



HAL
open science

Régulation des principaux transporteurs de glucose et leurs effets sur l'expression des gènes de virulence chez *Listeria monocytogenes*

Francine Désirée Moussan Ake

► **To cite this version:**

Francine Désirée Moussan Ake. Régulation des principaux transporteurs de glucose et leurs effets sur l'expression des gènes de virulence chez *Listeria monocytogenes*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA112047 . tel-00597741

HAL Id: tel-00597741

<https://theses.hal.science/tel-00597741>

Submitted on 1 Jun 2011

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.

MICALIS-UMR 1319 (Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé)
INRA/AgroParisTech

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI
ECOLE DOCTORALE 'GENES GENOMES CELLULES'**

SPECIALITE : MICROBIOLOGIE ET GENETIQUE MOLECULAIRE

**Présentée par :
Francine Désirée Moussan AKE**

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris-Sud XI

**Régulation des principaux transporteurs de glucose et
leurs effets sur l'expression des gènes de virulence
chez *Listeria monocytogenes***

Soutenue le 29 avril 2011, devant le jury composé de :

Mr Nicolas BAYAN
Mme Anne GALINIER
Mme Carmen BUCHRIESER
Mr Axel HARTKE
Mr Josef DEUTSCHER
Mme Eliane MILOHANIC

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Membre invité

DEDICACES

A mon père **AKE Asseu Elie**, malgré tout ce temps où tu fus malade, tu as toujours été auprès de tes enfants. Tu as été et tu resteras un bon père pour ton affection, ta compréhension, l'intérêt que tu as toujours porté à tes enfants et à leurs études. De là où tu es aujourd'hui, je sais que tu es fier de moi, de voir ta fille devenir Docteur. Reçois Papa malgré le fait que tu ne sois plus parmi nous, toute mon affection, mon amour et mon infini remerciement pour tous ce que tu as fait pour ta famille.

A ma mère **DJATCHI Assykahon Jacky**, je sais que ce travail te donnera le courage de continuer le combat que tu as toujours mené pour tes enfants. Trouve ici l'expression et le témoignage de l'immense amour que nous te portons.

REMERCIEMENTS

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes, chercheurs, parents et amis qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je voudrais remercier Mr Nicolas Bayan d'avoir accepté de présider le Jury de cette thèse. Je remercie également Mme Anne Galinier, Mme Carmen Buchrieser et Mr Axel Hartke d'avoir accepté de juger ce travail. Mes remerciements sont aussi adressés à l'Université Paris-Sud XI, à l'Ecole Doctorale « Gènes Génomes Cellules », au Directeur de l'UMR-2585 AgroParisTech-CNRS-INRA de Grignon, Mr Jean-Marie Beckerich et au Directeur de l'Unité Micalis, Mr Stéphane Aymerich.

Mes sincères remerciements sont adressés à Mr Josef Deutscher pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Aussi pour les précieux conseils et soutiens prodigués à mon égard, pour la formation scientifique que j'ai eue l'honneur de partager avec lui et particulièrement pour la confiance témoignée à mon égard me permettant de mener à bien cette thèse. Je le remercie également pour sa très grande générosité et son humanité immense envers son entourage incluant ses étudiants.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme Eliane Milohanic pour ses conseils, la connaissance acquise à ses côtés, sa contribution dévouée et compétente dans l'aboutissement de ce travail. Aussi pour sa générosité, sa sympathie et sa bonne humeur qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans des conditions plus que meilleures.

Je remercie chaleureusement toute mon équipe : Mme Sandrine Poncet pour ces conseils avisés, sa sympathie et sa gentillesse, Mr Philippe Joyet, Mme Alexa Bourand, Mme Houda Bouraoui, Mlle Jamila Nait Abdallah, Mlle Que Mai Ma Pham, pour les moments chaleureux partagés à leurs côtés.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Anne Blivet, secrétaire de l'unité pour sa gentillesse, sa sympathie et sa disponibilité, à Mr Guy Label, Mme Dénise Cintrat pour leur gentillesse, leur sympathie, pour tout le travail qu'ils réalisent, nous permettant de travailler dans de bonnes conditions et aussi pour les conseils avisés de celui que j'appelle mon grand-oncle.

Je tiens aussi à exprimer toute ma sympathie à tout le personnel de l'unité, les membres de toutes les équipes (Noémie, Jonathan, Greg, Christelle, Céline, Ramdane, Olivier, Vang...) pour les moments chaleureux que j'ai pu passer en leur compagnie. Je tiens également à remercier Mlle Philomène Kabran pour sa gentillesse et les moments chaleureux que j'ai passés à ses côtés à Grignon.

Mes sincères remerciements sont également adressés à Mlle Amandine Cornu et à Mr Kimsé Moussa pour leur aide dans la rédaction de ce document.

Je voudrais plus particulièrement dire un grand merci à mes parents, ma famille, à mon fiancé Mr Coulibaly Somo Paul pour son aide très précieuse dans la rédaction de cette thèse, pour son soutien, ses encouragements et plus particulièrement sa présence à mes côtés qui m'ont permis de tenir si loin de ma famille afin de terminer cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent à celle qui est devenue une sœur pour moi, Béatrice Manzan épouse Dadié, à son époux Mr Elogne Dadié pour leurs soutiens indéfinis ; à Mr Narciss Niamké et son épouse, à mon frère Saturnin Nioulé et son épouse, à mon ami et frère Mr Stéphane Tribouillet, pour leur aide, leur soutien moral et leurs encouragements. Mes sincères remerciements à tous mes amis (Alain Gbagbo, Hortense Kouassi, Alec Agbokanou ...) et aux personnes qui ont participé d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

Que toutes les personnes que j'aurais oubliées de citer trouvent dans ce paragraphe ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6

Partie A : *Listeria monocytogenes* et les facteurs de virulence 7

I- Historique, Taxonomie et caractères bactériologiques 7

I-1- Historique et Taxonomie 7

I-2- Caractères bactériologiques 8

II- Listériose humaine et cycle infectieux 9

II-1- Listériose humaine 9

II-2- Cycle infectieux 9

II-2-1- Cycle infectieux *in vivo* 9

II-2-2- Cycle infectieux *in vitro* et les facteurs impliqués 11

II-2-2-1- Entrée dans les cellules 12

II-2-2-2- Lyse de la vacuole de phagocytose 16

II-2-2-3- Multiplication et motilité intracellulaire 17

II-2-2-4- Passage de cellule à cellule 18

III- Régulation de la virulence 20

III-1- Le régulon PrfA 20

III-1-1- Caractéristiques du régulateur PrfA 21

III-1-2- Régulation transcriptionnelle PrfA-dépendante 24

III-1-2- Régulation liée aux facteurs environnementaux 26

III-1-3-1- La température 26

III-1-3-2- Conditions de stress 27

III-1-3-3- Régulation liée au milieu BHI et au charbon actif 28

III-1-3-4- Métabolisme du carbone et virulence 29

PARTIE B : Système Phosphoenolpyruvate carbohydate Phosphotransferase (PTS) 34

I- Historique et définition du PTS 34

II- Organisation du PTS et description des différents composants 34

II-1- Enzymes générales du PTS 36

II-1-1- L'enzyme I 37

II-1-2- L'HPr 38

II-2- Les enzymes spécifiques du PTS 40

II-3- Régulation de l'expression des gènes *pts* 41

III- Systèmes de transport chez les micro-organismes 46

III-1- Systèmes de transport de glucose	47
III-1-1- Transporteurs PTS spécifiques de glucose chez <i>L. monocytogenes</i>	49
III-1-2- Transporteurs non-PTS de glucose chez <i>L. monocytogenes</i>	52
IV- Fonctions régulatrices du PTS	54
IV-1- Enzyme I	55
IV-2- La protéine HPr	56
IV-2-1- P~His-HPr	56
a- Régulation de la glycérol kinase	56
b- Régulation des antiterminateurs	57
c- Régulation des activateurs transcriptionnels	58
IV-2-2- P-Ser-HPr	62
a- Rôle dans le transport de sucre via le PTS	63
b- Rôle dans la répression catabolique	63
c- Rôle dans l'exclusion d'inducteur	65
IV-3- Enzyme II (EII)	66
V- Relation entre PTS et virulence	68
MATERIELS ET METHODES	72
I- Souches et milieux de culture	73
I-1- Souches	73
I-2- Plasmides ou vecteurs utilisés	73
I-3- Milieux de culture et croissance des souches	76
I-4- Conservation des souches	78
II- Méthodes concernant le matériel génétique	78
II-1- Technique concernant l'ADN	78
II-1-1- Extraction de l'ADN chromosomique de <i>L. monocytogenes</i>	78
II-1-2- Extraction d'ADN plasmidique	79
II-1-3- Amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction)	79
II-1-4- PCR 3 brins	80
II-1-5- Electrophorèse de l'ADN	81
II-1-6- Purification de l'ADN	81
II-1-7- Digestion et ligature	82
II-1-8- Construction des mutants	82
II-2- Technique concernant l'ARN	86
II-2-1- Extraction de l'ARN de <i>L. monocytogenes</i>	86
II-2-2- Analyse de la qualité de l'ARN	87

II-2-3- Traitement à la DNase de l'ARN	87
II-2-4- Vérification par PCR de L'ARN traité	87
II-2-5- Reverse Transcription (RT) de L'ARN	88
II-2-6- Quantitative PCR (qPCR)	88
III- Méthodes concernant les cellules	90
III-1- Préparation de cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	90
III-1-1- Préparation des cellules électrocompétentes	90
III-1-2- Préparation des cellules thermocompétentes	91
III-2- Transformation des cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	91
III-2-1- Transformation par choc électrique	91
III-2-2- Transformation par choc thermique	92
III-3- Préparation de cellules électrocompétentes de <i>Listeria</i>	92
III-4- Transformation des cellules compétentes de <i>Listeria</i> par choc électrique	93
III-5- Transformation par conjugaison	93
IV- Méthodes de criblage des transformants ou mutants	94
IV-1- Résistance aux antibiotiques	94
IV-2- Test de criblage bleu/blanc	95
IV-3- Vérification des clones par PCR	95
IV-4- Vérification des clones par séquençage	96
V- Analyse phénotypique des mutants	96
V-1- Croissance des souches	96
V-2- Dosage de l'activité β -glucuronidase	97
V-3- Test de consommation de glucose	98
V-4- Test de complémentation hétérologue : transport de glucose	98
VI- Méthodes concernant les protéines	99
VI-1- Extraction de protéines	99
VI-2- Cross-linking <i>in vivo</i>	100
VI-3- Purification des protéines avec des colonnes « streptactin »	100
VI-4- Dosage des protéines par la méthode de Bradford	101
VI-5- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS	101
VI-6- Coloration des gels au bleu de Coomassie	102
VI-7- Western blot	102
RESULTATS	104
CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	105
I- Présentation de l'article	108
I-1- Caractérisation des transporteurs PTS et non-PTS de glucose	108

I-2- Régulation des opérons <i>man</i> et <i>mpo</i>	109
I-3- Effets des mutations PTS dans la régulation de PrfA	110
II- Résultats supplémentaires	153
II-1- Analyse phénotypique des mutants	153
II-1-1- Inactivation du gène <i>ptsI</i>	153
II-1-2- Inactivation du PTS glucose/mannose, PTS ^{Mpo}	155
II-1-3- Identification d'un troisième transporteur non-PTS de glucose	156
II-2- Modulation de l'activité de PrfA par les PTS ^{Man} et PTS ^{Mpo} en présence de mannose et de fructose	158
II-3- Effets des mutations PTS sur l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (<i>actA</i> et <i>hly</i>)	160
II-4- Rôle dans la virulence	162
DISCUSSION GENERALE	166
1-Transporteurs PTS ^{Man} et PTS ^{Mpo}	167
2- Régulation de l'opéron <i>man</i> et <i>mpo</i>	169
3- Inactivation du gène <i>ptsI</i> et les transporteurs non-PTS de glucose	172
4- Effets des transporteurs PTS et non-PTS sur l'activité de PrfA	173
5- Rôle des mutations PTS dans la virulence	178
CONCLUSION-PERSPECTIVES	179
ANNEXES	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	194

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE A : LISTERIA MONOCYTOGENES ET LES FACTEURS DE VIRULENCE

I- Historique, Taxonomie et caractères bactériologiques

I-1- Historique et Taxonomie

Listeria monocytogenes fut isolée pour la première fois en juillet 1924 lors d'une épidémie chez des lapins et des cobayes de laboratoire (Murray *et al.*, 1926). Murray décrit le germe responsable de cette épizootie comme étant l'agent responsable d'une augmentation anormale du taux de monocytes chez les animaux malades et ce germe fut ainsi nommé *Bacterium monocytogenes* (Murray *et al.*, 1926). Pirie identifia la même bactérie en Afrique du sud dans le foie des rongeurs et proposa un mode de contamination probablement oral. Il la renomma alors *Listerella hepatolytica*, *Listerella* en l'honneur du chirurgien anglais Lord Joseph Lister (pionnier de l'antiseptique) et hepatolytica en référence à la pathologie qui affectait le foie des rongeurs (Pirie, 1927). Il proposa en 1940 le nom de *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* fut pendant longtemps considérée comme un agent de zoonose. L'isolement de cette bactérie chez des patients a permis de montrer que *L. monocytogenes* peut directement infecter l'homme (Seeliger, 1955). Le genre *Listeria* a été considéré proche des corynébactéries sur la base de quelques caractères morphologiques. Des études taxonomiques et de séquençage de l'ARNr 16S ont montré que le genre *Listeria* appartient au phylum des firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des bacillales. Aujourd'hui, le genre *Listeria* regroupe huit espèces : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b), *L. marthii* et *L. rocourtiae* (Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010). Les espèces *L. marthii* et *L. rocourtiae* ont été récemment identifiées et sont non pathogènes. Seules les espèces *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes. *L. monocytogenes* est un pathogène de l'homme et des animaux et *L. ivanovii*, un pathogène des animaux (ruminants). *L. seeligeri* identifiée comme une espèce non pathogène, possède néanmoins le locus principal de virulence contenant le gène codant pour le régulateur transcriptionnel des gènes de virulence chez *L. monocytogenes* (*prfA*) et les gènes de virulence dont *hly*. L'introduction des gènes *prfA* ou *hly* de *L. seeligeri* dans des mutants appropriés de *L. monocytogenes* ne

synthétisant pas les protéines PrfA ou Hly restaure la pathogénicité chez ces souches (Stelling *et al.*, 2010).

I-2- Caractères bactériologiques

L. monocytogenes est un bacille à Gram positif à « bas GC », aéro-anaérobie facultatif, mobile car présente des flagelles péritriches, non capsulé, non sporulant. Elle est immobile à 37°C et mobile à 22°C sous l'action de ses flagelles. C'est une bactérie répandue dans l'environnement et peut être isolée à partir du sol, de l'eau et des plantes. Elle peut également être isolée à partir des selles de nombreuses espèces animales. Elle croît facilement sur des milieux pouvant contenir jusqu'à 20% de sels (McClure *et al.*, 1991). Sa température de croissance est comprise entre 1 et 45°C avec un optimum compris entre 30 et 37°C. Elle survit dans des milieux dont le pH varie entre 5 et 9 avec un pH optimal de 7 (McClure *et al.*, 1991). Elle se présente sous forme de petites colonies, lisses, à bord réguliers et transparentes. Une zone d'hémolyse β est couramment observée sur gélose au sang. C'est une bactérie catalase positive, fermentant le glucose et l'esculine sans produire du gaz. Les caractères fermentaires des sucres permettant de distinguer quelques espèces du genre *Listeria* sont mentionnés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractères bactériologiques différenciant quelques espèces de *Listeria* (+ : positif ; - : négatif) (Lecuit and Cossart, 2001).

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

*Staphylococcus aureus ; **Rhodococcus equi

II- Listériose humaine et cycle infectieux

II-1- Listériose humaine

Pendant de nombreuses années, la listériose a été considérée comme étant une maladie qui touche surtout les animaux, même si des cas sporadiques étaient décrits chez l'homme. Dans les années 80, l'apparition d'épidémie de listériose chez l'homme a permis d'incriminer l'alimentation comme source de contamination et il fut conclu officiellement que *L. monocytogenes* est un pathogène d'origine alimentaire (Jacquet *et al.*, 1999; Rocourt and Bille, 1997). En France, 97% des cas de listériose humaine sont provoqués par les serotypes 1/2a, 1/2b et 4b sur les 13 serotypes que compte *L. monocytogenes* (Jacquet *et al.*, 1999). *L. monocytogenes* touche majoritairement des sujets immunodéprimés, les personnes âgées et des femmes enceintes, avec un taux de mortalité autour de 30% sans traitement antibiotique (Farber and Peterkin, 1991). Deux formes cliniques sont couramment rencontrées : la listériose périnatale et la listériose chez l'adulte. Les symptômes couramment observés sont des méningites, des méningo-encéphalites, des septicémies, des avortements et des infections périnatales (Aureli *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 1997). Les autres symptômes souvent observés sont la fièvre, la diarrhée, les maux de tête, des nausées, des vomissements, des douleurs articulaires et musculaires (Barbuddhe and Chakraborty, 2009).

II-2- Cycle infectieux

II-2-1- Cycle infectieux *in vivo*

Des études menées sur différents modèles animaux (la gerbille, le rat, le cobaye et la souris) ont permis d'envisager un modèle d'infection animale (Figure 1). La consommation d'aliments contaminés est considérée comme étant la première étape d'infection. *L. monocytogenes* est capable de survivre en s'adaptant à différents stress comme le lysozyme de la salive, l'acidité de l'estomac, la forte osmolarité et la basse pression en oxygène de l'intestin et des tissus (Gahan and Hill, 2000). Une grande partie des bactéries ingérées avec le bol alimentaire est détruite par l'acidité stomacale. Cependant, *L. monocytogenes* améliore sa survie dans l'estomac grâce à la glutamate décarboxylase qui permet de limiter les effets de l'acidité gastrique en éliminant une partie des protons (Cotter *et al.*, 2001). *L. monocytogenes*

est une bactérie capable d'envahir les cellules non phagocytaires telles que les cellules épithéliales. Cette propriété lui permet de franchir la barrière de l'épithélium intestinal de l'hôte infecté probablement par invasion enterocytaire ou indirectement par la pénétration au niveau des plaques de Peyer (Barbuddhe and Chakraborty, 2009; Lecuit *et al.*, 2001). Après la traversée de l'épithélium intestinal, les bactéries prolifèrent ensuite au niveau des plaques de Peyer où elles vont coloniser les cellules dendritiques. Ces cellules phagocytaires permettraient à *L. monocytogenes* d'être véhiculée jusqu'aux ganglions mésentériques qui disséminent *L. monocytogenes* dans la circulation lymphatique en colonisant des phagocytes tels que les neutrophiles ou les monocytes (Drevets, 1999; Pron *et al.*, 2001). La dissémination de *L. monocytogenes* aux tissus endothéliaux est réalisée sous l'action des phagocytes infectés et ceci faciliterait ainsi l'invasion d'organes tels que la rate et le foie qui sont les principaux organes cibles (Figure 1) (Drevets, 1999). *L. monocytogenes* se développe particulièrement dans les hépatocytes et elle peut gagner le système nerveux lors d'une seconde étape de dissémination.

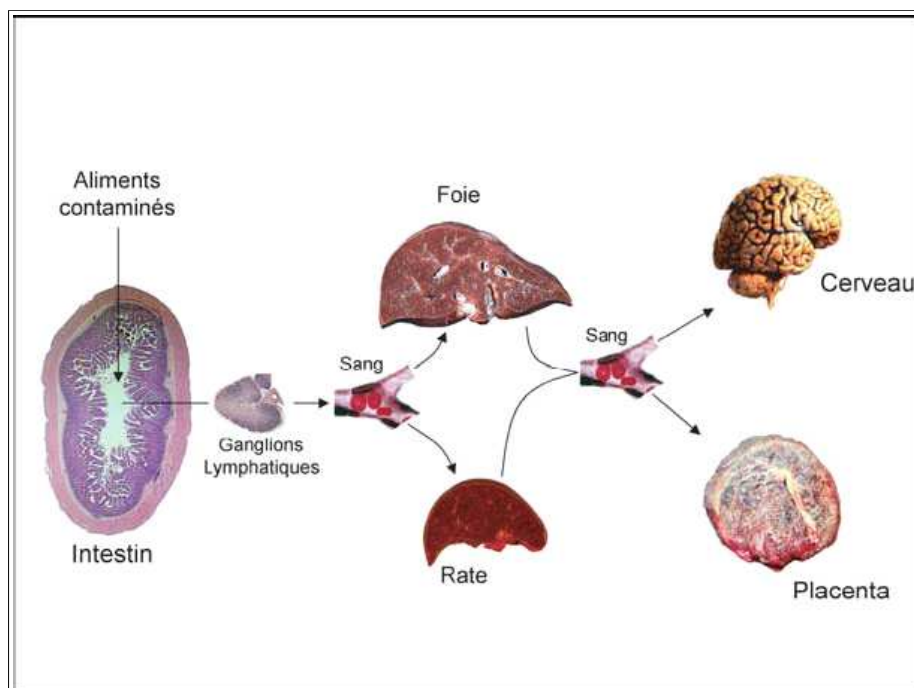


Figure 1: Modèle d'infection *in vivo* par *L. monocytogenes* (D'après Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

II-2-2- Cycle infectieux *in vitro* et les facteurs impliqués

L. monocytogenes a la capacité d'entrer dans des cellules phagocytaires (macrophages) et non phagocytaires (cellules épithéliales, hépatocytaires, endothéliales). Ce sujet a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis d'établir un modèle d'infection *in vitro* (Figure 2). Ce cycle infectieux fait intervenir différents facteurs et est regroupé en 4 étapes :

- 1- Entrée dans les cellules
- 2- Lyse de la vacuole de phagocytose
- 3- Multiplication et motilité intracellulaire
- 4- Passage de cellule à cellule

Ces différentes étapes et les facteurs impliqués sont détaillés ci après.

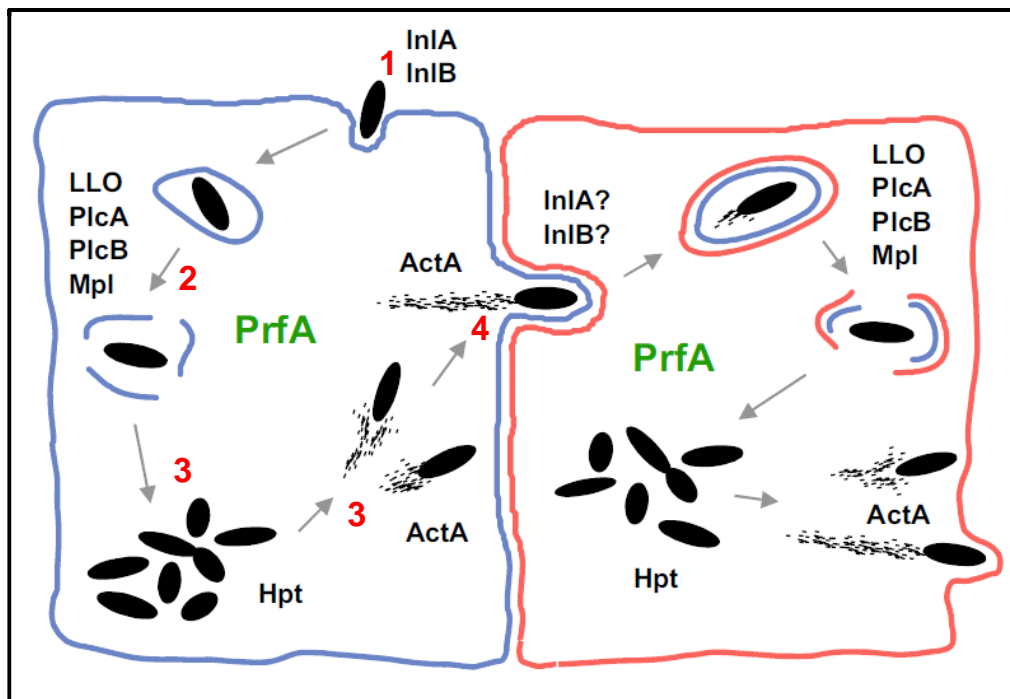


Figure 2 : Modèle d'infection *in vitro* par *L. monocytogenes* et principaux facteurs bactériens impliqués (D'après Scortti *et al.*, 2007).

