagP), deux copies de *nagB* codant l'enzyme GlcN-6-Phosphate (GlcN6P) désaminase (NagB et GamA) et un gène pour la GlcNAc6P désacétylase (NagA). Ces gènes se trouvent dans deux opérons (*hprK-nagAB-yvoA* et *ybgA-gamAP*) et un gène isolé pour *nagP*. Une ANR a financé notre projet intitulé « Étude et comparaison de l'utilisation des sucres aminés chez *E.coli* et chez *B.subtilis* » afin de produire une description détaillée de l'affectation des sucres aminés dans les deux espèces bactériennes divergées.

Chez *B.subtilis*, à la différence d'*E.coli*, la croissance sur GlcN est plus rapide que sur GlcNAc. Pour étudier les fonctions des gènes *nag* et *gam*, nous avons développé un système d'interruption des gènes par une cassette de résistance excisable afin d'accumuler les mutations dans plusieurs loci. Notre étude a montré que GamA est essentielle pour l'utilisation du GlcN et NagA est essentielle pour l'utilisation du GlcNAc. GamP et NagP sont nécessaires pour le transport du GlcNAc mais GamP ou PtsG (transporteur PTS pour le glucose) est suffisant pour le transport du GlcN. NagB semble avoir peu d'effet. Ces résultats étaient confirmés lors de l'étude de l'expression des gènes *nag* et *gam* par extension d'amorce, Northern blots, les fusions avec la β -galactosidase et les Western blots. Cette étude a aussi montré que les régulateurs transcriptionnels de la famille GntR, YbgA et YvoA, sont les répresseurs transcriptionnels de leurs opérons respectifs et leurs sites de fixation sont identifiés par l'empreinte à la DNaseI. La fixation d'YbgA semble sensible au GlcN6P mais la régulation par YvoA semble plus complexe.

L'opéron *gamAP* existant que chez *B. subtilis* est maintenant le mieux exprimé des gènes liés à *nag* et *gamA* est responsable de la croissance sur GlcN et en grande partie sur GlcNAc.

Mots clés : *B.subtilis*, métabolisme des sucres aminés, GlcN, GlcNAc, transporteur PTS et GlcN6P déaminase et GlcNAc6P désacétylase, répresseurs transcriptionnels.