La bactérie pénètre dans la cellule par invagination membranaire sous l'action de InlA et InlB principalement et va se retrouver dans une vacuole de phagocytose. Suite aux conditions défavorables dans cette vacuole, elle va lyser la membrane de celle-ci sous l'action de LLO, PlcA, PlcB et Mpl. Elle va proliférer en utilisant différentes protéines dont Hpt pour le transport de ces nutriments et se déplacer en polymérisant l'actine cellulaire sous l'action de la protéine bactérienne ActA. Elle va s'invaginer dans la membrane d'une cellule voisine lorsqu'elle est au contact de celle-ci et entamer un nouveau cycle de vie.

II-2-2-1- Entrée dans les cellules

L. monocytogenes adhère aux cellules via plusieurs interactions directes entre un ligand bactérien et un récepteur cellulaire en provoquant sa propre phagocytose selon le mécanisme dit de « fermeture éclair » ou de « Zipper » préalablement proposé pour *Yersinia pseudotuberculosis* par Isberg en 1991 (Isberg, 1991; Mengaud *et al.*, 1996). L'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires est principalement permise grâce à deux protéines de surface InlA et InlB (Internaline A et B). D'autres protéines sont également impliquées dans l'entrée de la bactérie dans les cellules.

- Les internalines (InlA et InlB)

Jean Louis Gaillard isolait en 1991, des mutants de *L. monocytogenes* incapables d'envahir les cellules épithéliales Caco-2 (Cellules de carcinome colique humain). L'analyse génétique des mutants a révélé l'insertion d'un transposon en amont de deux phases ouvertes de lecture codant les gènes *inlA* et *inlB* organisés en opéron (Figure 3). La complémentation en trans par un plasmide exprimant *inlA* a permis de confirmer que le gène *inlA* est impliqué dans l'invasion des cellules Caco-2 par *L. monocytogenes*. L'expression d'*inlA* chez la bactérie non invasive *L. innocua* suffit à promouvoir l'invasion de cette bactérie dans les cellules Caco-2 (Gaillard *et al.*, 1991).

Le gène *inlA* code pour InlA, une protéine de 800 acides aminés qui est organisée en plusieurs domaines fonctionnels (Figure 4) : un peptide signal, une région de 15 répétitions de 22 acides aminés riche en leucine (LRR), une région inter-répétitions (IR), une région de deux fois 70 acides aminés et de 49 acides aminés (« répétition B ») et un domaine C-terminal contenant le motif LPTXG. InlA est une protéine de surface ancrée de manière covalente à la paroi bactérienne par un motif LPXTG situé dans la partie C-terminale de la protéine (Lebrun *et al.*, 1996). Le récepteur cellulaire eucaryote de InlA est la E-cadhérine, une molécule des jonctions adhérentes, présente au niveau de nombreuses barrières telles que les barrières intestinales et feto-placentaires (Ireton, 2007; Mengaud *et al.*, 1996; Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006). Il a été montré que l'interaction InlA/E-cadhérine est critique pour la traversée de ces barrières par *L. monocytogenes* et est aussi très spécifique de l'hôte (Lecuit *et al.*, 2001; Lecuit *et al.*, 2004). En effet InlA peut se fixer à la E-Cadhérine humaine, du cobaye et de la gerbille mais pas sur la E-Cadhérine murine (Cossart *et al.*, 1989; Disson *et al.*, 2008; Lecuit *et al.*, 2001).

InlB est une protéine de 630 acides aminés codée par le gène *inlB* situé sur l'opéron *inlAB* en aval du gène *inlA* (Figure 3). InlB est composée de plusieurs domaines fonctionnels présentant des similitudes avec les domaines d'InlA (Figure 4) : un peptide signal, un domaine contenant 8 répétitions de 22 acides aminés riches en leucine (LRR), un domaine inter-répétition (IR), une « répétition B » et un domaine C-terminal de 232 acides aminés. Ce domaine C-terminal est constitué de motifs répétés de 80 acides aminés environ, commençant par le di-peptide GW (modules GW) (Braun *et al.*, 1997) nécessaire à l'encrement de la protéine à la surface bactérienne. *In vivo*, dans un modèle murin, des bactéries ne synthétisant pas de protéine InlB sont moins virulentes et se développent moins efficacement dans le foie et la rate que la souche sauvage isogénique (Khelef *et al.*, 2006; Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006). La protéine InlB se fixe sur le récepteur cellulaire majeur Met ou RTK (Receptor tyrosine Kinase) qui a comme ligand HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Shen *et al.*, 2000). InlB détourne ainsi les fonctions de l'hôte pour permettre l'endocytose du récepteur Met et l'internalisation de *L. monocytogenes* dans les cellules épithéliales non polarisées (Chiba *et al.*, 2011; Pentecost *et al.*, 2010; Veiga and Cossart, 2005).

InlA et InlB appartiennent à une grande famille de protéines, la famille des internalines, composée de 25 protéines partageant une structure commune : un peptide-signal à l'extrémité N-terminale et des motifs « leucine-rich repeats (LRR) » (Bierne *et al.*, 2007). Les internalines ne seraient seulement pas impliquées dans l'entrée dans les cellules mais pourraient intervenir à d'autres stades du processus infectieux (Gouin *et al.*, 2010).

La protéine InlC codée par le gène *inlC* appartient à la famille des internalines. Elle serait impliquée dans la virulence de *L. monocytogenes* car un mutant ne synthétisant pas de protéine InlC entraîne une diminution de la virulence dans la souris (Engelbrecht *et al.*, 1996). Des études ont également montré que InlC est nécessaire pour le passage de *L. monocytogenes* de cellule à cellule dans des cellules polarisées en jouant un rôle dans la formation de protrusions membranaires (Rajabian *et al.*, 2009). Gouin et ses collaborateurs ont aussi montré que InlC interfère avec la réponse immunitaire de l'hôte (Gouin *et al.*, 2010).

Des protéines appartenant à la famille des internalines, InlB1, InlB2, InlE, InlF, InlG, InlH, InlK, InlJ, InlL, InlI ont été identifiées et les gènes qui codent pour ces différentes protéines sont situés sur un îlot de pathogénicité appelé LIPI-2 retrouvé probablement, que chez la souche pathogène des ruminants, *L. ivanovii* (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b). InlH et InlJ sont cependant identifiées chez *L. monocytogenes*. InlH est une protéine de surface induite par le stress. Elle intervient dans l'infection par *L. monocytogenes* dans les tissus en modulant la réponse inflammatoire de l'hôte (Personnic

et al., 2010). InlJ est une protéine de surface qui intervient dans l'adhésion de *L. monocytogenes* à la cellule hôte durant l'infection *in vivo* (Sabet et al., 2008).

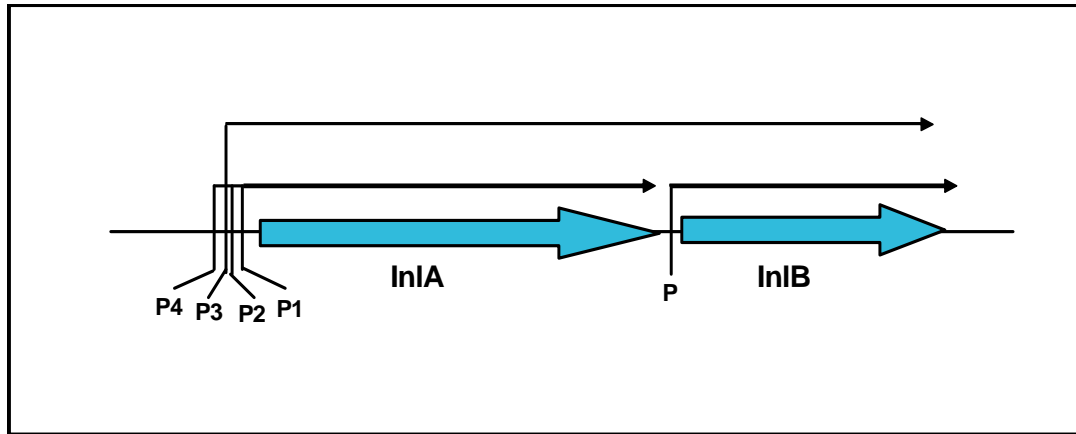


Figure 3 : Organisation transcriptionnelle de l'opéron *inlAB* (D'après Lingnau et al., 1995).

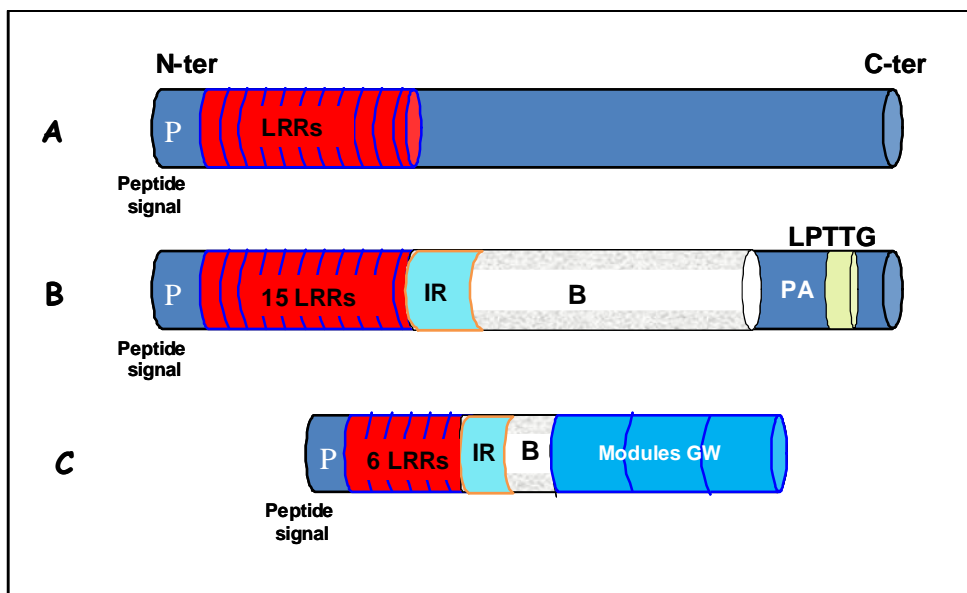


Figure 4 : Représentation schématique des internalines InlA et InlB.

A : représentation générale des internalines.

B : Représentation de InlA.

C : représentation de InlB.

LRRs : région de répétition riches en leucine ; IR : région inter-répétitions ; B : régions des répétitions ; PA : région de pré-ancrage ; LPTTG : signal d'ancrage à la surface ; GW : module GW associé à la surface.

- Autres facteurs impliqués dans l'entrée dans les cellules

- La protéine Ami : c'est une autolysine de 102 kDa qui intervient dans l'adhésion de *L. monocytogenes* aux cellules hôtes. En effet des mutants n'exprimant plus de protéine Ami étaient très affectés dans l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte (Milohanic *et al.*, 2001).
- La protéine P60 : c'est une protéine de 60 kDa codée par le gène *iap* (invasion-associated protein). Elle a une activité muréine hydrolase essentielle à la multiplication bactérienne et est produite en quantité importante dans les souches invasives de *L. monocytogenes*. Les mutants ne synthétisant pas cette protéine se présentent sous forme de chaînettes et sont moins invasifs dans les fibroblastes (Kuhn and Goebel, 1989; Wuenscher *et al.*, 1993).
- La protéine FpbA (Fibronectin Binding protein A) : c'est une protéine de surface de 55,3 kDa comprenant 570 acides aminés, qui est capable de se lier à la fibronectine permettant une adhésion de *L. monocytogenes* à la cellule hôte. La FbpA modulerait le taux d'expression des gènes de virulence, *inlB* et *hly*. Cette protéine est aussi requise pour la colonisation de *L. monocytogenes* dans l'intestin et dans le foie des souris (Dramsi *et al.*, 2004).
- La protéine Vip « virulence protein » : c'est une protéine de surface de 43 kDa comprenant 339 acides aminés. Elle est absente dans les espèces non pathogènes de *Listeria* et présente dans la plupart des souches de *L. monocytogenes* à l'exception des sérovars 4a et 4c. La protéine Vip serait requise pour l'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules et est impliquée dans l'infection *in vivo* (Cabanès *et al.*, 2005).
- La protéine LapB « *Listeria* adhésion protein B » : c'est une protéine de surface comprenant 1711 acides aminés. Elle est impliquée dans l'adhésion de *L. monocytogenes* à la cellule hôte et aussi dans l'invasion cellulaire. Elle est absente dans les espèces non pathogènes de *Listeria* et présente dans la plupart des souches de *L. monocytogenes* à l'exception des sérovars 4a et 4c (Reis *et al.*, 2010).
- La protéine Auto : c'est une protéine de surface comprenant 572 acides aminés. Elle est présente chez *L. monocytogenes* et absente chez *L. innocua*. La protéine Auto serait requise pour l'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires et contribue à la virulence *in vivo* (Cabanès *et al.*, 2004).

II-2-2-2- Lyse de la vacuole de phagocytose

Après son entrée dans la cellule hôte, *L. monocytogenes* se trouve dans une vacuole de phagocytose dans laquelle, elle est exposée à l'acidité du phagosome et à la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote qui pourraient endommager les protéines, les lipides de la membrane et aussi l'ADN de *L. monocytogenes* (Miller and Britigan, 1997). Elle va donc s'échapper de la vacuole de phagocytose en lysant la membrane de celle-ci sous l'action de la listeriolysine O (LLO, codée par le gène *hly*) couplée aux phospholipases C (Camilli *et al.*, 1993; Gaillard *et al.*, 1987; Mengaud *et al.*, 1987).

- La listeriolysine O

La lyse de la membrane de phagocytose est principalement due à l'action de la LLO. C'est une protéine de 58 kDa qui appartient à la famille des hémolysines cholestérol-dépendantes et qui est similaire à la streptolysine O produite par *Streptococcus pyogenes*. L'une de ses caractéristiques majeures est son activité optimale à pH 5,5 et une bonne activité à des pH compris entre 4,5 et 6,5 (Geoffroy *et al.*, 1987), ce qui est en accord avec le bas pH présent dans les phagosomes (Vergne *et al.*, 1998). La LLO est un facteur clé dans la virulence de *L. monocytogenes* car les mutants ne synthétisant pas de LLO sont non hémolytiques et non virulents dans la souris (Cossart *et al.*, 1989).

Une autre protéine hémolytique a été identifiée chez *L. monocytogenes*, la listeriolysine S (LLS). C'est une protéine retrouvée dans des souches très virulentes de *L. monocytogenes* en plus de la listeriolysine O. Elle est codée par le gène *llsA* et appartient à la famille des streptolysines produite par *Streptococcus pyogenes*. Le gène *llsA* forme le locus LIPI-3 avec d'autres gènes *lls* (codant pour les protéines permettant la maturation de la LLS et pour des ABC transporteurs) (Cotter *et al.*, 2008).

- Les phospholipases C et la métalloprotéase

La rupture de la membrane du phagosome est facilitée par l'action des phospholipases C. Les souches pathogènes de *Listeria* produisent trois enzymes avec une activité phospholipase C impliquées dans la virulence. Deux sont présentes chez *L. monocytogenes* et la troisième est seulement présente chez l'autre souche pathogène, *L. ivanovii* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001b). Les deux phospholipases C présentent chez *L. monocytogenes* sont la

phosphatidyl-inositol phospholipase C (PI-PLC) et phosphatidyl-choline phospholipase C (PC-PLC appelée aussi lécithinase) codées respectivement par les gènes *plcA* et *plcB*. La PI-PLC est une protéine de 33 kDa dont la spécificité pour la phosphatidyl-inositol est optimale à des pH compris entre 5,5 et 6,5. La lécithinase est une protéine de 29 kDa avec une activité optimale à des valeurs de pH compris entre 5,5 et 8. Des mutants ne synthétisant plus la PI-PLC ou la PC-PLC ou les deux protéines à la fois seraient incapables de s'échapper de la vacuole de phagocytose (Portnoy *et al.*, 2002). La phospholipase C est synthétisée sous forme de précurseur immature qui doit être clivé pour engendrer la phospholipase active. La métalloprotéase Mpl (codée par le gène *mpl*) est une protéine de 35 kDa qui intervient dans la maturation de la PI-PLC. Elle serait également capable de dégrader l'actine cellulaire et ceci pourrait favoriser la croissance de *Listeria in Vitro* (Coffey *et al.*, 2000).

II-2-2-3- Multiplication et motilité intracellulaire

Après la lyse de la membrane du phagosome, *L. monocytogenes* se retrouve libre dans le cytoplasme de l'hôte où elle est capable de se multiplier et de se mouvoir. Elle va alors utiliser différentes protéines tels que les transporteurs des hexoses phosphates (Hpt), du glycérol, de la dihydroxyacétone pour sa prolifération (Chico-Calero *et al.*, 2002; Eylert *et al.*, 2008) et aussi polymériser l'actine cellulaire sous l'action de la protéine bactérienne ActA. La polymérisation d'actine permettra ainsi à la bactérie d'être mobile, de se déplacer dans le cytoplasme et d'envahir les cellules voisines (Kocks *et al.*, 1992).

- Les protéines : ActA et Hpt

La polymérisation de l'actine cellulaire est réalisée grâce à la protéine bactérienne ActA. C'est une protéine composée de 610 acides aminés et codée par le gène *actA*. Des mutants incapables de synthétiser la protéine ActA sont invasifs, aptes à lyser la vacuole mais ne sont pas mobiles afin de coloniser les cellules adjacentes. La multiplication de ces mutants conduit ainsi à la formation de micro-colonies dans le cytosol de l'hôte. Un mutant incapable de synthétiser la protéine ActA est également beaucoup moins virulent dans le modèle d'infection de la souris (Domann *et al.*, 1992; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b). ActA serait aussi impliquée dans la lyse du phagosome (Poussin and Goldfine, 2010). La capacité de

L. monocytogenes à être très mobile en se déplaçant dans la cellule hôte et à coloniser les cellules voisines est un facteur déterminant de la virulence de cette bactérie.

Hpt est une protéine de 461 acides aminés codée par le gène *hpt*. Elle permet le transport des hexoses phosphates qui sont des nutriments nécessaires pour la prolifération de *L. monocytogenes* dans l'hôte. Un mutant ne synthétisant pas de protéine Hpt montre une moindre prolifération dans le cytosol de l'hôte et une atténuation de la virulence chez la souris (Chico-Calero *et al.*, 2002).

II-2-2-4- Passage de cellule à cellule

Lorsque, *L. monocytogenes* rencontre la membrane cytoplasmique, elle est capable de pousser la membrane et de former une invagination membranaire la permettant d'être internalisée dans une cellule voisine (Figure 2). *L. monocytogenes* est alors entourée par une double membrane qu'elle lyse à nouveau pour entamer un nouveau cycle infectieux. La lyse de la double membrane est également réalisée sous l'action de la LLO couplée aux phospholipases C. Elle va aussi utiliser la Mpl pour la maturation de la PI-PLC (Gedde *et al.*, 2000; Portnoy *et al.*, 2002; Scotti *et al.*, 2007). Elle se retrouve alors libre dans le cytoplasme et peut entamer un nouveau cycle infectieux en utilisant les différentes protéines, actA et Hpt. Le processus d'invasion cellulaire est schématisé dans la figure 2.

Des mutants de *L. monocytogenes* ne synthétisant pas de InlA, de InlB, d'ActA ou de LLO sont des souches avirulentes dans un modèle d'infection *in vivo* que *in vitro* (Camilli *et al.*, 1993; Cossart *et al.*, 1989; Domann *et al.*, 1992). L'ensemble des facteurs de virulence impliqués dans ce cycle infectieux est sous le contrôle de l'activateur transcriptionnel PrfA.

Différents facteurs impliqués dans la virulence de *L. monocytogenes* sont mentionnés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Gènes impliqués dans la virulence de *L. monocytogenes*.

Gènes impliqués dans la virulence de <i>L. monocytogenes</i>
1- Locus de virulence <i>prfA</i> : code pour l'activateur transcriptionnel des gènes de virulence <i>plcA</i> : code pour la PI-PLC permettant la lyse de la vacuole de phagocytose <i>hly</i> : code pour la lystériolysine permettant la lyse de la vacuole de phagocytose <i>mpl</i> : code pour une métaloprotéase impliquée dans la lyse de la vacuole de phagocytose <i>actA</i> : code pour la protéine bactérienne ActA permettant la polymérisation de l'actine cellulaire <i>plcB</i> : code pour la PC-PLC permettant la lyse de la membrane de la vacuole de phagocytose
2- l'opéron <i>inlAB</i> : codant pour les internalines InlA et InlB permettant l'entrée de la bactérie dans les cellules non phagocytaires
3- <i>hpt</i> : code pour les transporteurs des hexoses phosphates nécessaires à la prolifération de la bactérie dans le cytosol de l'hôte
4- <i>llsA</i> : code pour la listériolysine S retrouvée dans des souches virulentes de <i>L. monocytogenes</i>
5- <i>iap</i> : code pour la protéine p60 impliquée dans la division cellulaire
6- <i>ami</i> : code pour une autolysine qui contribue à l'adhésion de <i>L. monocytogenes</i> aux cellules
7- <i>inlC</i> : code pour une internaline intervenant dans l'entrée de la bactérie dans l'hôte
8- <i>clpC</i> : code pour une ATPase de type ClpC, protéine de stress impliquée dans la survie intracellulaire
9- <i>clpE</i> : code pour une protéine impliquée dans la division cellulaire
10- <i>dal</i> : code pour une alanine-racémase qui catalyse la synthèse de la D-alanine à partir de la L-alanine et qui est requise pour la synthèse du mucopeptide de la paroi bactérienne
11- <i>dat</i> : code pour une D-amino acide aminotransférase qui catalyse la synthèse de la D-alanine à partir de D-glutamate et pyruvate et qui est requise pour la synthèse du mucopeptide de la paroi bactérienne
13- <i>arpJ</i> : code pour un ABC transporteur de l'arginine
14- <i>lisRK</i> : code pour un système à deux composants impliqué dans la tolérance à l'acide et à l'éthanol
15- <i>fbpA</i> : code pour la protéine FbpA impliquée dans l'adhésion aux cellules et aussi dans l'invasion de la rate et du foie
16- <i>bsh</i> : code pour la protéine Bsh qui permet l'hydrolyse des sels biliaires
17- <i>bvrABC</i> : code pour un antitermateur de la famille BglG (<i>bvrA</i>), une perméase de type II spécifique du β -glucoside du système phosphoenolpyruvate-sucre phosphotransferase (<i>bvrB</i>), une putative ADP-ribosylglycohydrolase (<i>bvrC</i>). L'inactivation de <i>bvrA</i> entraîne une perte de la répression de la transcription des gènes de virulence en présence du cellobiose.
18- <i>lntA</i> : code pour la protéine LntA (<i>Listeria</i> nuclear targeted protein A) qui interfère dans la réponse immune de l'hôte.

III- Régulation de la virulence

L. monocytogenes est une bactérie saprophyte, capable de coloniser différents micro-environnements parfois non propices à sa croissance et où elle est confrontée à différents types de stress. Chez l'hôte, *L. monocytogenes* est capable de survivre et de se multiplier en s'adaptant à différents stress comme la disponibilité des nutriments, le pH (le lysozyme de la salive, l'acidité de l'estomac), la forte osmolarité et la basse pression en oxygène de l'intestin et des tissus (Gahan and Hill, 2000). *L. monocytogenes* synthétise alors différents facteurs de virulence qui lui permettent de survivre dans les différents environnements qu'elle colonise. Ces facteurs de virulence sont entre autres, la protéine Bsh (protéine permettant l'hydrolyse des sels biliaires et codée par le gène *bsh*) pour la résistance aux sels biliaires (Dussurget *et al.*, 2002), la protéine Gad (une glutamate décarboxylase codée par le gène *gad*) pour la résistance au stress acide (Cotter *et al.*, 2001), la protéine Hfp (codée par le gène *hfp*) pour la résistance au stress osmotique (Christiansen *et al.*, 2004). Les facteurs de virulence majeurs jouant un rôle clé dans l'infection sont localisés sur l'îlot de pathogénicité appelé LIPI-1 (*Listeria* pathogénicité Island 1). Les gènes situés sur LIPI-1 sont les gènes *plcA*, *plcB*, *actA*, *mpl*, *hly* et également le gène *prfA* codant l'activateur transcriptionnel PrfA (Figure 5). Les différents gènes situés sur LIPI-1 ainsi que les gènes de virulence *hpt*, *inlA*, *inlB*, *inlC* sont régulés par PrfA (Figure 5) (Chakraborty *et al.*, 2000; Chico-Calero *et al.*, 2002; Engelbrecht *et al.*, 1996; Lingnau *et al.*, 1995; Vázquez-Boland *et al.*, 2001a).

III-1- Le régulon PrfA

PrfA est le régulateur transcriptionnel des gènes de virulence majeurs situés sur LIPI-1 et des gènes de virulence *hpt*, *inlA*, *inlB*, *inlC* localisés dans d'autres régions du génome (Figure 5). Il est directement impliqué dans le contrôle de l'expression de certains gènes de virulence (Milohanic *et al.*, 2003; Ripio *et al.*, 1997b). En effet, un mutant ne synthétisant pas de protéine PrfA montre une absence d'expression de gènes de virulence (*hly*, *plcB*, *actA*...) et est également incapable d'infecter la souris et de croître dans une cellule hôte (Chakraborty *et al.*, 1992; Leimeister-Wächter *et al.*, 1990). Il a été montré que PrfA peut indirectement réguler certains gènes de virulence tels que les gènes impliqués dans la réponse aux stress (*clpC*) (Ripio *et al.*, 1998).

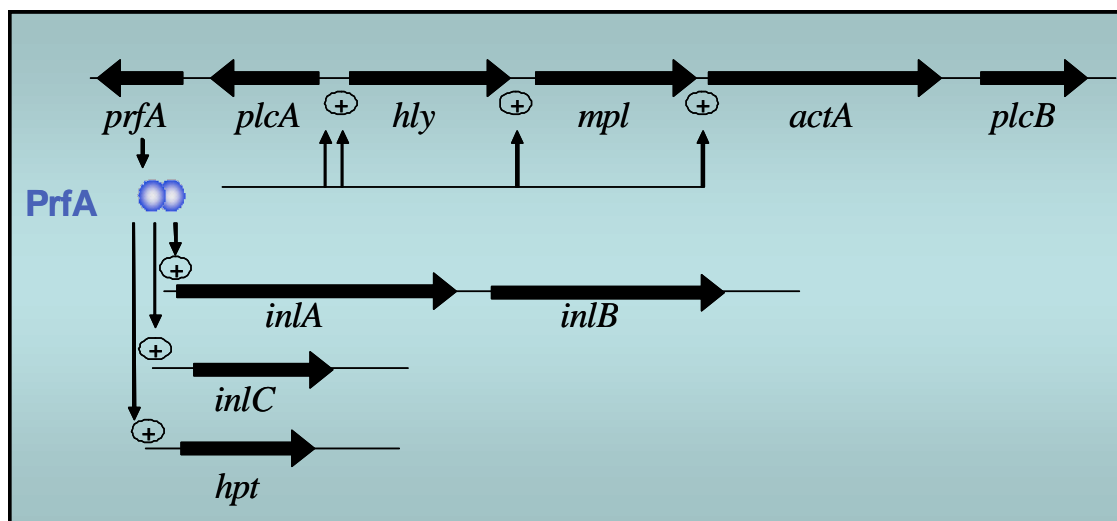


Figure 5 : Principaux gènes de virulence contrôlés par PrfA.

III-1-1- Caractéristiques du régulateur PrfA

PrfA : Positif Regulator Factor A, est une protéine de 27 kDa codée par le gène *prfA*. Des homologies de structure et de fonction entre PrfA et Crp (cAMP receptor protein) de *E. coli* ont permis de classer la protéine PrfA dans la famille des protéines Crp/Fnr (Fnr : Fumarate and Nitrate réduction regulator). La similarité entre la protéine PrfA et Crp est relativement modeste concernant la séquence primaire de ces protéines (22% d'identité) mais la similarité de leurs structures cristallographiques est très frappante (Vega *et al.*, 2004). Les protéines PrfA et Crp forment des homodimères qui sont similaires sur le plan structural. Les 2 protéines possèdent un domaine N-terminal formé d'un feuillet β et une longue hélice α , une région charnière et un domaine C-terminal contenant le motif HTH (Hélice Tour Hélice) qui permet la fixation de ces protéines régulatrices sur l'ADN (Figure 6). PrfA a la particularité de posséder une extension C-terminale (d'une trentaine d'acides aminés) permettant de stabiliser le motif HTH. Un dimère de PrfA reconnaît une séquence consensus de 14 paires de base, la « PrfA box » (Eiting *et al.*, 2005; Ripio *et al.*, 1997b; Vega *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 2004).

Ces données permettent de montrer une similarité structurale entre PrfA et Crp qui utiliserait un mécanisme d'activation similaire (Green *et al.*, 2001; Kolb *et al.*, 1993; Scotti *et al.*, 2007). En effet, dans un mutant *prfA** (mutant *prfA*Gly145Ser : la mutation la plus étudiée),

on observe une expression constitutive des gènes de virulence PrfA-dépendants et ce mutant présente une forte similarité de structure au mutant *crp** (mutant *crpAla144Thr*) (Figure 6 et 7) qui montre une forte similarité avec le complexe AMPc-Crp. D'autres mutants *prfA** (*prfA*Ile45Ser, *prfA*Glu77Lys, *prfA*Gly155Ser) ont également été étudiés et montrent une expression constitutive des gènes de virulence PrfA-dépendants (Shetron-Rama *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2004). Des analyses de structure cristallographique ont montré que le changement de conformation de PrfA au PrfA* est similaire à celui observé au niveau de l'apo-Crp au cAMP-Crp (Figure 7) (Eiting *et al.*, 2005). La fixation de l'AMPc au domaine N-terminal de la protéine Crp préalablement inactive entraîne un changement de conformation de la protéine qui augmente l'affinité pour sa cible. Il est probable que la conformation de la protéine PrfA* corresponde à celle adoptée par *L. monocytogenes* durant l'infection *in vivo* (Eiting *et al.*, 2005; Ripio *et al.*, 1997b). Ces analogies de structure et de fonction suggèrent que PrfA aurait besoin d'un co-facteur pour être active et qu'elle serait préalablement sous la forme native faiblement active et sous la forme hautement active après changement de conformation. Cette hypothèse est soutenue par la présence dans PrfA et Crp de deux tunnels similaires (Figure 8) quoique positionnés différemment. Le diamètre du tunnel chez PrfA laisse donc présager qu'un co-facteur de petite taille probablement hydrophobe serait requis pour son activation (Eiting *et al.*, 2005).

La possibilité que PrfA soit naturellement active et aurait besoin d'un répresseur pour contrôler son activité n'est toutefois pas écartée (Ermolaeva *et al.*, 2004). La régulation de l'expression des gènes de virulence est fonction de l'activité de PrfA qui dépend de plusieurs facteurs. L'activité de PrfA est régulée par plusieurs mécanismes : la régulation transcriptionnelle de PrfA, la thermorégulation de PrfA, la régulation par la disponibilité de nutriments.

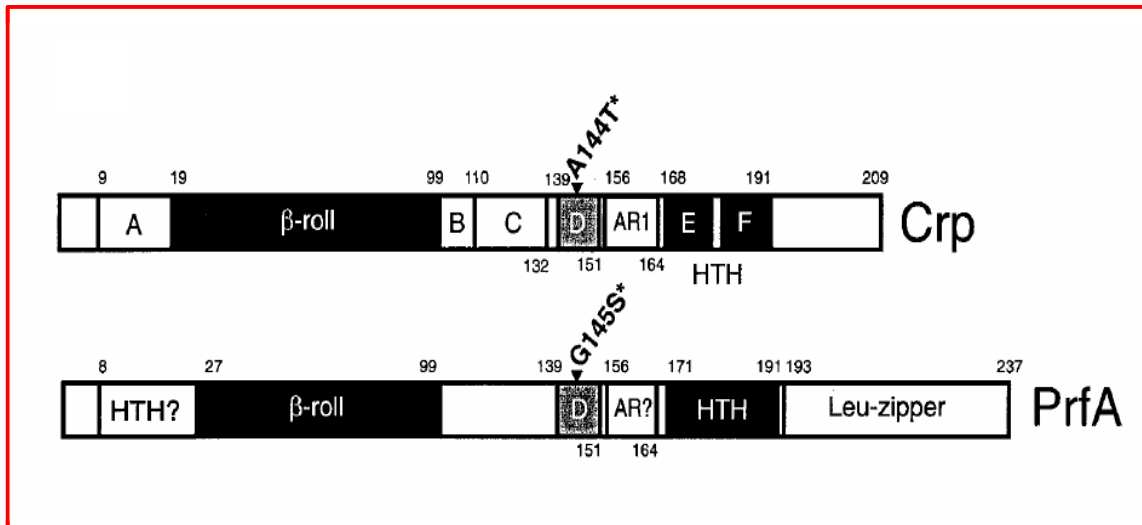


Figure 6 : Structure de la protéine PrfA et Crp. Les positions des mutations *crpA144T* (Crp*) et *prfAG145S* (PrfA*) sont représentées (D'après Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

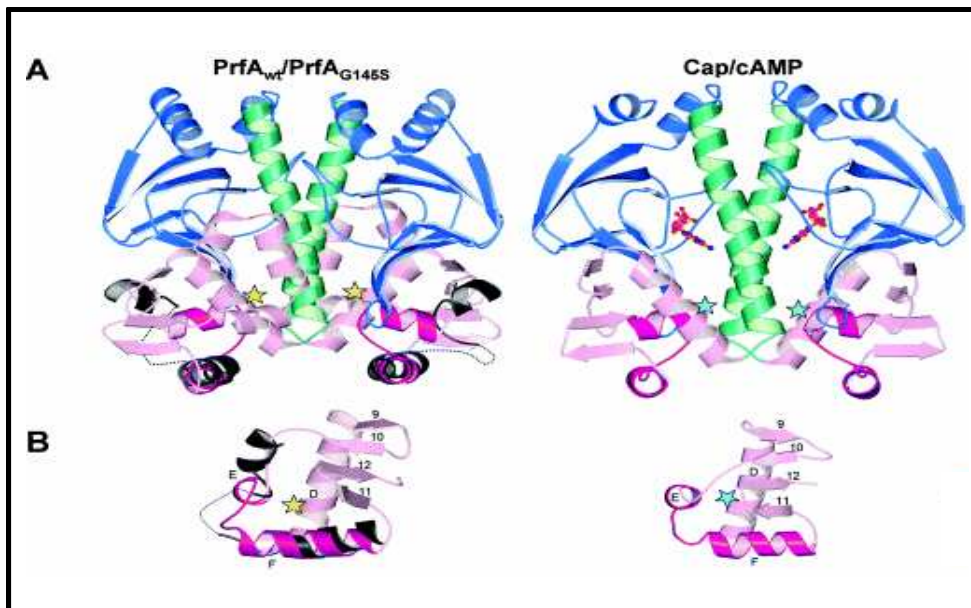


Figure 7 : Comparaison entre PrfA et Crp (Cap : catabolite activator protein of *E. coli*) (D'après Eiting *et al.*, 2005).

A : Les domaines de ces deux régulateurs sont dans la même orientation et schématisés en couleur. B : les motifs HTH également dans la même orientation. Les étoiles indiquent les sites des mutations qui rendent PrfA ou Crp constitutivement actives.

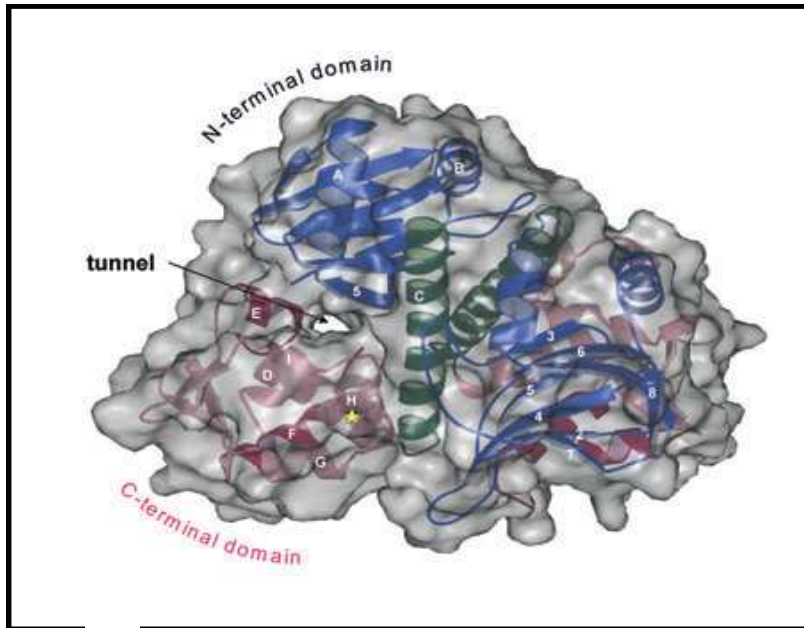


Figure 8 : Présence d'un tunnel dans la protéine PrfA (D'après Eiting *et al.*, 2005).

III-1-2- Régulation transcriptionnelle PrfA-dépendante

PrfA active la transcription des gènes en se fixant via le motif HTH sur la séquence palindromique d'ADN « PrfA box » (Figure 9) centrée en position -41,5 du site d'initiation de la transcription des promoteurs des gènes contrôlés par PrfA. Le taux d'expression de *prfA* et des gènes PrfA-dépendants dépend de plusieurs facteurs :

- de la concentration de PrfA : le contrôle de la transcription de *prfA* est le premier mécanisme utilisé par *L. monocytogenes* pour réguler l'expression des gènes de virulence. PrfA est synthétisée selon deux modes de transcription. La synthèse de PrfA est d'une part, autorégulée par le promoteur PrfA-dépendant *PplcA* situé en amont de l'opéron *plcA-prfA* (Figure 9) qui permet la synthèse d'un transcrit monocistronique *plcA* et d'un transcrit bicistronique *plcA-prfA*. D'autre part, *prfA* est exprimé constitutivement à un faible taux à partir de deux promoteurs *P1prfA* et *P2prfA* situés en amont du gène *prfA* (Figure 9) permettant l'expression d'un transcrit monocistronique *prfA*. Ce faible taux de PrfA est nécessaire à l'activation du promoteur *PplcA* et des autres promoteurs contenant une « PrfA box » (Figure 9) (Freitag *et al.*, 1993; Freitag and Portnoy, 1994; Scorti *et al.*, 2007).
- de l'activation de PrfA : comme mentionné précédemment, le mutant *prfA** montre l'expression d'une protéine PrfA constitutivement active. PrfA existe donc sous 2 formes, une

forme native peu active et une forme hyperactive induite par des changements conformationnels. Chez le mutant *prfA**, la protéine PrfA hyperactive entraîne la surexpression constitutive des gènes de virulence PrfA-dépendants dans des conditions où ces gènes sont normalement réprimés. La transcription *in vitro* à partir des promoteurs PrfA-dépendants *PplcA* et *PactA* dans la souche sauvage (PrfA^{WT}) a été comparée à la transcription à partir de ces mêmes promoteurs dans la souche contenant la mutation PrfA* (PrfA^{G145S}). Ces études ont permis d'affirmer que PrfA* possède une plus forte affinité pour la « PrfA box » que PrfA^{WT} (Ermolaeva *et al.*, 2004).

- de l'affinité du promoteur pour PrfA : le niveau d'expression d'un gène est fonction de l'affinité de sa « PrfA box » pour PrfA (Figure 9) (Ermolaeva *et al.*, 2004). L'expression à partir des promoteurs contenant des palindromes parfaitement symétriques tels que *Phly* et *PplcA* est induite par PrfA de manière plus efficace que ceux contenant des mésappariements (tels que les promoteurs *PactA*, 1 mésappariement ou *PinlA*, 2 mésappariements). Il a été également montré que PrfA présente une faible affinité pour ces palindromes imparfaits (Freitag *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2000).

La séquence de la « PrfA box » est un facteur déterminant pour l'activité de certains promoteurs (tels que *Phly* et *Pmpl*). Cependant, d'autres promoteurs tel que *PactA* pourraient avoir besoin de facteurs supplémentaires pour une expression optimale du gène car la substitution de *PactA* par *Phly* dans un modèle de gène rapporteur *lacZ* chez *Bacillus subtilis* n'a pu montrer une augmentation de l'expression de *actA*. Ces résultats suggèrent l'existence d'événements supplémentaires autres que la liaison de PrfA au promoteur *PactA* qui sont impliqués dans la régulation de l'expression de *actA* (Williams *et al.*, 2000).

Aussi, des études utilisant différents mutants affectés dans le taux d'expression de *prfA*, ont pu montrer que la transcription de *prfA* dépendant de ses propres promoteurs était suffisante pour permettre la prolifération intracellulaire de la bactérie mais pas suffisante pour la propagation de cellules en cellules de la bactérie. Ces observations suggèrent que la faible quantité de la protéine PrfA produite durant le premier contact de la bactérie avec l'hôte est suffisante pour activer rapidement et de manière significative l'affinité pour les promoteurs des gènes *hly* et *plcA* impliqués dans la destruction du phagosome. Par contre, ce faible taux de la protéine PrfA produite n'est pas suffisante pour permettre une forte expression à partir des promoteurs des gènes, *actA* (impliqué dans la propagation de cellules à cellules) et *plcB* (Camilli *et al.*, 1993; Freitag *et al.*, 1993; Freitag and Portnoy, 1994).

La régulation transcriptionnelle de PrfA et des gènes de virulence PrfA-dépendants est schématisée dans la figure 9.

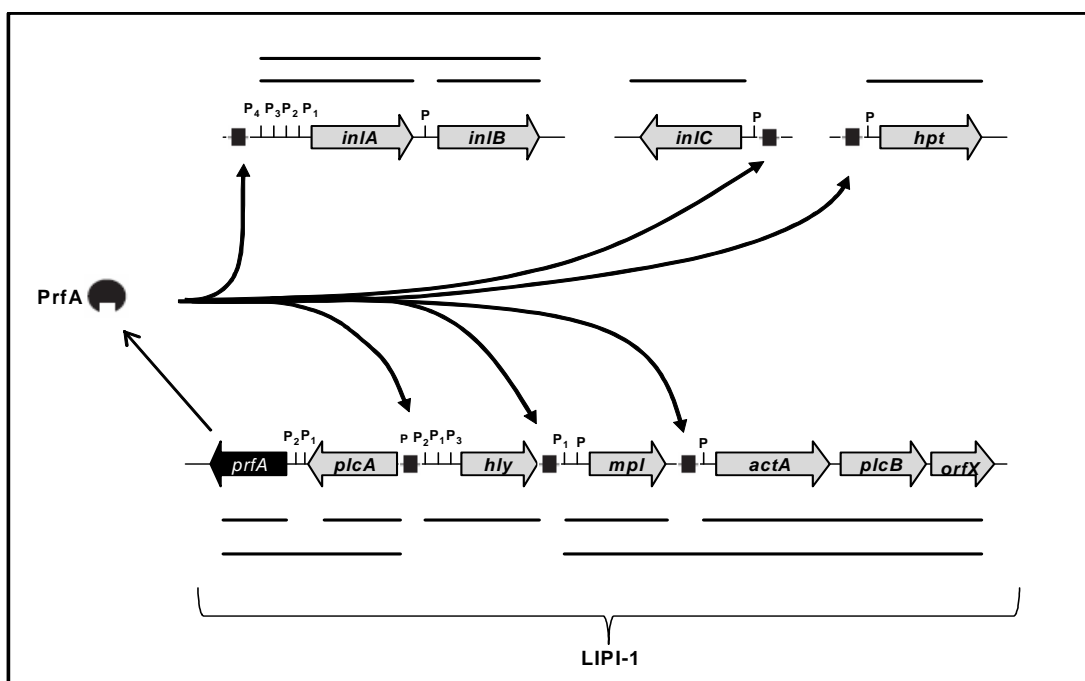


Figure 9 : Régulation transcriptionnelle du régulon PrfA incluant LIPI-1, *inlAB*, *inlC* et *hpt* codant des facteurs de virulence PrfA-dépendants (D'après Scortti *et al.*, 2007).

III-1-3- Régulation liée aux facteurs environnementaux

III-1-3-1- La température

L'expression de *prfA* et donc des gènes de virulence PrfA-dépendants (*hly*, *plcA*, *plcB*...) est influencée par la température. Une faible expression de *prfA* est observée à des températures inférieures à 30°C (températures de l'environnement) et une forte expression, à des températures de 37°C ou avoisinantes (température de l'hôte) (Datta and Kothary, 1993; Leimeister-Wächter *et al.*, 1992). A des températures inférieures ou égales à 30°C, le gène *prfA* est transcrit à partir de ses propres promoteurs (promoteurs situés en amont de *prfA*) (Figure 9) permettant ainsi un faible taux de transcription de *prfA*. A ces températures basses, la région non traduite de ce transcrit (5'-UTR) adopte une structure secondaire en « tige boucle » qui masque le site de fixation du ribosome (Shine-Dalgarno, SD) (Figure 10). Le ribosome ne peut pas accéder à l'ARN messager (ARNm), la protéine PrfA est synthétisée à un faible taux. A des températures de 37°C ou avoisinantes, un mécanisme « riboswitch » est

observé. L'UTR change de structure permettant l'accès du ribosome au site de fixation et la synthèse de la protéine PrfA (Figure 10) (Johansson *et al.*, 2002). Bien que, la transcription de *prfA* soit affectée par la température, d'autres facteurs environnementaux seraient impliqués dans la régulation des gènes de virulence sans toutefois affecter la transcription de *prfA* (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993; Renzoni *et al.*, 1997).

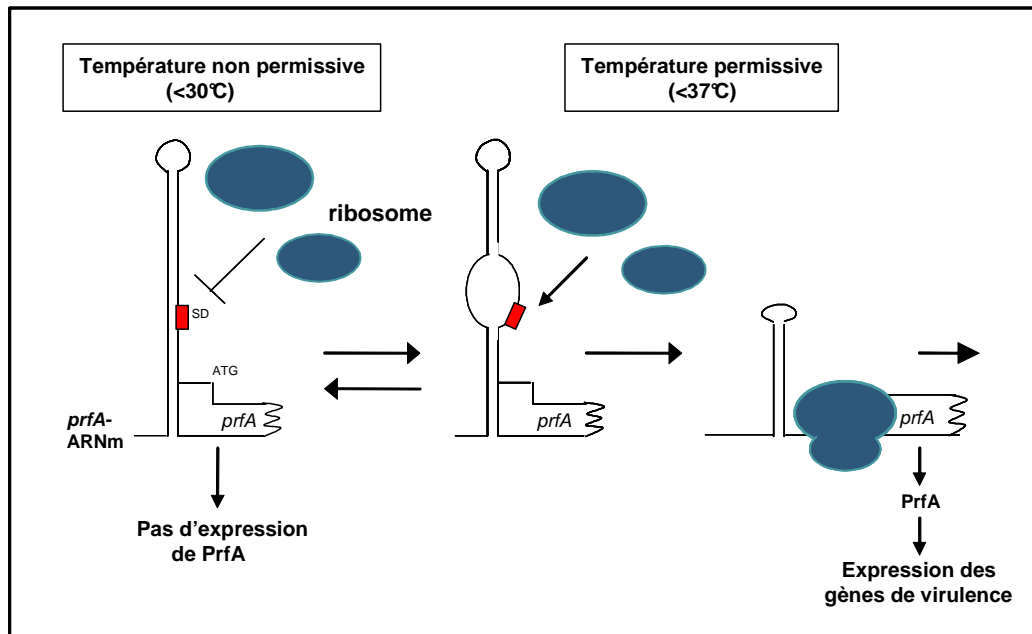


Figure 10 : Modèle schématisant la régulation de PrfA par la température (D'après Johansson *et al.*, 2002).

III-1-3-2- Conditions de stress

Comme mentionné précédemment, chez l'hôte, *L. monocytogenes* est capable de survivre et de se multiplier en s'adaptant à différents stress comme la disponibilité des nutriments, le pH (le lysozyme de la salive, l'acidité de l'estomac), la forte osmolarité et la basse pression en oxygène de l'intestin et des tissus (Gahan and Hill, 2000). Dans ces conditions, les protéines impliquées dans la résistance à ces différents stress permettent à *L. monocytogenes* de persister et de s'adapter rapidement au cours de l'infection. Parmi ces protéines, les protéines chaperons interviennent dans le repliement des protéines endommagées par les conditions de stress ou la protéolyse de protéines irréversiblement endommagées (Gottesman *et al.*, 1997; Nair *et al.*, 1999; Rouquette *et al.*, 1998; Vázquez-

Boland *et al.*, 2001b). La protéine chaperon DnaK, est aussi requis pour une phagocytose efficace de *L. monocytogenes* par les macrophages (Hanawa *et al.*, 1999). Les protéines chaperons ClpC, ClpE et ClpP, de la famille des Clp protéases, sont également impliquées dans la virulence de *L. monocytogenes* car les mutants ne synthétisant pas ces protéines montrent une diminution de la virulence dans un modèle d'infection *in vivo* (Gaillot *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 1999; Rouquette *et al.*, 1998). De plus, des liens entre régulation des gènes de virulence et réponse au stress ont pu être mis en évidence. Le régulon PrfA a été étudié par analyse des transcriptomes en comparant les profils d'expression de mutants *prfA* à la souche sauvage. Trois groupes de gènes ont été identifiés : les gènes du groupe I régulés directement par PrfA, ceux du groupe II réprimés par PrfA et ceux du groupe III majoritairement régulés par les promoteurs de type sigma B (facteur impliqué dans la résistance au stress) (Milohanic *et al.*, 2003). PrfA n'a pas un effet direct sur la transcription des gènes impliqués dans le stress, ce qui suggère une interconnexion entre le régulon PrfA et le régulon sigma B (Milohanic *et al.*, 2003). Le promoteur P2*prfA* est dépendant des facteurs sigma A et sigma B. Ce qui suggère à nouveau un possible lien entre PrfA et la réponse au stress du fait de la partielle transcription de *prfA* par l'ARN polymérase holoenzyme avec sigma B (Rauch *et al.*, 2005; Scotti *et al.*, 2007). Sokolovic et ses collaborateurs ont montré que le facteur majeur de la virulence chez *L. monocytogenes*, la LLO, est synthétisée dans des conditions de stress testées (température élevée : 48°C et en présence de H₂O₂) dans certaines souches cliniques de *L. monocytogenes* de serogroupe 1/2a (Sokolovic *et al.*, 1990).

III-1-3-3- Régulation liée au milieu BHI et au charbon actif

La présence de charbon actif dans le milieu BHI entraîne une forte induction de l'activité de PrfA et une induction de la synthèse des facteurs de virulence PrfA-dépendants (tels que PC-PLC) (Ermolaeva *et al.*, 2004) alors que la présence de ce composant dans le milieu BHI n'affecte pas la croissance de la bactérie. L'effet du charbon actif résulte probablement de l'adsorption de substances diffusibles qui pourraient agir comme auto-répresseurs de PrfA. Il s'agit probablement de petites molécules hydrophobes produites par la bactérie pendant la phase exponentielle de croissance car la filtration du BHI contenant préalablement du charbon actif ne permet pas une induction de l'activité de PrfA. La mutation *prfA** précédemment décrite, induit une très forte activation de PrfA dans le milieu BHI en absence de charbon actif (Ermolaeva *et al.*, 2004; Ripio *et al.*, 1996; Scotti *et al.*, 2007). Ce

qui suggère que *prfA** mime la forme PrfA en présence de co-facteur. La présence d'autres adsorbants tels que l'amberlite Xad-4 dans le milieu de culture LB permet également une induction de l'activité de PrfA probablement selon le même principe que le charbon actif, sauf que l'amberlite Xad-4 adsorberait des molécules chargées (Ermolaeva *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2008).

III-1-3-4- Métabolisme du carbone et virulence

La nature de la source de carbone disponible joue un rôle critique sur l'activation de PrfA et sur l'expression des gènes de virulence régulés par PrfA. La croissance de *L. monocytogenes* en présence de glycérol ou d'hexoses phosphates permet une induction des gènes de virulence (Joseph *et al.*, 2008; Ripio *et al.*, 1997a; Stoll *et al.*, 2008). Il a été montré que ces sources de carbone étaient disponibles chez l'hôte (Eylert *et al.*, 2008). A l'opposé, la présence d'hydrates de carbone tels le glucose, le cellobiose, le maltose, le fructose ou le mannose retrouvés dans l'environnement et principalement transportés par le PTS (Phosphoenolpyruvate carbohydrates phosphotransferase system, le système principal de transport de sucres) réprime l'expression des gènes de virulence dépendants de PrfA (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993; Ripio *et al.*, 1997a).

a- Régulation liée à la présence de sources de carbone non-PTS : glycérol et glucose-1-phosphate

En présence de glycérol, l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence est fortement induite dans la souche sauvage *L. monocytogenes* EGDe (Joseph *et al.*, 2008; Stoll *et al.*, 2008). Il a également été montré qu'en présence d'hexose phosphate comme le glucose-1-phosphate, l'activité de PrfA est fortement induite. *L. monocytogenes* s'adapte aux conditions du cytoplasme de l'hôte afin de proliférer en utilisant différents nutriments dont le glucose-1-phosphate. Le glucose-1-phosphate est un produit de la dégradation du glycogène, qui est couramment libéré dans le cytoplasme et utilisé comme source de carbone exogène ou comme source d'énergie par les bactéries intracellulaires (Massillon *et al.*, 1995; Ripio *et al.*, 1997a). Les cellules hépatocytaires possèdent 8 à 10% de glycogène, ce qui favorise la multiplication de *L. monocytogenes* pendant l'infection. Ceci

peut représenter une étape clé de la pathogénicité de l'infection à *L. monocytogenes* (Ripio *et al.*, 1997a).

b- Régulation liée à l'utilisation de sucres via le PTS

En présence de carbohydrates facilement métabolisables (cellobiose, glucose, fructose mannose...), on observe une forte diminution de l'activité de PrfA et par conséquent une diminution du taux de transcription des gènes de virulence PrfA-dépendants (Datta and Kothary, 1993; Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993; Renzoni *et al.*, 1997; Stoll *et al.*, 2008). Toutefois, la présence de ces sucres dans le milieu de culture n'affecte pas le taux de transcription de *prfA*. Ces hydrates de carbone sont des sucres transportés par le PTS. Le mécanisme de la régulation de PrfA par le PTS n'a pas encore été bien élucidé. Une hypothèse stipule qu'il existe une corrélation entre l'activité de PrfA et le taux de phosphorylation des protéines du PTS et leur synthèse (Freitag *et al.*, 2009; Stoll *et al.*, 2008). Il a aussi été proposé que des intermédiaires du métabolisme de ces sucres pourraient interagir avec la protéine PrfA et l'inactiver (Milenbachs *et al.*, 1997; Renzoni *et al.*, 1997).

Brehm et ses collaborateurs ont montré que le locus *bvr* serait impliqué dans la régulation des gènes de virulence par le cellobiose (Figure 11). Parmi les génomes entièrement séquencés du genre *Listeria*, seulement l'espèce *L. monocytogenes* contient le locus *bvr*. L'opéron *bvrABC* est composé de gènes codant pour un antitermineur de la famille BglG/LicT (*bvrA*), une perméase spécifique des β -glucosides du PTS (*bvrB*) et une putative ADP-ribosylglycohydrolase (*bvrC*). La délétion partielle des gènes *bvrAB* entraîne une suppression de l'effet répressif observé en présence de cellobiose sur l'activité de PrfA. La perméase PTS BvrB, serait donc impliquée dans la répression des gènes de virulence par les β -glucosides (Brehm *et al.*, 1999).

Youngman et ses collaborateurs ont aussi mis en évidence l'implication d'autres loci dans la régulation de l'expression des gènes de virulence (Figure 11). Ils ont montré que le locus *csr* (cellobiose specific regulation) est impliqué dans la répression spécifique par le cellobiose et le locus *gcr* (general catabolite regulation), dans la voie générale de la répression par tous les sucres rapidement métabolisables (cellobiose, glucose...). Ils proposent alors deux voies semi-indépendantes pour la répression des gènes de virulence par les sources de carbone, où la formation de co-facteurs identiques serait impliqué dans la modulation de l'activité de PrfA

et par conséquent dans la régulation des gènes de virulence PrfA-dépendants (Figure 11) (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004).

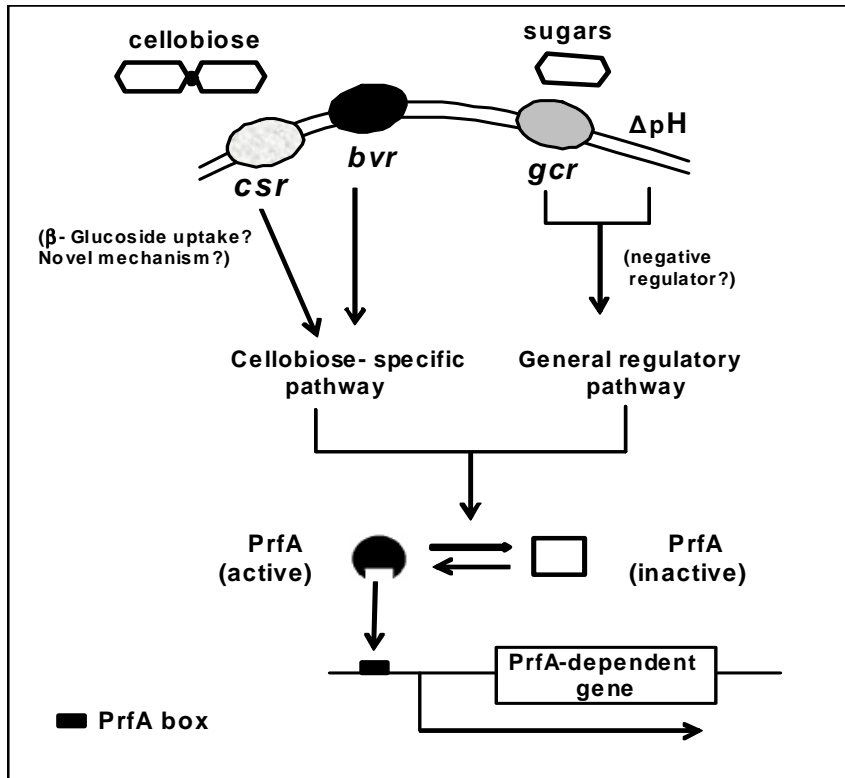


Figure 11 : Modèle de régulation de PrfA et des gènes de virulence PrfA-dépendants chez *L. monocytogenes* par les voies *csr*, *gcr* et *bvr* en présence de sucres rapidement métabolisables (D'après Milenbachs *et al.*, 2004).

Des co-facteurs identiques résultant de ces voies entraînent une inactivation de PrfA en présence de cellobiose ou d'autres sucres rapidement métabolisables. Cependant, une PrfA active se fixe à la « PrfA box » permettant la transcription des gènes de virulence PrfA-dépendants.

Chez *Bacillus subtilis*, les protéines ResD-ResE contrôlent l'expression des gènes impliqués dans la respiration (Sun *et al.*, 1996). Chez *L. monocytogenes*, ce système à deux composants est impliqué dans la respiration mais également dans la régulation des gènes de virulence PrfA-dépendants (*hly*, *plcA*...) sans toutefois affecter la transcription de *prfA*. Un mutant *resD* montre une augmentation de l'expression des gènes de virulence et une faible expression du gène codant pour la protéine EIIAB^{Man} du système PTS. Dans ce mutant également, les sources de carbone tels que le glucose, le fructose ou le mannose ne répriment plus l'expression des gènes de virulence. Ces auteurs ont donc proposé que ResD contrôlerait l'activité ou la synthèse du facteur responsable de l'activation de PrfA et qu'en absence de

ResD, ce facteur serait exprimé de façon constitutive entraînant une augmentation de l'expression des gènes de virulence semblable au phénotype PrfA* (Larsen *et al.*, 2006).

Herro *et al.* ont montré dans le modèle hétérologue *Bacillus subtilis* que la P-Ser-HPr jouerait un rôle dans la modulation de l'activité de PrfA (Herro *et al.*, 2005). La protéine HPr est un composant du PTS et elle peut être phosphorylée sur son histidine en position 15 et/ou sur sa serine en position 46. L'accumulation de la P-Ser-HPr dans le milieu de culture en présence de sources de carbone rapidement métabolisables entraîne une inhibition de l'activité de PrfA. Des interactions directes entre PrfA et la P-Ser-HPr n'ayant pu être montrées, ces auteurs ont donc supposé qu'il serait possible que la P-Ser-HPr affecte de manière indirecte l'activité de PrfA (Herro *et al.*, 2005).

Un modèle de régulation de PrfA a été proposé dans lequel PrfA serait produite sous forme faiblement active et deviendrait active après interaction avec un co-facteur de petit poids moléculaire (Figure 12). Ce co-facteur permettrait la transmission de signaux environnementaux qui indiqueraient à la bactérie sa localisation chez l'hôte ou dans l'environnement (Freitag *et al.*, 2009; Ripio *et al.*, 1996; Ripio *et al.*, 1997b).

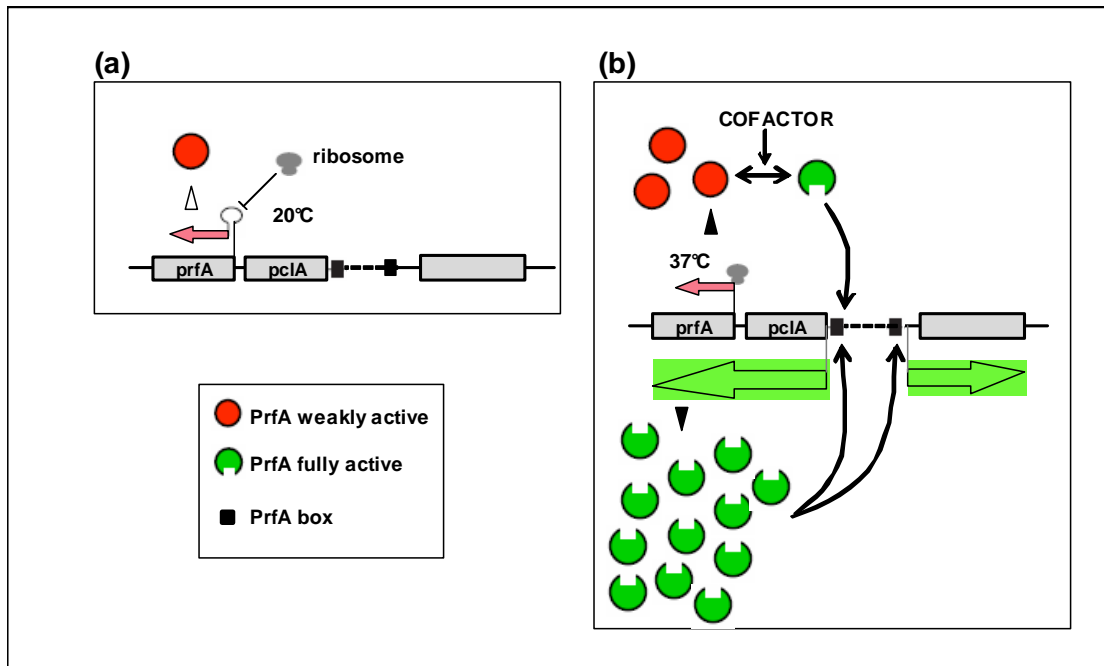


Figure 12 : Modèle de régulation de PrfA en réponse au changement de conditions environnementales (température, co-facteurs) (D'après Scotti *et al.*, 2007).

A basse température (20°C), une faible transcription du gène *prfA* est observée et qui augmente fortement par un mécanisme « riboswitch » quand *L. monocytogenes* se trouve exposée à la température de 37°C ou avoisinante. PrfA serait sous forme active ou inactive en présence de co-facteur. PrfA active, permet la transcription des gènes de virulence PrfA-dépendants.

PrfA est régulée de manière transcriptionnelle et post-traductionnelle (Hamon *et al.*, 2006). Cette régulation permet une modulation de l'expression des gènes de virulence en réponse aux conditions environnementales. Parmi ces facteurs, la source de carbone semble jouer un rôle critique dans la modulation de l'activité de PrfA. La présence de sucres rapidement métabolisables transportés par le PTS entraîne une faible activation de PrfA. En revanche, l'absence de sucres rapidement métabolisables et la présence de sources de carbone non-PTS tels que le glycérol et les hexoses phosphates entraîne une forte activation de PrfA. Ces données suggèrent un rôle du PTS dans la modulation de l'activité de PrfA (Freitag *et al.*, 2009; Stoll *et al.*, 2008).

PARTIE B : SYSTEME PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOHYDRATE PHOSPHOTRANSFERASE (PTS)

I- Historique et définition du PTS

Le PTS a été découvert chez la bactérie *E. coli* par Kundig et ses collaborateurs en 1964 (Kundig *et al.*, 1964). Ils ont identifié chez *E. coli*, un système qui utilise le phosphoenolpyruvate (PEP : un intermédiaire de la glycolyse) pour phosphoryler un nombre d'hexoses dont le glucose, le N-acéthylglucosamine, le mannose et le N-acéthylmannosamine. Des études ont par la suite montré que le PTS est un système qui permet le transport de nombreux hydrates de carbone et leur phosphorylation respective. Le PTS est alors, par définition, un système enzymatique complexe qui permet le transport et la phosphorylation concomitante des hydrates de carbone qui sont ensuite libérés sous forme phosphorylée dans la cellule (Figure 13) (Barabote and Saier, 2005; Deutscher *et al.*, 2006).

Après la découverte du PTS chez *E. coli*, ce système a également été identifié chez de nombreuses bactéries à Gram- et à Gram+ (Hu and Saier Jr, 2002) incluant les bactéries pathogènes et des pathogènes opportunistes de l'homme et des animaux (Mitchell *et al.*, 1993; Parr and Saier Jr, 1992). Il a cependant fait l'objet de nombreuses études chez deux organismes modèles que sont *E. coli* (Tchieu *et al.*, 2001) et *B. subtilis* (Reizer *et al.*, 1999). Malgré quelques rapports de la présence du PTS chez des cellules eucaryotes, le PTS semble être spécifique aux bactéries et aussi aux archaea où la présence du PTS a été également montrée.

II- Organisation du PTS et description des différents composants

Le PTS est constitué de 5 ou 6 protéines ou domaines qui peuvent être regroupés en deux classes : les protéines générales et les protéines spécifiques. Cette organisation est conservée chez tous les PTS capables de transporter et de phosphoryler des sources de carbone. Chez la plupart des Gram- comme *Neisseria*, il y a aussi des PTS qui semblent exercer que des fonctions régulatrices et qui sont composés seulement de 3 ou 4 protéines.

- Les protéines générales du PTS sont l'enzyme I (EI) et l'HPr (Figure 13). Elles sont cytoplasmiques et communes chez tous les PTS des espèces bactériennes étudiées. La plupart des bactéries possède un seul gène *ptsI* (code pour la protéine EI) et *ptsH* (code pour la protéine HPr). Néanmoins, il y a des organismes qui contiennent des gènes codant des paralogues pour l'EI et l'HPr. C'est le cas des enterobactéries telle que *E. coli* (Rabus *et al.*, 1999).

- Les protéines spécifiques sont les enzymes II (EII) (Figure 13) qui sont composées de plusieurs protéines ou domaines (domaine A, B, C et parfois D). Les EIIA et EIIB sont des protéines cytoplasmiques et les EIIC et EIID, des protéines membranaires. La plupart des PTS sont composés seulement des EIIC à l'exception du PTS de la classe mannose qui est composé de deux protéines membranaires, EIIC et EIID. L'inactivation de l'un des deux composants (EIIC ou EIID) diminue fortement le transport du sucre via les PTS mannose.

Le PEP sert à la fois de donneur de phosphate et de source d'énergie utilisée dans le PTS. En fait, les protéines EI, HPr, EIIA et EIIB forment une cascade de phosphorylation (Figure 13). L'EI lie le PEP dans le domaine C-terminale, mais s'autophosphoryle à partir du PEP sur une histidine dans le domaine N-terminale. La P~EI phosphoryle à son tour la protéine HPr sur son histidine en position 15. La P~His-HPr transfère son groupement phosphate à toutes les EIIA (sur une histidine conservée) présentes dans un organisme. Ces P~EIIA transfèrent à leur tour le phosphate vers une cystéine dans les EIIB correspondantes à l'exception des EIIB de la classe mannose, qui sont phosphorylées sur une histidine (Deutscher *et al.*, 2006; Erni *et al.*, 1989; Meins *et al.*, 1993). Enfin, les P~EIIB transfèrent le groupement phosphate à une molécule de sucre lié à l'EIIC spécifique (ou EIIC et EIID pour les PTS de la classe mannose) (Figure 13). Après phosphorylation, le sucre-P est libéré dans le cytoplasme (Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993). Les pentoses sont phosphorylés sur le C-5 et les hexoses sur le C-6 à l'exception du fructose, qui est phosphorylé sur le C-1 chez la plupart des bactéries.

En présence de sucres rapidement métabolisables, les composants du PTS sont présents dans les cellules principalement sous forme déphosphorylées (Hogema *et al.*, 1998). Les protéines EIIB reçoivent le groupement phosphate et le transmettent rapidement aux hydrates de carbone, une étape dans la cascade de phosphorylation presque irréversible. Le transfert du groupement phosphate entre les protéines du PTS est réversible et en équilibre. C'est précisément cet aspect de phosphorylation et de déphosphorylation qui est exploité par les cellules dans le système de régulation via le PTS (Deutscher *et al.*, 2006). En dehors de sa fonction catalytique dans le transport et la phosphorylation des sucres, le PTS fonctionne

aussi comme un système de transduction de signal médié par l'état de phosphorylation de ses composants (Meadow *et al.*, 1990).

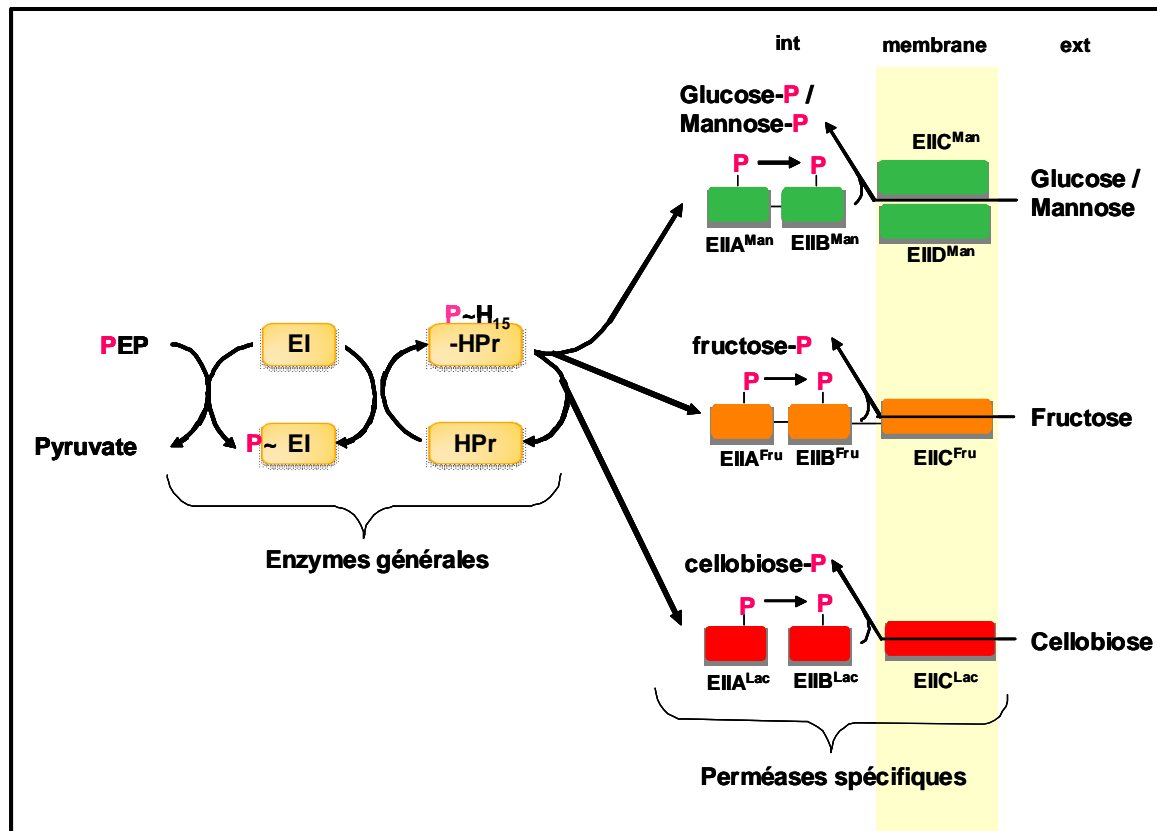


Figure 13 : Organisation du PTS chez *L. monocytogenes*.

II-1- Enzymes générales du PTS

Les enzymes générales du PTS (EI et HPr) permettent la phosphorylation des différents hydrates de carbone entrant dans la cellule par l'intermédiaire des perméases spécifiques (EIIA ou EIIC et EIID). L'EI est codée par le gène *ptsI* et la protéine HPr par le gène *ptsH*. Ces deux gènes *ptsI* et *ptsH* ont été clonés et séquencés chez de nombreuses espèces bactériennes comme *E. coli* (De Reuse *et al.*, 1985; De Reuse and Danchin, 1988), *B. subtilis* (Gonzy-Tréboul and Steinmetz, 1987; Gonzy-Tréboul *et al.*, 1989), *Lactobacillus casei* (Viana *et al.*, 2000), *L. monocytogenes* (Christensen *et al.*, 1998). Ces deux protéines (EI et HPr) possèdent une identité de séquence très significative d'une bactérie à l'autre (Deutscher *et al.*, 2006; Postma *et al.*, 1993). L'analyse des séquences de l'EI et de l'HPr de

L. monocytogenes montre une similarité autour de 70% avec les autres organismes bactériens (Christensen *et al.*, 1998). Les gènes *ptsH* et *ptsI* sont organisés en opéron chez de nombreuses espèces bactériennes et cet opéron est nommé *ptsHI* (Postma *et al.*, 1993). Chez la plupart des α -protéobactéries cependant, les gènes *ptsH* et *ptsI* ne sont pas organisés en opéron (Boël *et al.*, 2003).

II-1-1- L'enzyme I

L'enzyme I est la première protéine du PTS à être phosphorylée dans la cascade de transfert de groupement phosphate à partir du PEP (Figure 13). L'EI se présente sous forme de monomère composé de domaine N-terminal (EI-N : compact, protease-resistant N-terminal domain) qui contient le site de phosphorylation (histidine), et de domaine C-terminale (EI-C : flexible, protease-sensitive C-terminal domain) (Fomenkov *et al.*, 1998). La taille du monomère de l'EI varie de 60 à 65 kDa suivant les espèces bactériennes. Il est de 64 kDa chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* et de 65 kDa chez *Enterococcus faecalis* (Postma *et al.*, 1993). Chez *B. subtilis* et *L. monocytogenes*, le gène *ptsI* code pour une protéine EI de 63 kDa. Beaucoup d'espèces bactériennes à Gram- et à Gram+ étudiées, possèdent un haut degré de similarité de l'EI incluant le résidu histidine phosphorylé.

L'autophosphorylation de l'EI à partir du PEP a lieu dans le domaine N-terminal sur la position N-3 de l'anneau imidazole du résidu histidine conservé (l'histidine-189 chez *E. coli* et histidine-191 chez *E. faecalis*) (Alpert *et al.*, 1985; Postma *et al.*, 1993). Le domaine C-terminal de la protéine EI contient le site de fixation du PEP et il est nécessaire pour la dimérisation de la protéine EI (Chauvin *et al.*, 1996b; Deutscher *et al.*, 2006). Les domaines N-terminal et C-terminal de l'EI ont été clonés et caractérisés. Des études ont montré que le domaine EI-C complèterait le domaine EI-N car la phosphorylation de EI-N a lieu en présence de EI-C, PEP et Mg^{2+} (Chauvin *et al.*, 1996b; Fomenkov *et al.*, 1998).

L'autophosphorylation de l'EI à partir du PEP également, nécessite la dimérisation de l'enzyme (Misset *et al.*, 1980) et la présence de cation divalent Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Les ligands Mg^{2+} et le PEP constituent les éléments majeurs de la dimérisation de la protéine qui se réalise à partir du domaine EI-C car le domaine EI-N ne dimérise pas (Chauvin *et al.*, 1996a; Deutscher *et al.*, 2006). L'étape de dimérisation et de dissociation du dimère est un processus lent et ces étapes de transition (monomère/dimère) constituent des étapes limitantes dans les réactions de transfert de phosphate via le PTS (Chauvin *et al.*, 1994; Fomenkov *et al.*, 1998).

L'EI possède 30% de similarité de séquence avec deux enzymes qui interagissent avec le PEP (pyruvate phosphate dikinase (PPDK) et PEP synthase). Les deux domaines de ces trois protéines montrent aussi une similarité de structure (Pocalyko *et al.*, 1990). Toutefois, chez l'EI, le domaine N-terminal fixe la protéine HPr alors que le domaine N-terminal de la PPDK et de la PEP synthase lie l'ATP.

II-1-2- L'HPr

HPr est une petite protéine sous forme de monomère de 9 à 10 kDa qui a été purifiée chez de nombreux organismes. La structure tridimensionnelle de la protéine HPr a été étudiée par cristallographie aux rayons X et par résonance magnétique nucléaire (RMN) chez *E. coli*, chez *B. subtilis* et également chez d'autres espèces bactériennes (Chen *et al.*, 1993; Prasad *et al.*, 1998). La structure de la protéine HPr se présente sous forme de sandwich β ouvert constitué de 4 feuillets β et de 3 feuillets α (Figure 14). Contrairement à l'EI, l'HPr est phosphorylée par la P~EI sur la position N-1 de l'anneau imidazole du site actif histidine 15 chez de nombreuses bactéries comme *E. coli* (Postma *et al.*, 1993; Rajagopal *et al.*, 1994), *B. subtilis* (Rajagopal *et al.*, 1994), *S. aureus* (Gassner *et al.*, 1977). La protéine HPr ainsi phosphorylée va transférer son groupement phosphate aux protéines spécifiques EIIA (Figure 13). Le site actif histidine 15, site de phosphorylation d'HPr par la P~EI, est localisé sur la boucle liant le premier brin du feuillet β avec l'hélice α A et est exposé à la surface de la protéine (Deutscher *et al.*, 2006). La phosphorylation de la protéine HPr sur l'histidine 15 ne provoque pas de changement significatif dans la structure globale de la protéine mais entraîne un simple changement d'orientation du résidu histidine. La P~His se rapprocherait du résidu arginine en position 17 (Rajagopal *et al.*, 1994). Le rôle de l'arginine 17 serait de repositionner la P~His permettant ainsi d'orienter le groupement phosphate vers les diverses EIIA. Chez de nombreuses bactéries à Gram- et à Gram+, la séquence autour du site actif est fortement conservée (Deutscher *et al.*, 1986; Deutscher *et al.*, 2006). Dans une grande majorité des firmicutes, spirochètes et de protéobactéries (sauf les enterobacteriaceae, pseudomonaceae et vibrionaceae appartenant aux γ protéobactéries ; rickettsiales appartenant aux α -protéobactéries), l'HPr peut également être phosphorylée par la protéine HPrK/P sur le résidu sérine en position 46 (Deutscher and Saier Jr, 1983). Chez les firmicutes, cette phosphorylation sur la sérine 46 joue un rôle important dans la répression catabolique et dans

l'exclusion d'inducteurs (Charrier *et al.*, 1997a; Deutscher and Sauerwald, 1986; Deutscher *et al.*, 2006). Son rôle chez les spirochètes et les protéobactéries reste toujours mal connu. La serine 46, site de phosphorylation de l'HPr par l'HPrK/P (Deutscher *et al.*, 1986), se trouve à l'extrémité N-terminal de l'hélice α B (Figure 14). Le résidu serine 46 est également exposé à la surface de la protéine. La phosphorylation de l'HPr sur la sérine 46 n'induit pas de changement dans la structure globale de la protéine. Elle aboutit à une stabilisation de l'hélice B et par conséquent, à une stabilisation de la structure de la protéine (Audette *et al.*, 2000). La phosphorylation de l'HPr sur la serine 46 par l'HPrK/P diminue fortement la vitesse de phosphorylation de l'HPr sur l'histidine 15 par la P~EI.

Les firmicutes possèdent généralement une seule protéine EI et HPr à l'exception de *B. subtilis* qui possède un paralogue de l'HPr, appelé Crh (catabolite repression HPr) qui montre 45% d'identité avec la protéine HPr (Galinié *et al.*, 1997). Crh est présente chez la plupart des bacillaceae (*Bacillus*, *Geobacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* et *Lysinibacillus*) ; elles montrent de forte similarité entre elles (61 à 83%) et 45% d'identité de séquence avec les protéines HPr correspondantes (Deutscher *et al.*, 2006). Crh contient une glutamine à la place de l'histidine 15 et est toutefois phosphorylée par l'HPrK/P sur la serine 46. Par conséquent, Crh ne contribue pas au transport et à la phosphorylation des sucres PTS mais exerce des fonctions régulatrices.

Chez les enterobactériaceae, la présence des protéines similaires à l'EI ou à l'HPr est plus fréquente. Par exemple, *E. coli* K12 possède 5 protéines paralogueues de l'EI et également 5 protéines paralogueues de l'HPr (Rabus *et al.*, 1999). La protéine FPr (fructose related HPr) est fusionnée à l'EIIA^{Fru} dans la protéine FruB (appelée aussi DTP, Diphosphoryl Transfer Protein). FruB est impliquée dans le transport et la phosphorylation du fructose et peut aussi substituer l'HPr dans les mutants d'*E. coli* et *S. typhimurium* ne synthétisant pas de protéine HPr (Geerse *et al.*, 1986; Postma *et al.*, 1993). Un autre domaine HPr chez *E. coli*, se trouve dans la protéine DhaM fusionnée à une EIIA de la classe PTS mannose et au domaine N-terminal d'une protéine EI-like. Cette protéine transfère le groupement phosphate du PEP vers la protéine DhaL qui catalyse la phosphorylation de la dihydroxyacétone (Deutscher *et al.*, 2006; Gutknecht *et al.*, 2001). Chez *Rhodobacter capsulatus*, les protéines, EI entière, HPr et EIIA^{Fru} sont fusionnées dans la protéine FruB, qui est également impliquée dans le transport et la phosphorylation du fructose (Wu *et al.*, 1990).

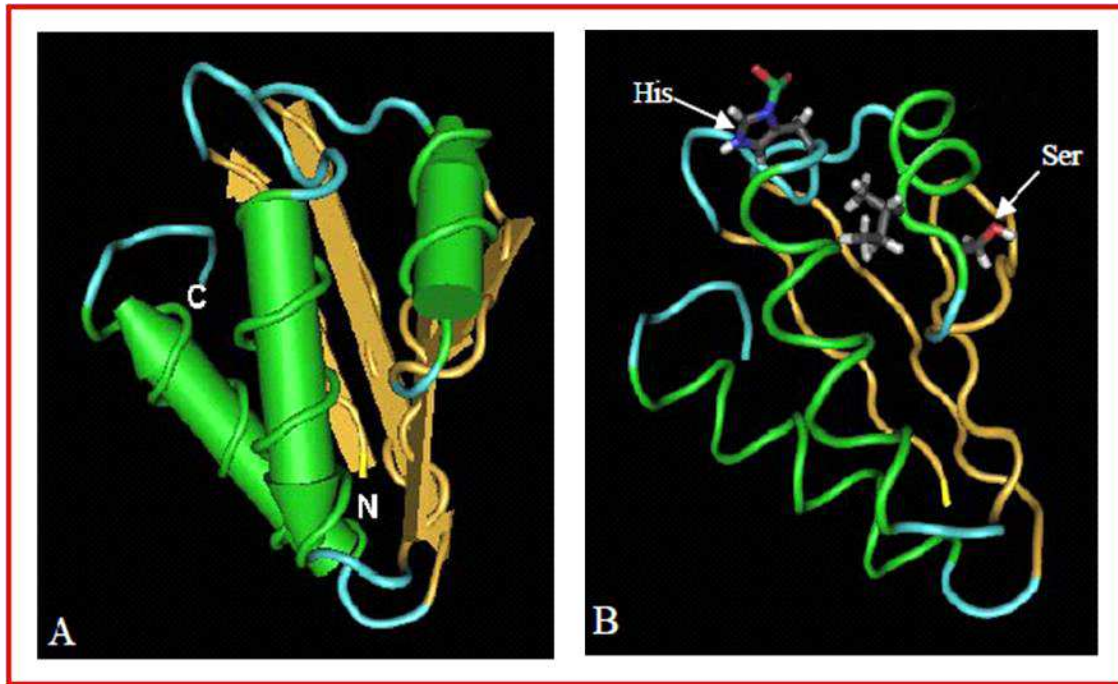


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la protéine HPr.

A : structure secondaire d'HPr.

B : sites de phosphorylation d'HPr (histidine 15, sérine 46).

Les hélices α en vert, les feuillets β en jaune or, les coudes en bleu. Les extrémités N et C-terminal sont indiquées.

II-2- Les enzymes spécifiques du PTS

Un PTS fonctionnel comprend en plus de l'EI et la protéine HPr, des enzymes qui permettent le transport et la phosphorylation des hydrates de carbone. Ces enzymes sont, soit spécifiques d'un sucre donné, soit spécifiques de plusieurs sucres. Elles sont nommées "Enzymes II" (EII). Comme mentionné précédemment, les EII peuvent être composées de trois protéines (EIIA, EIIB, EIIC) ou de quatre protéines (les trois précédentes et la protéine EIID). Ces protéines peuvent être distinctes ou une ou plusieurs d'entre elles peuvent fusionnées. Les EIIB et parfois les EIIA et EIIB peuvent être fusionnées aux EIIC. Lorsqu'elles sont fusionnées, elles sont localisées du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire. Dans le cas contraire, ces protéines sont solubles. Les protéines EIIA et EIIB peuvent aussi fusionner, c'est parfois le cas des protéines EIIA et EIIB de la classe mannose. Les protéines spécifiques de la classe mannose semblent former un complexe stable dans lequel les protéines solubles

cytoplasmiques vont s'associer dans une forme réversible aux protéines membranaires (Erni *et al.*, 1989; Postma *et al.*, 1993).

La structure secondaire de l'EIIA^{Glc} d'*E. coli* et de *B. subtilis* a été étudiée et a permis de montrer que l'EIIA^{Glc} chez ces deux bactéries est composée d'un feuillet β anti-parallèle formé de six brins β et de quelques hélices α contenant deux résidus histidines essentiels : chez *E. coli*, le résidu His-75 et le résidu de phosphorylation His-90 ; chez *B. subtilis* : le résidu de phosphorylation His-83 et le résidu His-68 (Robillard and Broos, 1999). La phosphorylation de l'EIIA par la P~His-HPr s'effectue sur le résidu His-90 (*E. coli*) (Dörschug *et al.*, 1984; Pelton *et al.*, 1991) ou His-83 (*B. subtilis*) (Fairbrother *et al.*, 1992). Les résidus His-75 et His-68 cependant, exerceraient une fonction catalytique dans la phosphorylation de l'EIIB par la P~His-EIIA (Fairbrother *et al.*, 1992; Pelton *et al.*, 1991).

La structure secondaire du domaine EIIB^{Glc} de la protéine EIICB^{Glc} est constituée d'un α/β "sandwich" composé d'un feuillet β , de cinq brins anti-parallèles et de six hélices α contenant comme site de phosphorylation par la P~His-EIIA^{Glc}, le résidu cystéine en position 421 (Eberstadt *et al.*, 1996). Le domaine EIIB^{Glc} est connecté au domaine EIIC^{Glc} membranaire par un lien (linker) flexible qui contient un nombre élevé d'alanine et de glutamine. Le linker contient également un motif hautement conservé 'KTPGRED' qu'on retrouve dans les protéines spécifiques de transport de glucose ou de N-acetylglucosamine (Jahreis *et al.*, 2008). Les différentes enzymes spécifiques du PTS sont codées par différents gènes selon les organismes et la classe du sucre transporté. Par exemple, la protéine EIIA^{Glc} chez *E. coli* est codée par le gène *crr* (catabolite repression resistant) (Pelton *et al.*, 1991) et la protéine EIIAB^{Man} chez *L. monocytogenes* est codée par le gène *manL* (Vu-Khac and Miller, 2009).

II-3- Régulation de l'expression des gènes *pts*

La synthèse des protéines générales et spécifiques du PTS est régulée selon des mécanismes très sophistiqués. Les opérons PTS et régulons sont généralement inductibles par les substrats transportés. Les protéines du PTS sont codées par de nombreux gènes organisés en opéron selon leur spécificité et leur expression est souvent contrôlée par des régulateurs de transcription (répresseurs, activateurs, antiterminateurs). Ces régulateurs permettraient généralement l'expression des opérons en présence de leurs substrats.

Les enzymes spécifiques du PTS diffèrent entre elles, par la spécificité de l'hydrate de carbone transporté et dans le nombre de domaine qu'elles contiennent (Erni *et al.*, 1989). En se basant sur la spécificité pour le substrat, 7 familles ou classes d'enzymes spécifiques du PTS peuvent être distinguées : classe glucose (Glc) (incluant les glucosides) ; classe fructose (Fru) (incluant le mannitol), classe lactose (Lac) (incluant N,N'-diacetylchitobiose), classe mannose (Man), classe glucitol (Gut), classe galactitol (Gat) et la classe L-ascorbate (Asc) (Tableau 3) (Barabote and Saier, 2005). Barabote et ses collaborateurs ont également montré que sur 77 espèces bactériennes étudiées, le PTS de la classe glucose était le plus répandu (Barabote and Saier, 2005).

Par ailleurs, un PTS est dit complet lorsqu'il possède les protéines EIIA, EIIB, EIIC à l'exception du PTS de la classe mannose qui possède en plus, la protéine EIID. En outre, un PTS est dit incomplet lorsqu'il ne possède pas une protéine spécifique du PTS. Ce PTS est souvent retrouvé dans la plupart des PTS ne possédant pas une EIIA. Ces PTS vont donc utiliser une EIIA d'un PTS de la même classe mais avec une spécificité différente pour être fonctionnels (Barabote and Saier, 2005; Djordjevic *et al.*, 2001). Différents PTS complets identifiés chez de nombreux micro-organismes sont énumérés dans le tableau 4.

Tableau 3 : Hydrates de carbone transportés par différentes enzymes spécifiques du PTS (d'après Barabote and Saier, 2005).

Classes	substrats
<u>Glc</u> Glucose Glucoside	Glucose, N-acetylglucosamine, maltose, glucosamine, α -glucosides Glucosides, sucrose, trehalose, and N-acetylmuramic acid
<u>Fru</u>	Fructose, mannitol, mannose, 2-O- α -mannosyl D-glycerate
<u>Lac</u> Lactose N,N'-Diacetylchitobiose	Lactose, aromatic β -glucosides, cellobiose N,N'-Diacetylchitobiose et lichenan oligosaccharides
<u>Gut</u>	Glucitol (sorbitol) et 2-methyl-D-erythritol
<u>Gat</u>	Galactitol et D-arabitol
<u>Man</u>	Glucose, mannose, sorbose, fructose, glucosamine, galactosamine, N-acetylgalactosamine, gluconate and several other sugars; broad-specificity porters
<u>Asc</u>	L-Ascorbate (anaerobic utilization)

Les différentes familles des protéines en gras et soulignées, les sous familles en dessous et non soulignées.

La bactérie qui possède le nombre le plus élevé de gènes (soit 91 gènes) codant des protéines du PTS est *L. monocytogenes*. Chez cette bactérie, 3,2% des gènes codent des protéines du PTS (Barabote and Saier, 2005; Buchrieser *et al.*, 2003). *L. monocytogenes* possède 30 PTS complets et plusieurs PTS incomplets (Stoll and Goebel, 2010). Les PTS complets présents chez *L. monocytogenes* font partie des classes suivantes : 6 PTS de la classe glucose, 6 de la classe fructose, 8 de la classe lactose (comprenant le cellobiose), 1 de la classe glucitol, 3 de la classe galactitol, 4 de la classe mannose et 2 de la classe L-ascorbate (Asc) (Tableau 4) (Barabote and Saier, 2005).

L'analyse de la séquence du génome de *L. monocytogenes* suggère que ce pathogène intracellulaire est capable d'utiliser une grande variété de sources de carbone (Buchrieser, 2007; Eylert *et al.*, 2008; Glaser *et al.*, 2001). *L. monocytogenes* est une bactérie répandue dans l'environnement et le grand nombre de transporteurs d'hydrates de carbone qu'elle possède montre sa capacité à coloniser et à croître dans divers écosystèmes durant sa vie comme saprophyte (Freitag *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 1993; Pine *et al.*, 1989). *L. monocytogenes* est aussi capable d'infecter des cellules humaines comme il a été précédemment mentionné en figures 1 et 2. Pendant la croissance intracellulaire, elle transporte peu de sucres via le PTS. Elle utilise préférentiellement des hexoses phosphates (transportés par une perméase non-PTS, Hpt), le glycérol et le dihydroxyacétone (entrant dans la cellule par diffusion facilitée) (Eylert *et al.*, 2008; Freitag *et al.*, 2009). Des substrats carbonés PTS (cellobiose, glucose, fructose, mannose) entraînent une diminution de l'activité de PrfA et par conséquent, une diminution de l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence. Les transporteurs PTS de ces substrats carbonés joueraient également un rôle dans la modulation de l'activité de PrfA (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004; Stoll *et al.*, 2008). Un PTS de la classe ascorbate codé par les gènes *lmo1971-1973* est exclusivement retrouvé chez *L. monocytogenes*. C'est un des rares PTS induit pendant la croissance intracellulaire de la bactérie (Joseph *et al.*, 2006).

Tableau 4 : Résumé de PTS complets chez des micro-organismes (D'après Barabote and Saier, 2005).

Taxonomic group and organism	Protein or system present									
	EI And/or HPr	EI ^{Ntr} ,NPr, And/or IIA ^{Ntr}	Glc	Fru	Lac	Gut	Gat	Man	Asc	HprK
Actinobacteria										
Bifidobacterium longum NCC2705	Y		1							
Corynebacterium diphtheria NCTC 13129	Y		1						1	
Corynebacterium efficiens YS-314	Y		1	1						
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	Y		2	1					1	
Leifsonia xyli subsp. Xyli CTCB07	Y			2						
Nocardia farcinica	Y			1						
Propionibacterium acnes KPA 171202	Y		3	3	1	1	1		1	
Streptomyces avermitilis MA-4680	Y		1	1						Y
Streptomyces coelicolor A3(2)	Y		1	1					1	
Symbiobacterium thermophilum IAM 14863	Y		2	1	1			3		
Firmicutes										
Bacillales										
Bacillus anthracis Ames	Y		2	1	3					Y
Bacillus cereus ATCC 10987	Y		2	1	3				1	Y
Bacillus halodurans C-125	Y		4	2	2	1	1		1	Y
Bacillus licheniformis DSM 13	Y		5	4	3	1		1		Y
Bacillus subtilis subsp. Subtilis 168	Y		5	3	2			1		Y
Bacillus thuringiensis serovar konkukian strain 97-27	Y		3	1	3					Y
Listeria innocua Clip11262	Y		2	4	8	1	3	4	1	Y
Listeria monocytogenes EGD-e	Y		6	6	8	1	3	4	2	Y
Oceanobacillus iheyensis HTE831	Y		2	2	2		1	1	1	Y
Staphylococcus aureus subsp. Aureus MRSA252	Y		4	3	1		1		1	Y
Staphylococcus epidermis ATCC 12228	Y		2	2	1					Y
Lactobacillales										
Enterococcus faecalis V583	Y		6	4	1	1		12	1	Y
Lactobacillus johnsonii MCC 533	Y		7	2	1		1	5		Y
Lactobacillus plantarum WCFS1	Y		14	2	2	2	2	2	1	Y
Lactococcus lactis subsp. lactis III403	Y		3	1	1			1		Y
Streptococcus agalatae NEM316	Y		4	1	2			3	1	Y
Streptococcus mutans UA159	Y		4	3	2	1		3	1	Y
Streptococcus pneumoniae TIGR4	Y		4	3	5			4	1	Y
Streptococcus pyogenes MGAS315	Y		4	1	3			3	1	Y
Clostridia										
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Y		6	2	2			2		Y
Clostridium perfringens 13	Y		1	1				4	1	Y
Clostridium tetani E88	Y		1							Y
Thermoanaerobacter tengcongensis ^b	Y		1	2	2			1		Y
Mollicutes										
Mesoplasma florum L1	Y		7	1						Y
Mycoplasma gallisepticum R	Y		1	1						Y
Mycoplasma genitalium G-37	Y		1	1						Y
Mycoplasma hyopneumoniae 232	Y		1	2					2	
Mycoplasma mobile 163K	Y		1	1						Y
Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides SCstrain PG1	Y		1	2					1	Y
Mycoplasma penetrans HF-2	Y		5	2					2	Y
Mycoplasma pneumonia M129	Y		1	1					1	Y
Mycoplasma pulmonis UAB CTIP	Y		1	1					1	Y
Proteobacteria										
Alpha subdivision										
Caulobacter crescentus	Y		2							Y
Mesorhizobium loti MAFF 303099	Y	Y				1				Y

Taxonomic group and organism	Protein or system present									
	EI And/or HPr	EI ^{Ntr} ,NPr, And/or IIA ^{Ntr}	Glc	Fru	Lac	Gut	Gat	Man	Asc	HprK
Beta subdivision										
Burkholderiales										
Burkholderia mallei ATCC 23344	Y		1							Y
Burkholderia pseudomallei K96243	Y		1							Y
Ralstonia solanacearum GMI1000	Y		1	1						Y
Neisseriales										
Chromobacterium violaceum ATCC 12472	Y		2	2						Y
Gamma subdivision										
Enterobacteriales										
Buchnera aphidicola APS (Acyrtosiphom pisum)	Y		1	1						
'' Candidatus Blochmannia floridanus ''	Y							1		
Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043	Y	Y	5	3	3			1	2	
Escherichia coli CFT073	Y	Y	3	5	3	1	2	4	2	
Photobacterium luminescens subsp.laumondii TTO1	Y		2	1	1			2	1	
Salmonella enterica subsp. enterica Scrovar Typhi Ty2	Y	Y	2	3	1	1	2	2	3	
Salmonella enterica scrovar Typhimurium LT2	Y	Y	2	4	1	2	2	4	3	
Shigella flexneri 2a strain 301	Y	Y	3	4	1	1	1	3	1	
Yersinia pestis KIM	Y	Y	2	3	1			2	1	
Yersinia pseudotuberculosis IP 32953	Y	Y	2	3				2	1	
Pasteurellales										
Haemophilus ducreyi 35000HP	Y							1	1	
Haemophilus influenzae Rd KW20	Y			1						
Mannheimia succiniciproducens MBEL55E	Y		2	2				2	2	
Pasteurella multocida subsp. multocida Pm70	Y		1	1		1		1	1	
Pseudomonadales										
Pseudomonas aeruginosa PAO1	Y	Y	1	1						
Pseudomonas putida KT2440	Y	Y		1						
Pseudomonas syringae pv. Tomato Strain DC3000	Y	Y		1						
Vibrionales										
Vibrio cholerae O1 biovar eltor strain N16961	Y	Y	1	4	1				1	
Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633	Y	Y	1	5	1				1	
Vibrio vulnificus YJ016	Y	Y	1	6	1			2	2	
Xanthomonadales										
Xanthomonas axonopodis pv. Citri strain 306	Y			1						Y
Xanthomonas campestris pv.campestris strain ATCC 33913	Y			1						Y
Others										
Acinetobacter sp. Strain ADP1	Y			1						
Shewanella oneidensis MR-1	Y	Y	1							
Delta subdivision. Desulfobivrio vulgaris subsp. Vulgaris Hildenborough	Y							1		
Spirochaetales										
Borrelia burgdorferi B31	Y		1	2	1					
Borrelia garinii PBI	Y		1	2						
Unclassified bacteria										
Deinococcus radiodurans R1	Y			1						Y
Fusobacterium nucleatum subsp. Nucleatum ATCC 25586	Y		1	1				1		Y

Y : indique la présence de protéines correspondantes

III- Systèmes de transport chez les micro-organismes

Les systèmes de transport, de manière générale, permettent le transport de nutriments essentiels (sucres, acides aminés, peptides, acides gras...), d'ions, d'acides nucléiques, de protéines, de molécules messagers tout en permettant une communication entre la cellule et son environnement. Des groupes de transporteurs ont été identifiés car rencontrés chez de nombreux organismes : le groupe de la superfamille des ABC (ATP-binding cassette) transporteurs, le groupe de major facilitator superfamily (MFS) également appelé uniporter-symporter-antiporter family et le PTS qui permet le transport que des sucres et des multiples dérivés de sucres (alcools, amines, N-acétylamines, acides...) (Figure 15) (Dean and Allikmets, 1995; Henderson, 1991; Konings, 2006; Pao *et al.*, 1998).

Dans certains cas, un autre mécanisme de transport est utilisé. Ce mécanisme n'a pas besoin d'énergie ; il est réalisé par diffusion facilitée (uniport). C'est le cas du transport du glycérol via la perméase GlpF, qui n'a besoin ni d'ATP, ni d'un gradient ionique (Dimarco and Romano, 1985; Weisser *et al.*, 1995).

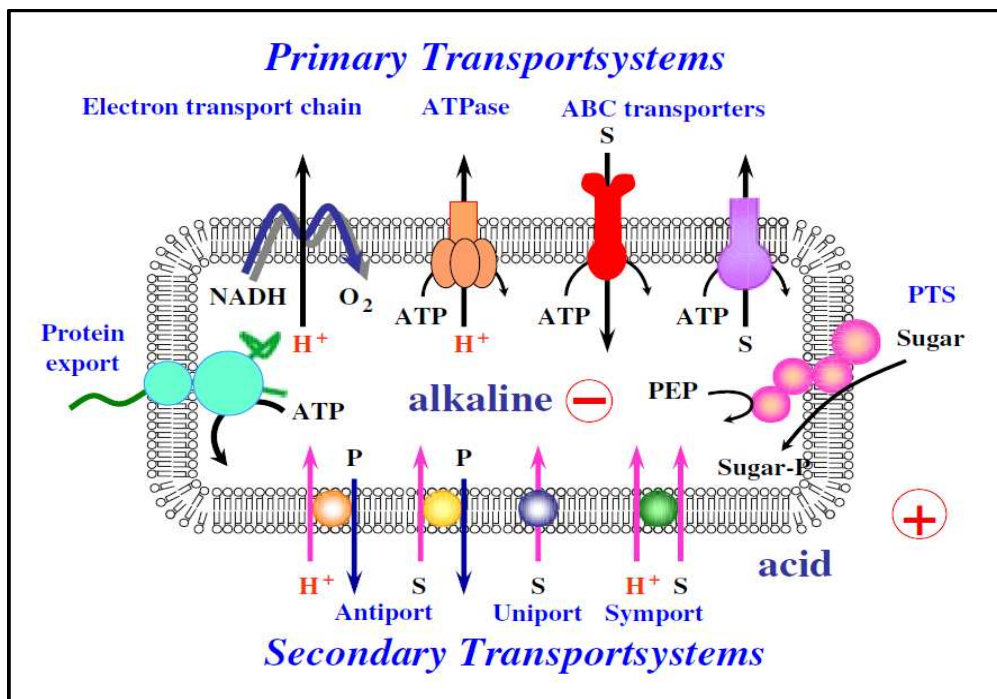


Figure 15 : Différents systèmes de transport actifs chez les bactéries et archaea (D'après Konings, 2006).

Les membres de la famille des ABC transporteurs sont des perméases multi-composants. Ils sont des transporteurs primaires actifs et catalysent le transport de petites molécules et de macromolécules en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (Pao *et al.*, 1998; Paulsen *et al.*, 1997). Les membres de la famille MFS sont des transporteurs secondaires actifs qui catalysent le transport de petites molécules en utilisant des gradients des ions (H⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻) comme source d'énergie (Pao *et al.*, 1998). Le PTS décrit précédemment, transporte que des hydrates de carbone et permet la phosphorylation de ces sucres en utilisant comme source d'énergie et donneur de phosphate, le PEP.

Les systèmes de transport jouent un rôle crucial dans la défense de la bactérie contre les composants toxiques et également dans l'adaptation de la bactérie aux différents écosystèmes qu'elle colonise (Konings, 2006).

Le glucose est la source de carbone préférentiellement utilisée par les bactéries et il peut être transporté par les différents groupes de transporteurs précédemment cités.

III-1- Systèmes de transport de glucose

Le glucose est l'un des sucres fréquemment rencontrés dans la nature et utilisé par de nombreux micro-organismes. Il est cependant le substrat de choix pour de nombreuses bactéries souvent utilisées dans des applications biotechnologiques car la croissance sur glucose est meilleure avec un taux de biomasse élevé (Castro *et al.*, 2009; Wendisch *et al.*, 2006). Chez de nombreux micro-organismes, l'utilisation du glucose entraîne la répression de la synthèse des enzymes nécessaires pour le transport et le métabolisme d'autres sucres via des mécanismes de régulation impliquant des composants du PTS (Castro *et al.*, 2009; Jahreis *et al.*, 2008). Le glucose est transporté dans le cytoplasme de la bactérie via les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), les transporteurs PTS, le système « proton motive force-dependent » (PMF) et dans quelques rares cas, par diffusion facilitée (Gosset, 2005; Jahreis *et al.*, 2008; Konings, 2006; Weisser *et al.*, 1995). Différents systèmes de transport de glucose chez des micro-organismes sont schématisés dans la figure 16.

La comparaison de différentes données sur le transport de glucose acquises durant ces quarante dernières années et la disponibilité de nombreux génomes bactériens séquencés ont permis de montrer que le PTS est le système de transport de glucose communément rencontré chez les firmicutes « low GC » et aussi chez les bactéries à Gram- (Jahreis *et al.*, 2008). Les

bactéries à Gram+ « high GC » préfèrent les homologues des systèmes de transport « proton motive force-dependent » et peu de bactéries utilisent les ABC transporteurs.

Lorsque le glucose est transporté par le PTS, il n'est pas seulement transporté par la protéine PtsG (perméase PTS appartenant aux protéines de la classe PTS-glucose) mais est aussi transporté par deux protéines membranaires du PTS de la classe mannose (EIIC et EIID). Il y a également des membres d'autres classes de PTS qui sont capables de transporter le glucose, c'est le cas d'un PTS de la classe lactose (cellobiose) chez *Lactococcus lactis* (Castro *et al.*, 2009).

E. coli K12 transporte le glucose via un PTS de la classe glucose (PtsG), un PTS de la classe mannose (ManY et ManZ), un « proton symporter » (GalP) (qui appartient au groupe des transporteurs MFS) et un système de transport Mgl (qui appartient à la famille des ABC transporteurs) (MglA, B et C) (Gosset, 2005). L'expression des gènes codant ces transporteurs est influencée par différents facteurs telles que la nature (galactose, mannose ou glucose) et la concentration du sucre (Death and Ferenci, 1994; Vanderpool and Gottesman, 2004). Le transporteur GalP montre une faible affinité pour le glucose et la perméase MglC, une très forte affinité. L'opéron *mgl* est exprimé quand le glucose est limitant dans le milieu (Death and Ferenci, 1993). Le glucose transporté par GalP ou par le système MglABC est ensuite phosphorylé par la glucokinase. L'activité de la glucokinase n'est plus nécessaire lorsque le glucose est présent à des concentrations voisines ou égales à 10 μ M car à ces concentrations, le glucose est transporté par le PTS (Gosset, 2005).

B. subtilis transporte le glucose, principalement via un PTS de la classe glucose, le PtsG. Ceci est rarement rencontré chez les firmicutes dont la plupart transporte le glucose par un PTS de la classe mannose. *B. subtilis* possède un PTS de la classe mannose (LevA, B, C et D) mais ce PTS transporte le glucose avec une très faible affinité. Chez cette bactérie, le glucose est également transporté par la perméase GlcP qui est un transporteur glucose/mannose: H⁺ symporteur et fait partie des transporteurs MFS. L'expression du gène *glcP* est induit par le glucose via un mécanisme probablement dépendant de la protéine PtsG (Paulsen *et al.*, 1998). Comme la plupart des firmicutes, *Lactococcus lactis* transporte le glucose via un PTS de la classe mannose. Chez ce firmicute, le glucose est également transporté par un PTS de la classe lactose (cellobiose) et aussi par des perméases non-PTS (Castro *et al.*, 2009).

Chez *L. monocytogenes*, le système principal de transport de glucose est le PTS et plus particulièrement plusieurs PTS de la classe mannose. L'étude de transporteurs non-PTS chez cette bactérie n'a encore pas fait l'objet d'intenses études.

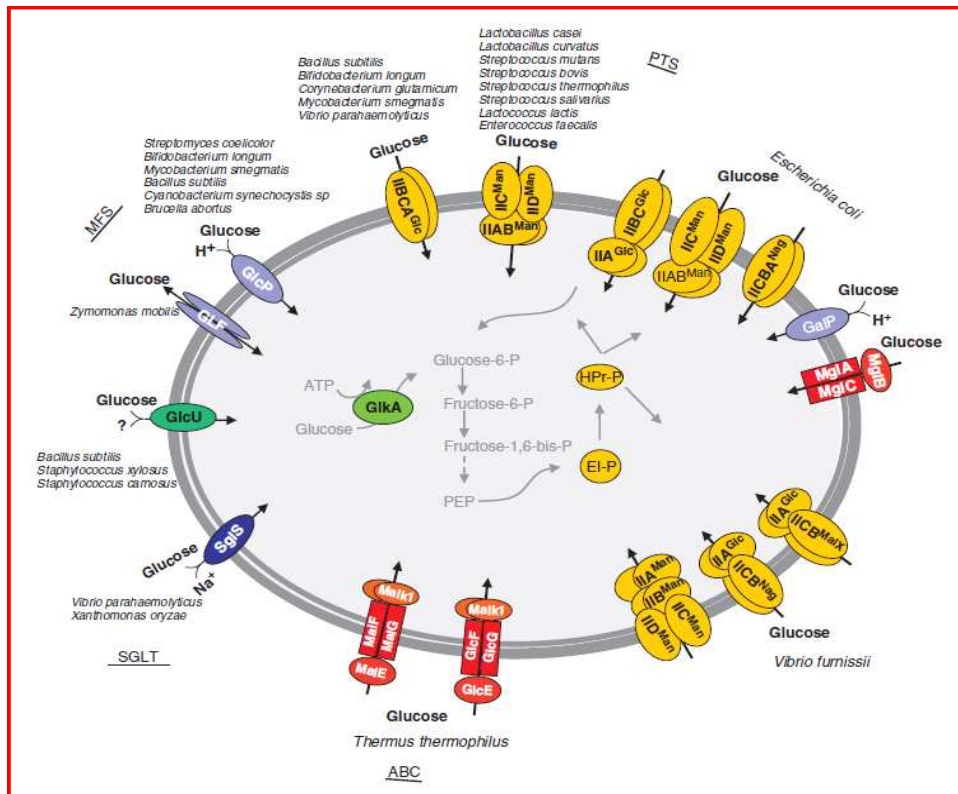


Figure 16 : Différents systèmes de transport de glucose chez des bactéries (D'après Jahreis *et al.*, 2008).
 ABC (ATP Binding Cassette) transporteurs en rouge, MFS (Major Facilitator Superfamily) en bleu clair, PTS en jaune, SGLT (famille des transporteurs sodium/glucose) en bleu foncé, GlcU (perméases non-PTS) en vert.

III-1-1- Transporteurs PTS spécifiques de glucose chez *L. monocytogenes*

Des études ont montré que la source de carbone préférentiellement utilisée par *L. monocytogenes* est le glucose (Premaratne *et al.*, 1991). Par conséquent, il semblait important d'identifier les perméases qui transportent le glucose chez cet organisme, de déterminer les conditions dans lesquelles elles sont activées et d'élucider les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes codant les systèmes de transport de glucose.

Comme la plupart des firmicutes, *L. monocytogenes* transporte le glucose principalement par les PTS de la classe mannose. Elle peut aussi transporter le glucose via un PTS de la classe glucose (PTS^{Glc-1} codé par le gène Imo0027) et un transporteur PTS cellobiose (Stoll and Goebel, 2010). *L. monocytogenes* peut également transporter le glucose par au moins, un transporteur non-PTS.

Le transporteur PTS de la classe mannose de forte affinité pour le glucose, identifié chez *L. monocytogenes* et également chez l'espèce non pathogène *L. innocua*, est le PTS^{Man}. Ce système a préalablement été nommé Mpt (mannose perméase two) (Christensen and Hutkins, 1994; Xue *et al.*, 2005). Il ressemble au système de transport de glucose de la classe mannose identifié chez d'autres firmicutes. Dans ce PTS, les protéines EIIA^{Man} et EIIB^{Man} fusionnent en une seule protéine EIIAB^{Man}. Ce PTS est composé de protéines EIIAB^{Man}, EIIC^{Man} et EIID^{Man} codées par les gènes *mptA*, *mptC* et *mptD* respectivement (Figure 17). A la fin de l'opéron codant ces protéines se trouve le gène *manO* codant une protéine de fonctions inconnues (Yebra *et al.*, 2006; Zúñiga *et al.*, 2005). Vu la similarité de l'opéron *mpt* avec l'opéron glucose/mannose d'autres bactéries à Gram+, il a été renommé opéron *manLMN* (opéron *man*) enfin d'établir une nomenclature identique pour le PTS^{Man} chez tous les firmicutes (Cochu *et al.*, 2003; Lortie *et al.*, 2000; Yebra *et al.*, 2006). L'expression du PTS^{Man} est induite par le glucose et le mannose (Dalet *et al.*, 2001) et ce PTS serait le système principal de transport de glucose chez *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 2001; Stoll and Goebel, 2010). La protéine EIID^{Man} possède à son extrémité C-terminale, une extension de 30 acides aminés (Yebra *et al.*, 2006). Des études avaient préalablement supposé que cette insertion était impliquée dans la sensibilité de *L. monocytogenes* aux bactériocines de la classe IIa telle que la pediocine (Dalet *et al.*, 2001). Des études plus récentes ont cependant montré que la délétion du gène *manM* codant pour la protéine EIIC^{Man} entraîne une résistance de la bactérie à la pédiocine (Kjos *et al.*, 2010). En fait, des mutants n'exprimant pas l'opéron *man* montrent une partielle ou complète résistance aux bactériocines de la classe IIa (Dalet *et al.*, 2001; Ramnath *et al.*, 2004).

L'expression de l'opéron *man* est contrôlée par ManR qui est un activateur LevR-like (décrit ci-après) (Vu-Khac and Miller, 2009). Des mutants ne synthétisant pas ManR présentent une diminution de l'expression de l'opéron *man* et également une résistance de la bactérie aux bactériocines (Xue *et al.*, 2005). ManR appartient à la famille des « enhancer binding proteins » ; il stimule l'interaction du complexe ARN polymérase/facteur sigma 54 (σ^{54} ou RpoN) avec les séquences promotrices -12, -24. L'expression de l'opéron *man* dépend également de la protéine σ^{54} (Arous *et al.*, 2004a; Dalet *et al.*, 2001). Le régulateur ManR

montre une ressemblance aux régulateurs LevR de *B. subtilis* et de *Lactocobacillus casei* et ces régulateurs possèdent deux « PTS regulation domains » (PRDs) (Deutscher *et al.*, 2006). Des mutations empêchant la phosphorylation sur les histidines conservées dans les deux domaines PRDs de ManR affectent l'expression de l'opéron *man* (Xue and Miller, 2007). Ce qui suggère que l'activité de ManR est contrôlée via la phosphorylation par les protéines du PTS (Deutscher, 2008; Studholme and Dixon, 2003). Les protéines qui catalysent cette phosphorylation sont la P~His-HPr et probablement une P~EIIB présente chez *L. monocytogenes*.

Un autre transporteur PTS de la classe mannose, également impliqué dans le transport de glucose et de mannose chez *L. monocytogenes*, a été identifié (Stoll and Goebel, 2010; Vu-Khac and Miller, 2009). Il a été nommé PTS^{Mpo} et est codé par l'opéron *mpo* (mannose perméase one) (Arous *et al.*, 2004a; Arous *et al.*, 2004b; Dalet *et al.*, 2001). L'opéron *mpo* est composé de 4 gènes : *mpoA*, *mpoB*, *mpoC* et *mpoD* (Figure 17) codant respectivement pour les protéines EIIA^{Mpo}, EIIB^{Mpo}, EIIC^{Mpo} et EIID^{Mpo}. Les gènes codant pour les protéines du PTS^{Man} et PTS^{Mpo} montrent 50 à 75% de similarité de séquences (Stoll and Goebel, 2010; Vu-Khac and Miller, 2009). ManR est situé en amont de l'opéron *mpo* et cet opéron contient une potentielle région promotrice -12, -24 identique à celle de l'opéron *man* (Arous *et al.*, 2004a). Ces données ont permis d'émettre l'hypothèse que l'opéron *mpo* serait également régulé par ManR. Cependant, des études ont permis d'infirmer cette hypothèse tout en montrant que des mutants ne synthétisant pas la protéine ManR n'ont aucun effet sur l'expression de l'opéron *mpo* (Vu-Khac and Miller, 2009) mais montrent une partielle résistance aux bactériocines. Un modèle représentant les opérons *man* et *mpo* est représenté dans la figure 17.

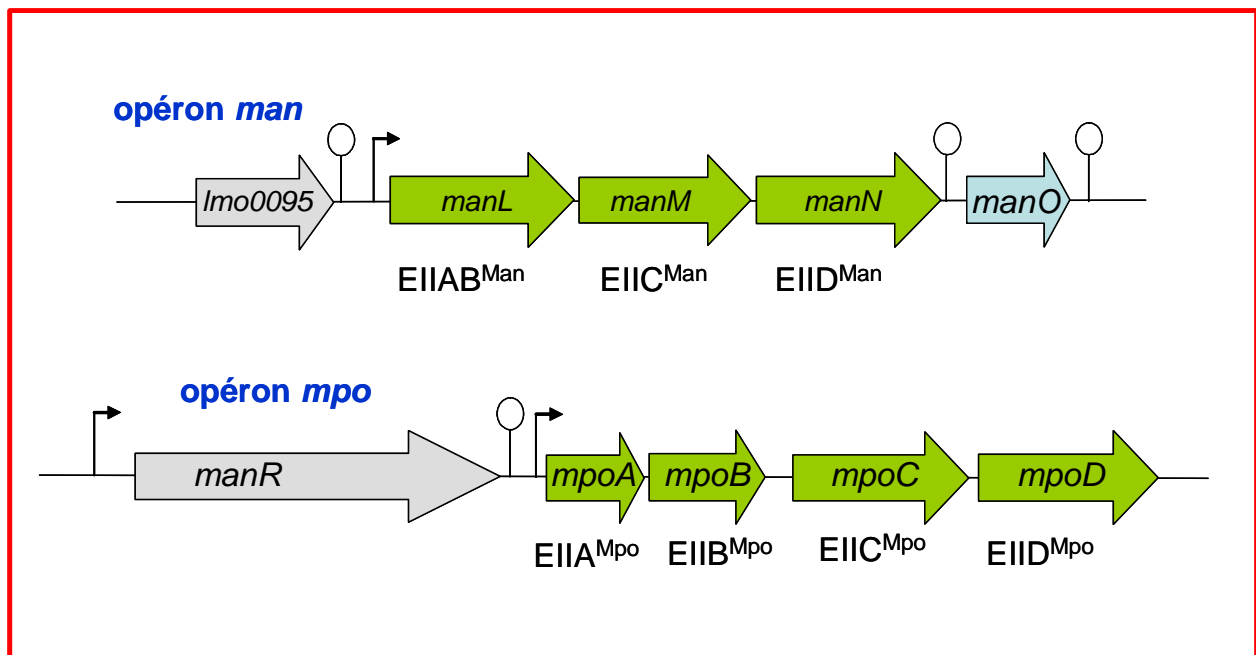


Figure 17 : Représentation schématique des opérons *man* et *mpo* chez *L. monocytogenes*.

III-1-2- Transporteurs non-PTS de glucose chez *L. monocytogenes*

Comme mentionné précédemment, *L. monocytogenes* peut également transporter le glucose via les transporteurs non-PTS, « proton motive force-dépendant » (PMF) probablement de faible affinité. Ces transporteurs ont été peu étudiés chez cette bactérie. Parker and Hutkins ont proposé qu'à des concentrations de glucose élevées dans le milieu, les transporteurs PTS et non-PTS sont actifs. Lorsque la concentration de glucose est faible, seule les transporteurs PTS sont actifs (Parker and Hutkins, 1997).

Chez de nombreuses bactéries, des transporteurs non-PTS de glucose de faible affinité ont fait l'objet d'études parmi lesquelles les perméases nommées GlcU.

La perméase GlcU a été identifiée et nommée pour la première fois GlcU chez *Staphylococcus xylosum* où le gène *glcU* forme un opéron avec le gène de glucose déshydrogénase (gène *gdh*) (Fiegler *et al.*, 1999).

Chez *B. subtilis*, la protéine GlcU est codée par le gène *ycxE* et ce gène forme également un opéron avec le gène *gdh* de glucose déshydrogénase. La séquence de la protéine YcxE montre 55% d'identité avec celle de GlcU de *S. xylosum* (Kunst *et al.*, 1997; Rather and Moran, 1988). La perméase GlcU a également été identifiée chez *Bacillus megaterium* et montre une similarité de 78% avec celle de *B. subtilis*. Des homologues des gènes *glcU* ont aussi été

identifiés chez les bactéries *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus pyogenes* et les protéines codées par ces gènes montrent respectivement 32 et 40% d'homologie à GlcU de *S. xylosus* (Fiegler *et al.*, 1999).

Chez *L. lactis* MG1363, la protéine GlcU codée par le gène *llmg_2561* montre 36% d'identité de séquence avec la protéine GlcU de *S. xylosus* (Castro *et al.*, 2009; Wegmann *et al.*, 2007). Chez cette bactérie, il a été montré que GlcU est une perméase « proton motive force-dependante » (PMF). Vu la similarité avec les protéines GlcU identifiées chez les autres bactéries, il est probable que toutes les GlcU transportent le glucose en utilisant la PMF.

Chez *Streptococcus bovis*, en plus du PTS, un autre transporteur de faible affinité pour le glucose a été identifié. Cette protéine n'utilise pas de proton ni d'ATP et fonctionnerait par diffusion facilitée (Russell, 1990) et pourrait être un homologue de Glf de *Zymomonas mobilis* (Figure 16).

Des suggestions basées sur l'analyse du génome des bactéries de la famille des Bacillales et de différentes caractéristiques d'autres transporteurs non-PTS de glucose ont permis d'affirmer que les perméases GlcU seraient probablement les premiers transporteurs non-PTS chez les bacillales (Castro *et al.*, 2009). De nombreuses études sont nécessaires pour mieux élucider le mécanisme de transport de glucose via les transporteurs GlcU (Fiegler *et al.*, 1999). Ces protéines GlcU seraient probablement une nouvelle famille de transporteurs de glucose observée principalement chez les bactéries à Gram⁺ à « bas GC », les firmicutes.

Par homologie de séquences aux gènes codant pour les transporteurs GlcU chez les bactéries telles que *L. lactis* et *B. subtilis*, trois gènes codant des potentielles perméases GlcU ont été identifiés chez *L. monocytogenes* (Figure 18). Cependant le rôle des protéines GlcU dans le transport de glucose chez *L. monocytogenes* n'a pas encore été bien élucidé.

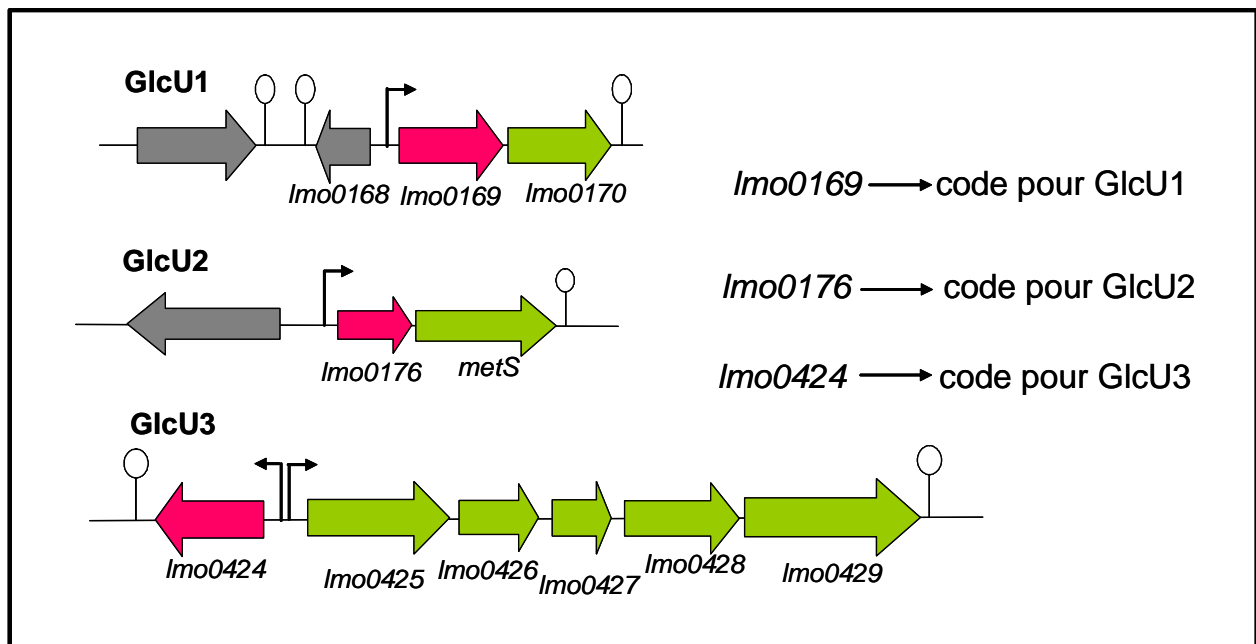


Figure 18 : Organisation génétique des putatifs gènes *glcU* (*glcU1*, *glcU2* et *glcU3*).

IV- Fonctions régulatrices du PTS

Quelques années après la découverte du PTS, des études sur l'utilisation des sucres non-PTS ont montré que le PTS n'est pas seulement impliqué dans la réception, le transport et la phosphorylation des hydrates de carbone mais serait aussi impliqué dans des fonctions régulatrices (Saier Jr and Roseman, 1976). Aujourd'hui, différentes études ont permis de montrer que les composants du PTS jouent un rôle dans la chimiotaxie, la régulation de l'expression de certains opérons (tels que des opérons codant des enzymes pour le métabolisme d'azote ou de phosphate) (Barabote and Saier, 2005; Fomenkov *et al.*, 1998). Ils jouent aussi un rôle dans la répression catabolique et dans l'exclusion d'inducteur chez les enterobactéries et les firmicutes (Botsford and Harman, 1992; Brückner and Titgemeyer, 2002; Deutscher *et al.*, 2006). Le PTS est également impliqué dans la régulation de la virulence (Poncet *et al.*, 2009). Les fonctions régulatrices des différents composants du PTS sont décrites dans la partie suivante et dans le tableau 5. Quelques fonctions des composants du PTS sont également mentionnées dans la figure 20.

IV-1- Enzyme I

De nombreuses bactéries répondent aux changements environnementaux par des comportements d'attraction ou de répulsion en réponse à la présence de certains composants chimiques (acides aminés, sucres, etc.). Ces comportements bactériens sont appelés, soit chimiotaxie positive, soit chimiotaxie négative (Postma *et al.*, 1993; Stock *et al.*, 1989).

En effet de nombreux sucres sont perçus par des bactéries motiles comme chémoattractants grâce à des récepteurs membranaires. Ces récepteurs membranaires sont souvent les EIIC ou EIIC/EIID correspondantes, qui transmettent les signaux perçus à la machinerie motrice via des protéines cytoplasmiques qui sont principalement les protéines CheA et CheY. CheA s'autophosphoryle à partir de l'ATP et CheA phosphorylée transmet son phosphate à CheY. CheY phosphorylée change de conformation qui lui permet d'interagir avec une protéine flagellaire (FliM) et ceci permet de contrôler la durée de la rotation des flagelles dans une des deux directions suivantes : "clockwise" ou "counterclockwise". Les protéines CheW, CheZ, FliG, FliN sont également des protéines de chimiotaxie.

La phosphorylation de CheA et par conséquent celle de CheY, favorise le mouvement « clock-wise » de la bactérie, entraînant un mouvement "tumbling" qui ne permet pas à la bactérie d'avancer. La non phosphorylation de CheA et donc de CheY, entraîne le mouvement "counterclockwise", ce qui permet à la bactérie d'avancer dans une direction. La phosphorylation de CheA entraîne une chimiotaxie négative et la non phosphorylation, une chimiotaxie positive (Postma *et al.*, 1993).

Le PTS participe au système de transduction de signal de chimiotaxie exclusivement pour les sucres PTS. Des mutants ne synthétisant pas l'EIIC correspondante ou de protéine EI ou d'HPr montrent aucune réponse de chimiotaxie malgré la présence de sucre PTS (Postma *et al.*, 1993).

Chez *E. coli*, la forme non phosphorylée de l'EI inhibe l'autophosphorylation de CheA et donc la phosphorylation de CheY, ce qui permet un mouvement "clock-wise" de la bactérie (Lux *et al.*, 1995).

Chez *L. monocytogenes*, Flanary et ses collaborateurs ont montré que les protéines CheA et CheY sont impliquées dans la chimiotaxie de cette bactérie (Flanary *et al.*, 1999).

Par ailleurs, l'EI serait également impliquée dans la virulence de certaines bactéries. Kok et ses collaborateurs ont montré l'implication de l'EI dans la virulence de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* (Kok *et al.*, 2003).

L'inactivation de l'EI affecte aussi la virulence chez *Neisseria meningitidis* (Sun *et al.*, 2000) et chez *Brucella mélitensis* (Delrue *et al.*, 2004).

IV-2- La protéine HPr

Chez la plupart des bactéries possédant un PTS, l'HPr est phosphorylée par la P~EI sur son histidine en position 15 et/ou sur sa sérine en position 46 par l'HPrK/P. L'HPr existe donc sous 4 formes différentes (non phosphorylée, phosphorylée sur His-15 ou Ser-46, et doublement phosphorylée). Chaque forme de la protéine HPr exerce des fonctions régulatrices différentes.

IV-2-1- P~His-HPr

Chez la plupart des firmicutes, la P~His-HPr intervient dans la régulation de la glycérol kinase. Chez les bactéries à Gram⁺ et certaines protéobactéries, la P~His-HPr intervient également dans la régulation des activateurs transcriptionnels (LevR, LicR) (Charrier *et al.*, 1997b; Martin-Verstraete *et al.*, 1998) et des antiterminateurs (BglG, SacT, SacY, GlcT, LicT) (Amster-Choder *et al.*, 1989; Arnaud *et al.*, 1996; Bachem *et al.*, 1997; Tortosa *et al.*, 1997).

a- Régulation de la glycérol kinase

Le glycérol est une source de carbone qui est transporté dans la bactérie via la diffusion facilitée (GlpF) (Charrier *et al.*, 1997a; Heller *et al.*, 1980). Malgré que le glycérol ne soit pas transporté par le PTS, des mutants ne synthétisant pas l'EI ou l'HPr ont montré une incapacité à pousser en présence de glycérol comme seule source de carbone. Chez les firmicutes, la glycérol kinase (GlpK), qui utilise l'ATP pour la phosphorylation du glycérol intracellulaire en glycérol-3-P, est phosphorylée par la P~His-HPr (Beijer and Rutberg, 1992; Charrier *et al.*, 1997a; Darbon *et al.*, 2002; Deutscher and Sauerwald, 1986; Deutscher *et al.*, 2006). La GlpK phosphorylée est plus active que la GlpK non phosphorylée. En absence de

sucres PTS, la GlpK est majoritairement sous forme phosphorylée et donc active. La P~GlpK permet ainsi un métabolisme efficace du glycérol car le glycérol-3-P n'est pas reconnu par la GlpF et reste dans la cellule. En présence de sucres PTS, la GlpK est majoritairement sous forme non phosphorylée car la P~His-HPr transfère son groupement phosphate principalement aux EIAs pour la phosphorylation des sucres PTS. Par conséquent, peu de glycérol diffusent dans la cellule et sont transformés en glycérol-3-P (Darbon *et al.*, 2002).

b- Régulation des antiterminateurs

Les antiterminateurs peuvent contrôler l'expression des gènes et opérons codant les composants spécifiques des sucres PTS ou des enzymes catalysant la dégradation extracellulaire des polysaccharides en mono ou oligosaccharides qui sont ensuite transportés via le PTS. Cette famille d'antiterminateurs est régulée par une phosphorylation réversible catalysée par le PTS. Ces antiterminateurs contiennent dans la partie N-terminale, un domaine de fixation à l'ARN suivi de deux PRDs « PTS regulation domains » (PRD1 et PRD2) contenant chacun, deux résidus histidines conservés, dans la partie C-terminal (Deutscher *et al.*, 2006) (voir figure 19 pour la structure de l'antitermineur LicT). Ces résidus histidines sont phosphorylés ou déphosphorylés selon la présence d'hydrates de carbone dans le milieu. Cette famille des antiterminateurs est appelée BglG/SacY. Ces antiterminateurs se fixent sur des séquences d'ARN conservées appelées "Ribonucléotidic antiterminateurs target" (RATs) qui précèdent les terminateurs ρ -indépendants (Aymerich and Steinmetz, 1992). L'antitermineur SacY contrôle l'expression de la levansucrase (codé par le gène *sacB*) et l'antitermineur BglG, l'expression de l'opéron *bgl* (codant pour des transporteurs de β -glucosides) (Aymerich and Steinmetz, 1992; Deutscher *et al.*, 2006). Ces antiterminateurs vont se fixer sur les RAT empêchant ainsi la fin précoce de la transcription du gène ou de l'opéron par la formation du terminateur. Les antiterminateurs de la famille BglG/SacY sont phosphorylés par la P~His-HPr dans le domaine PRD2 entraînant leur activation. Une absence de phosphorylation dans PRD2 entraîne une inactivation de l'antitermineur et par conséquent, la fin précoce de la transcription du gène ou de l'opéron correspondant. La plupart de ces antiterminateurs sont également phosphorylés par les P~EIIBs dans PRD1 entraînant leur inactivation (Amster-Choder *et al.*, 1989; Tortosa *et al.*, 1997). Seulement, les antiterminateurs non-phosphorylés dans PRD1 et par conséquent actifs, peuvent se lier aux sites RAT de l'ARNm et empêcher la fin de la transcription. Deux types de phosphorylation

avec des effets antagonistes sont ainsi observés. Celle par la P~His-HPr dont l'absence sert de mécanisme de la répression catabolique CcpA-indépendente, et celle par la P~EIIB dont l'absence sert de mécanisme d'induction.

c- Régulation des activateurs transcriptionnels

Chez les firmicutes, l'expression des opérons codant pour les protéines spécifiques du PTS est fréquemment régulée par les activateurs transcriptionnels contenant deux PRDs similaires aux PRDs des antiterminateurs BglG/SacY (Stülke *et al.*, 1995). Ces différents activateurs sont contrôlés par la P~His-HPr via la phosphorylation. Les activateurs transcriptionnels se fixent en amont de leurs promoteurs cibles entraînant une plus forte affinité de l'ARN polymérase pour ces promoteurs. En se basant sur le facteur sigma associé à l'ARN polymérase, deux classes d'activateurs de transcription ont été identifiées : les activateurs LevR-like (type NifA/NtrC) et LicR-like (type DeoR). Les activateurs LevR-like fonctionnent comme des « enhancer binding proteins » (FBP) pour les promoteurs -12, -24 reconnus par l'ARN polymérase liée à sigma 54. En revanche, les activateurs LicR-like renforcent la fixation de l'ARN polymérase liée à sigma 70 aux promoteurs -10, -35 correspondants (Deutscher *et al.*, 2006). Tous les activateurs transcriptionnels possédant des domaines PRDs contiennent aussi des domaines EIIA et EIIB (Figure 19). Le domaine EIIB montre une similarité des EIIBs des PTS de la classe galactitol (Greenberg *et al.*, 2002). Par contre, le domaine EIIA de ces activateurs semble relier la spécificité des composants PTS qu'ils contrôlent. Ainsi, l'EIIA des régulateurs NifA/NtrC-like appartient aux PTS de la classe mannose et l'EIIA des régulateurs DeoR-like appartient souvent aux PTS de la classe mannitol/fructose.

- Les activateurs LevR-like

L'activateur transcriptionnel NifA/NtrC-like le mieux étudié est LevR de *B. subtilis*. Cette protéine a aussi été étudiée chez *L. casei*. LevR régule l'expression de l'opéron levane (opéron *levDEFG*) qui code pour l'un des deux PTS spécifiques du fructose/mannose (EIIs) et l'enzyme lévane chez *B. subtilis*. Le gène codant pour la protéine LevR est situé juste avant l'opéron *lev*. La lévane est une enzyme extracellulaire capable d'hydrolyser les polymères de fructose et de sucrose (Martin-Verstraete *et al.*, 1990). L'expression de l'opéron *lev*

nécessite le facteur sigma 54 (σ^{54} ou RpoN) et le complexe ARN polymérase/sigma 54 qui reconnaît une région promotrice -12, -24. L'expression de cet opéron est induite en présence de fructose et de mannose et réprimée en présence de nombreux hydrates de carbone rapidement métabolisables. L'activateur LevR se fixe sur sa séquence spécifique d'ADN « upstream activating sequence » (UAS) via le motif HTH. Cette fixation stimule l'interaction du complexe ARN polymérase/sigma 54 avec les séquences promotrices -12, -24 permettant ainsi la transcription efficace de l'opéron *lev* (Martin-Verstraete *et al.*, 1994). En plus du domaine de fixation à l'ADN (DNA binding), LevR possède un domaine central de type NifA/NtrC contenant un Walker motif A pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Il possède aussi deux domaines PRDs (PRD1 et PRD2) et des domaines EIIA^{Man} et EIIB^{Gat} insérés entre les domaines PRDs (voir figure 19 pour la structure de LevR). LevR contient un total de 5 potentiels sites de phosphorylation, 2 sites dans PRD1, un dans EIIA, un dans EIIB et un dans PRD2 (Figure 19). Ainsi, LevR est une protéine contenant plusieurs domaines, le domaine N-terminal permettant la fixation à l'ADN, le domaine central permettant l'activation de la transcription et les domaines régulateurs C-terminal (contenant les domaines PRDs, EIIA^{Man} et EIIB^{Gat}) impliqués dans la modulation de l'activité de LevR (Deutscher *et al.*, 2006; Martin-Verstraete *et al.*, 1994). L'activation de LevR permettant sa fixation sur l'UAS est régulée par la phosphorylation catalysée par des composants du PTS (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). Chez *B. subtilis*, l'EI et l'HPr entraînent un effet positif sur l'activité de LevR par la phosphorylation sur l'histidine 585 dans le domaine EIIA^{Man}. La délétion des gènes *ptsI* et *ptsH* entraîne une forte diminution de l'activité de LevR (Stülke *et al.*, 1995). Le remplacement de l'histidine 585 par une alanine dans le domaine EIIA^{Man} entraîne une diminution de l'expression de l'opéron *lev* (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004; Stülke *et al.*, 1995). En plus de la phosphorylation de LevR par la P~His-HPr, cet activateur peut aussi être phosphorylé par la P~EIIB^{Lev}. Il a été ensuite montré que la P~EIIB^{Lev} phosphoryle LevR sur l'histidine 869 du domaine PRD2 chez *B. subtilis* (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). L'inactivation de *levD* (EIIA^{Lev}) ou *levE* (EIIB^{Lev}) entraîne une expression constitutive de l'opéron *lev* chez *B. subtilis* et *L. casei*. Cette expression constitutive est également observée lorsque le résidu His-869 (histidine 869) est remplacé par l'alanine. La phosphorylation de LevR dans le domaine PRD2 par la P~EIIB^{Lev} entraîne donc une inactivation du régulateur (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004; Stülke *et al.*, 1995). En outre, les résidus histidines conservés du domaine PRD1 et la cystéine du domaine EIIB^{Gat} ne sont probablement pas phosphorylés par les protéines EI, HPr, EIIA^{Lev} ou EIIB^{Lev}.

Ces différentes données sur l'activation et l'inhibition de LevR montrent deux types de phosphorylation par les protéines du PTS avec un effet antagoniste (Martin-Verstraete *et al.*, 1998). En raison de la faible capacité de transport de fructose par le PTS^{Lev} et de la phosphorylation rapide de l'HPr par la P~EI, en présence d'un fructose polymère comme le lévane, la concentration en P~His-HPr est probablement suffisante pour phosphoryler LevR sur le résidu His-585 du domaine EIIA^{Man}-like. La protéine LevR est probablement en majorité sous la forme active (phosphorylation dans EIIA^{Man}-like et déphosphorylation dans PRD2). En présence de sucres rapidement métabolisables comme le glucose, le taux de P~His-HPr diminue et par conséquent, peu ou pas de phosphorylation sur le résidu His-585 du domaine EIIA^{Man}-like. LevR est donc inactif malgré la non phosphorylation sur le résidu His-869 de PRD2 (Deutscher *et al.*, 2006). Des activateurs transcriptionnels homologues de LevR existent chez de nombreux firmicutes. Des bactéries à Gram⁻ possèdent aussi des régulateurs LevR-like. La plupart des activateurs transcriptionnels LevR-like possèdent une organisation de domaines de régulation identique (Figure 19) et une similarité de séquences des acides aminés entre 40 et 60%. Des bactéries peuvent posséder plusieurs protéines LevR-like (7 chez *Clostridium difficile*). Le nombre élevé de protéines LevR-like chez plusieurs bactéries suggère que les activateurs LevR-like ne sont pas exclusivement impliqués dans la régulation de l'expression des opérons codant pour des PTS de la classes mannose ou fructose (Deutscher *et al.*, 2006). Chez *L. monocytogenes*, un PTS de la classe β -glucoside (cellobiose) serait contrôlé par la protéine CsrA, un régulateur LevR-like (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004). L'activateur LevR-like chez *L. monocytogenes* qui a fait l'objet d'étude dans ce travail est ManR. ManR est le régulateur principal de l'opéron *man* (décrit précédemment) (Vu-Khac and Miller, 2009).

- Les activateurs DeoR-like

MtlR de *Geobacillus stearothermophilus* était le premier activateur transcriptionnel identifié possédant des PRDs et un motif HTH ressemblant à ceux des activateurs de transcription de la famille DeoR chez *E. coli* (Henstra *et al.*, 1996). MtlR régule l'expression de l'opéron *mltARFD* codant pour les protéines spécifiques de transport de mannitol (EIICB et EIIA), une mannitol-1-P-déshydrogenase et le régulateur MtlR. Un autre activateur DeoR-like a été ensuite identifié chez *B. subtilis*, l'activateur transcriptionnel LicR. LicR régule l'expression de l'opéron *licRBCAH* qui code pour le régulateur LicR, les protéines spécifiques

de transport des β -glucosides de la classe lactose (EIIB, EIIC, EIIA) et une 6-P- β -glucosidase (Tobisch *et al.*, 1997). *B. subtilis* possède deux autres activateurs DeoR-like : MtlR et ManR qui contrôlent l'expression des opérons codant pour les protéines spécifiques de transport de mannitol et mannose respectivement (Deutscher *et al.*, 2006).

Les activateurs DeoR-like interagissent avec l'ARN polymérase holoenzyme en fusion avec le facteur sigma 70, facilitant ainsi la liaison du complexe de l'ARN polymérase à la séquence promotrice -10, -35. Les activateurs transcriptionnels DeoR-like possèdent un domaine de fixation à l'ADN, deux domaines PRDs (PRD1 et PRD2) et un domaine EIIB^{Gat} et EIIA^{Mtl} (voir figure 19 pour la structure de LicR) (Deutscher *et al.*, 2006). Ces activateurs possèdent un total de 6 potentiels sites de phosphorylation (Figure 19). MtlR de *G. stearothermophilus* est phosphorylée par la P~His-HPr sur l'un des résidus histidines conservés dans le domaine PRD2. Ceci entraîne une activation de MtlR (Henstra *et al.*, 1999; Henstra *et al.*, 2000). L'inactivation de MtlR est due à la phosphorylation par la P~EIIB^{Mtl} ou la P~His-HPr dans le domaine EIIA^{Mtl/Fru}-like (Henstra *et al.*, 1999; Henstra *et al.*, 2000). Le rôle du domaine PRD1 dans la régulation de MtlR n'a pas encore été bien élucidé. Des études récentes ont montré que l'activateur MtlR de *B. subtilis* n'est pas contrôlé par un mécanisme identique à celui de MtlR de *G. stearothermophilus*. Le site principal d'inactivation de MtlR de *B. subtilis* a été identifié comme étant le résidu Cys-419 qui est phosphorylé par la P~EIIA^{Mtl} (Joyet *et al.*, 2010). LicR de *B. subtilis* montre également un mécanisme de phosphorylation différent de MtlR de *G. stearothermophilus*. Des résultats génétiques suggèrent que dans LicR de *B. subtilis*, les 4 sites potentiels de phosphorylation dans les domaines PRDs (Figure 19) sont phosphorylables (Tobisch *et al.*, 1999). De nombreuses bactéries à Gram+ et peu de bactéries à Gram- possèdent des homologues de MtlR de *G. stearothermophilus*.

En somme, deux types de phosphorylation avec des effets antagonistes sont aussi observés chez les activateurs transcriptionnels DeoR-like. Le mécanisme de phosphorylation de MtlR et LicR est l'inverse de celui observé chez LevR de *B. subtilis* car chez les activateurs LevR, la phosphorylation par la P~His-HPr a lieu dans le domaine EIIA^{Man}-like et la phosphorylation par la P~EIIB dans le domaine PRD2.

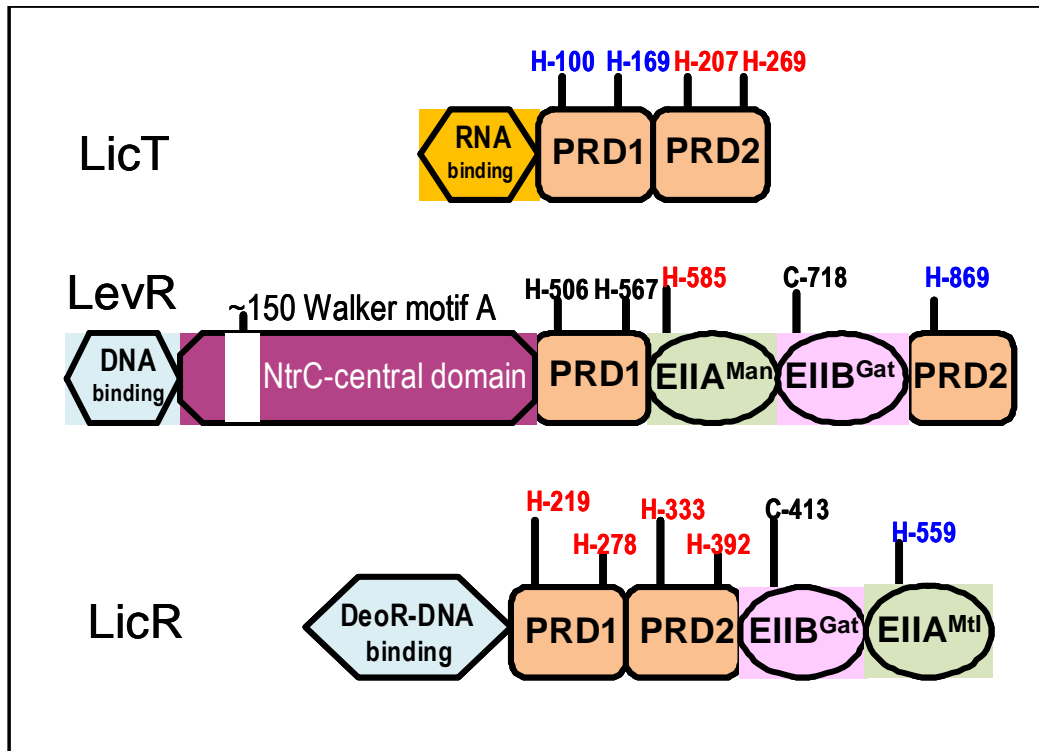


Figure 19 : Structure des domaines de l'antiterminateur LicT, des activateurs transcriptionnels LicR et LevR de *B. subtilis* (D'après Deutscher *et al.*, 2006).

Les domaines N-terminal 'RNA binding' ou 'DNA binding', les domaines EII (EIIA et EIIB), les domaines PRD1 et PRD2 avec leurs résidus histidines conservés sont indiqués. Les résidus histidines phosphorylables sont en couleur. Lorsque la phosphorylation exerce un effet positif sur l'activité du régulateur, les résidus histidines sont indiqués en rouge. Lorsque la phosphorylation exerce un effet négatif sur l'activité du régulateur, les résidus histidines sont indiqués en bleu.

IV-2-2- P-Ser-HPr

La protéine HPr phosphorylée par la HPrK/P sur sa sérine 46 en présence d'ATP (Galinier *et al.*, 1998; Kravanja *et al.*, 1999) (P-Ser-HPr) est impliquée dans la régulation de plusieurs processus métaboliques. La P-Ser-HPr contrôle le transport de sucres via le PTS et est impliquée dans la répression catabolique et l'exclusion d'inducteur.

a- Rôle dans le transport de sucres via le PTS

Le fructose-1,6-bisphosphate (FBP) stimule la phosphorylation de l'HPr sur la sérine 46 par l'HPrK/P. Cette phosphorylation, cependant, ralentit la phosphorylation sur l'histidine 15 par l'EI et par conséquent, la cascade de phosphorylation du PTS. La concentration en FBP augmente fortement quand un sucre PTS est rapidement métabolisé augmentant ainsi le taux de P-Ser-HPr et un mécanisme de « feedback inhibition » peut être observé. Ce mécanisme n'est plus observé dans le mutant *ptsHI* incapable de former la P-Ser-HPr (mutant dans lequel la sérine 46 est remplacée par l'alanine) (Deutscher *et al.*, 1989). Un mutant *HPrK(V267F)*, dans lequel HPrK/P phosphoryle normalement HPr sur la sérine 46 mais la déphosphorylation de la P-Ser-HPr n'est plus catalysée et par conséquent qui contient plus de 90% d'HPr sous la forme P-Ser-HPr, ne peut pas pousser sur des sucres PTS comme seule source de carbone.

b- Rôle dans la répression catabolique

En 1942, Monod découvrit le phénomène de « diauxie » (croissance biphasique ou multiphasique en présence de deux ou plusieurs sources de carbone). Il a montré la capacité de *B. subtilis* et d'*E. coli* à utiliser préférentiellement un sucre par rapport à un autre tout en mettant en veille les enzymes nécessaires pour l'utilisation du sucre non-métabolisé. Il s'est avéré que l'expression des gènes codant ces enzymes est réprimée par la présence d'un sucre préférentiellement utilisé. Ce phénomène a donc été nommé répression catabolique (Bordo *et al.*, 1998; Knezevic *et al.*, 2000; Nakada and Magasanik, 1962; Schumacher *et al.*, 2004). Des études menées chez *B. subtilis* par Chambliss et ses collaborateurs ont permis d'identifier la protéine CcpA, « catabolite control protein A », un répresseur de la famille LacI/GalR, comme régulateur principal de la répression catabolique (Henkin *et al.*, 1991; Weickert and Adhya, 1992). Un homologue de la CcpA est présent chez la plupart des firmicutes. Dans le laboratoire de Chambliss également, un opérateur situé en amont du gène *amyE* (codant pour une α -amylase) de *B. subtilis* a été identifié. L'introduction des mutations dans ce site entraîne une diminution de la répression catabolique. Cet opérateur a été appelé « catabolite response element » (*cre*). Le site *cre* est une séquence d'ADN située juste après le promoteur du gène *amyE* et il constitue le site de fixation du répresseur CcpA (Nicholson and Chambliss, 1985). Lorsque le site *cre* (ou l'opérateur) est situé au niveau de la région promotrice, on observe une inhibition de l'initiation de la transcription. Lorsqu'il est situé en aval du

promoteur (parfois dans la phase codante du gène), on a une inhibition de l'élongation (« road block »). La protéine CcpA ne peut pas se lier toute seule aux sites *cre*, elle a cependant besoin d'un co-répresseur pour être active. Ce co-répresseur identifié est la P-Ser-HPr. Dans un mutant *ptsHI* de *B. subtilis* incapable de former la P-Ser-HPr (mutant contenant l'allèle *ptsHSer46Ala*), un grand nombre d'enzymes cataboliques n'est plus sensible à la répression catabolique (Deutscher *et al.*, 1994). Des expériences de retard d'élution et d'empreinte à la DNase (gel shift, footprint) ont par la suite permis de confirmer que la CcpA a besoin de la P-Ser-HPr pour une meilleure fixation aux sites *cre* (Fujita *et al.*, 1995). Ce modèle de la répression catabolique a également été confirmé par la détermination de la structure du complexe P-Ser-HPr/CcpA/*cre* (Schumacher *et al.*, 2004).

Dans certains cas, lorsque le site *cre* est situé en amont de la région promotrice, la fixation de CcpA ou du complexe CcpA/P-Ser-HPr entraîne une activation de la transcription. C'est le cas de certaines enzymes de la glycolyse. En présence d'un excès de glucose ou de sucres rapidement métabolisables, la glycolyse produit un excès de pyruvate. Dans ces conditions, une partie du pyruvate peut être transformée en acétate et en acétoïne. Les enzymes codées par les gènes *pta* (code pour une phosphotransacétylase) et *ackA* (code pour une acétate kinase) sont impliquées dans ces réactions. La CcpA et la P-Ser-HPr agiraient comme activateur de la transcription des gènes *ackA* et *pta* (Presecan-Siedel *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999).

En outre, le phénomène de répression catabolique chez les firmicutes est différent de celui observé chez les entérobactéries (Stülke and Hillen, 1999). Chez les entérobactéries comme *E. coli*, c'est la protéine P~EIIA^{Glc} et le complexe AMPc/Crp qui interviennent dans la répression catabolique (Botsford and Harman, 1992; Brückner and Titgemeyer, 2002).

L'effet des différents sucres, cellobiose, glucose, fructose, mannose sur l'expression des gènes de virulence chez *L. monocytogenes*, a suscité l'intérêt des auteurs qui ont commencé à chercher un lien entre le métabolisme des sources de carbone et la virulence chez cette bactérie. Youngman et ses collaborateurs ont montré que le glucose, le cellobiose, le fructose et d'autres sucres rapidement métabolisables entraînent une forte réduction de l'activité de PrfA (Milenbachs *et al.*, 1997). D'autres auteurs ont par la suite étudié le phénomène de répression catabolique chez *L. monocytogenes*. Ils ont montré qu'en présence de glucose, le métabolisme de l'arabitol, du cellobiose, du mannose, du maltose, du tréhalose et de la salicine était réprimé (Gilbreth *et al.*, 2004). Ils ont également mis en évidence l'effet répressif du cellobiose sur l'expression du gène *hly*.

L. monocytogenes possède les protéines, CcpA (Duché *et al.*, 2002), HPrK/P et HPr (Christensen *et al.*, 1999) qui toutes, participent à la répression catabolique chez les firmicutes. Behari et Youngman ont également montré que chez *L. monocytogenes*, la protéine CcpA est impliquée dans la répression catabolique. Dans une souche sauvage, l'activité de l'enzyme α -glucosidase, induite en présence du maltose dans le milieu de culture, est réprimée en présence de glucose, de fructose ou de cellobiose. L'activité de cette enzyme est moins réprimée dans un mutant *ccpA* (Behari and Youngman, 1998). Ils ont aussi montré que la répression des gènes de virulence par les hydrates de carbone rapidement métabolisables n'est pas médiée par la répression catabolite CcpA-dépendante (Behari and Youngman, 1998).

c- Rôle dans l'exclusion d'inducteur

Chez les firmicutes ainsi que les protéobactéries, la présence d'un sucre rapidement métabolisable peut inhiber le transport des sucres non-PTS. Ce phénomène a été nommé exclusion d'inducteur. Il a été largement étudié chez les entérobactéries où il constitue le mécanisme principal de la répression catabolique. L'exclusion d'inducteur existe aussi chez les firmicutes et a été étudiée chez *L. casei* (Monedero *et al.*, 2008) et *L. lactis* (Monedero *et al.*, 2001). Chez *L. casei* et *L. lactis*, la présence de glucose ou d'autres sources de carbone rapidement métabolisables inhibe le transport de maltose selon un mécanisme dépendant de la P-Ser-HPr. Chez les firmicutes, seulement les ABC transporteurs seraient contrôlés par l'exclusion d'inducteur. La P-Ser-HPr joue un rôle direct ou indirect dans ce mécanisme car le remplacement de la sérine 46 par alanine ou l'inactivation du gène *HPrK* empêche l'exclusion d'inducteur. En outre, la production massive de la P-Ser-HPr chez *L. casei* (mutant *HPrKV267F*) conduit à une exclusion permanente d'inducteur (le maltose). Ce mutant est incapable de pousser sur le maltose, sucre soumis à l'exclusion d'inducteur comme seule source de carbone.

IV-3- Enzyme II (EII)

Les EIIA et EIIB du PTS sont également impliquées dans la régulation de différents processus métaboliques tels que la répression catabolique, l'exclusion d'inducteur, la régulation des antiterminateurs et des régulateurs transcriptionnels (décrit précédemment).

Chez les entérobactéries, la P~EIIA^{Glc} stimule l'activité de l'adenylate cyclase permettant ainsi une augmentation du taux intracellulaire de l'AMPc qui va interagir avec l'activateur de transcription Crp afin de permettre l'expression de divers opérons cataboliques (Gosset *et al.*, 2004; Harman, 2001). Le complexe AMPc/Crp peut aussi agir comme répresseur de l'expression de certains opérons.

L'EIIA^{Glc} intervient également dans le phénomène d'exclusion d'inducteurs chez les entérobactéries entraînant l'inhibition du transport des sucres non-PTS (tels que le glycérol, lactose, melibiose, maltose) qui sont souvent des inducteurs pour leurs opérons (d'où le nom "inducer exclusion"). L'EIIA^{Glc} se lie soit, aux perméases de ces différents sucres (LacY pour le lactose, MelB pour le melibiose), à la protéine de fixation de l'ATP dans les ABC transporteurs (MalK pour le maltose) ou à une enzyme catabolique comme la GlpK dans le cas du glycérol (de Boer *et al.*, 1986; Deutscher *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 1983; Postma *et al.*, 1993). La forme phosphorylée de la protéine EIIB (P~EIIB) intervient dans la régulation des activateurs transcriptionnels et aussi des antiterminateurs (décrit précédemment) (voir tableau 5 pour les fonctions régulatrices des composants du PTS).

Tableau 5 : Différentes fonctions régulatrices des protéines du PTS (D'après Deutscher *et al.*, 2006)

PTS component	Non-PTS phosphorylation/ interaction Partner(s)	Phosphorylation or interaction	Effect(s) of phosphorylation or interaction
EI (<i>E. coli</i>)	CheA, chemotaxis protein	Interaction	Stimulates CheA autophosphorylation
P~EI (<i>B. subtilis</i>)	CheA, chemotaxis protein	Interaction	Inhibits CheA autophosphorylation
HPr (<i>E. coli</i>)	Glycogen phosphorylase	Interaction	Stimulates glycogen phosphorylase activity
P~His-HPr (<i>E.coli</i>)	Glycogen phosphorylase	Interaction	Prevents binding of HPr to glycogen phosphorylase
P~His-HPr	Antiterminators, BglG, SacY, LicT etc Transcription activators, LevR- like Transcription activators, MtlR- like Transcription activators, LicR- like	Phosphorylation in PRD2 Phosphorylation in the EIIA ^{Man} domain Phosphorylation in PRD2 Phosphorylation in PRD1 and PRD2	Stimulates antitermination,alternate CCR mechanism Stimulates transcription, alternate CCR mechanism Stimulates transcription, alternate CCR mechanism Stimulates transcription, alternate CCR mechanism
P~His-HPr (firmicutes)	Glycerol kinase GlpK LacS, RafP; transporters for lactose, Raffinose	Phosphorylation, His in The N-terminal half Phosphorylation in the EIIA ^{Glc} domain	Stimulates GlpK activity, inducer Exclusion Stimulates substrate/galactose exchange
P-Ser-HPr (firmicutes)	CcpA Non-PTS transporters for matose, Ribose, ect. RbsR	Interaction Interaction Interaction	CCR or CCA, catabolite corepressor Inducer exclusion Physiological role not yet established
P-Ser-Crh (bacilli)	CcpA	Interaction	CCR or CCA, catabolite corepressor
EIIA^{Glc} (enterobacteria)	Non-PTS transporters LacY, MalK, MelB Glycerol kinase, GlpK Fermentation respiration switch Protein, FrsA	Interaction Interaction with the C- terminal domain Interaction	Inducer exclusion Inducer exclusion Probably causes increased respiration
P~EIIA^{Glc} (enterobacteria)	Adenylate cyclase	Interaction	CCR, activation of adenylate cyclase
P~EIIA^{Dha}	DhaL, L subunit of Dihydroxyacetone kynase	Phosphoryl transfer	ADP bound to DhaL is converted into ATP
EIIB^{Glc} (enterobacteria)	Mlc	Interaction	Derepression of genes of the Mlc regulon
P~EIIBs, Glc/Sac/Lac class	Antiterminators, BglG, SacY, LicT, etc.	Phosphorylation in PRD1	Inhibits antitermination, induction mechanism
P~EIIBs, Man/Lac class	Transcription activators, LevR- like	Phosphorylation in PRD2	Inhibits transcription, induction mechanism
P~EIIBs, Mtl/Gut class	Transcription activators, MtlR- like	Phosphorylation in the EIIA ^{Mtl} domain	Inhibits transcription, induction mechanism
P~EIIBs, Lac/Cel class	Transcription activators, LicR- like	Phosphorylation in the EIIA ^{Mtl} domain	Inhibits transcription, induction mechanism

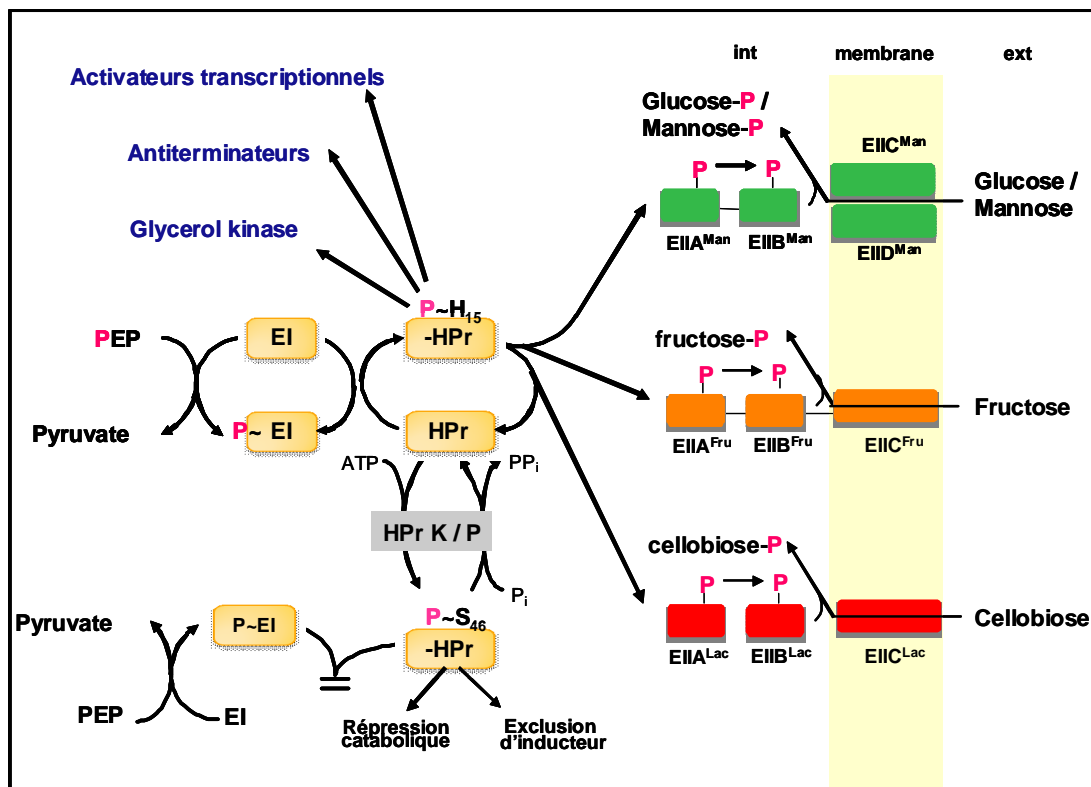


Figure 20 : Organisation du PTS et quelques fonctions régulatrices des composants du PTS

V- Relation entre PTS et virulence

Un grand nombre de fonctions du PTS a été identifié et de nouvelles fonctions régulatrices continuent d'émerger. L'une des fonctions est l'implication du PTS dans la régulation du métabolisme de l'azote. De nombreuses bactéries à Gram- comme *E. coli*, possèdent des orthologues de PTS (PTS^{Ntr}) qui régulent divers processus impliqués dans le métabolisme de l'azote et du carbone (Pflüger-Grau and Görke, 2010). L'implication du PTS dans la régulation du transport de potassium a également été mise en évidence (Lee *et al.*, 2010). De nouvelles études sont aussi basées sur le possible lien entre le PTS et la virulence chez certains micro-organismes (Deutscher *et al.*, 2006).

Le transport de sucres rapidement métabolisables (tel que le glucose) via le PTS a d'influences significatives sur la physiologie cellulaire, la régulation de nombreux gènes impliqués dans l'utilisation et le métabolisme d'autres sources de carbones et aussi sur le

contrôle de l'activité de régulateurs transcriptionnels parmi lesquels, des régulateurs de gènes de virulence.

Chez la bactérie pathogène *Clostridium difficile*, le glucose et d'autres sucres rapidement métabolisables entraînent l'inhibition de l'expression des gènes codant des toxines A et B (Dupuy and Sonenshein, 1998). Antunes et al. ont aussi montré l'implication de la protéine CcpA dans la virulence de *C. difficile*. Ils ont observé dans un mutant ne synthétisant pas de CcpA, une dé-répression de la synthèse des toxines A et B en présence de sources de carbone PTS rapidement métabolisables comme le glucose (Antunes *et al.*, 2011).

Chez *Vibrio cholerae*, la synthèse du régulateur de gènes de virulence HapR est contrôlée via Crp/AMPc et par conséquent dépend de la P~EIIA^{Glc}. Crp/AMPc joue ainsi un rôle dans l'expression de nombreux gènes requis par la bactérie pour survivre chez l'Homme et dans l'environnement (Liang *et al.*, 2007).

Chez *Salmonella enterica*, Hile fonctionne comme répresseur pour les gènes situés sur l'îlot de pathogénicité I. L'expression du gène *hile* est contrôlée par la protéine Mlc qui fonctionne comme répresseur de nombreux gènes et opérons impliqués dans le transport de sucres et leur métabolisme. Mlc est inactivée par séquestration par le domaine EIIB^{Glc} de la protéine membranaire PtsG (Lim *et al.*, 2007).

Chez *Streptococcus mutans*, l'inactivation de l'opéron EIIABC du PTS de la classe glucose entraîne une augmentation de la production du facteur de virulence "fructan hydrolase". Aussi, l'inactivation du gène codant pour la protéine EIIAB du PTS^{Man} entraîne une diminution de la capacité à former des biofilms chez cette bactérie (Abranches *et al.*, 2006).

Chez *Streptococcus suis*, l'inactivation du gène *manN* (codant pour la protéine EIID du PTS de la classe mannose) entraîne l'augmentation de la synthèse de la suilysine, une hémolysine produite par la bactérie et cette inactivation confère à la bactérie un phénotype hyperhémolytique (Lun and Willson, 2005).

Chez *L. monocytogenes*, des mutations entraînant la surexpression d'un gène codant une protéine EIIBCA d'un PTS de la classe β -glucoside (*lmo0027*) ou d'un gène codant une 6-P- β -glucosidase (probablement *lmo0018*) entraîne une résistance de la bactérie à la pédiocine PA-1 (Gravesen *et al.*, 2000). Une résistance aux bactériocines de la classe IIA a été également observée chez les mutants dans lesquels l'EIIC^{Man} est inactive (Kjos *et al.*, 2010).

Aussi, chez *L. monocytogenes*, il a été montré que l'utilisation des sources de carbone rapidement métabolisables (glucose, fructose, mannose, cellobiose, etc.) entraîne une inhibition de l'expression des gènes de virulence (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). Il a également été montré que la présence des ces sucres diminue l'activité de PrfA

sans toutefois affecté le taux de transcription du gène. PrfA étant un régulateur Crp-like, il aurait besoin d'un co-facteur pour être actif (Klarsfeld *et al.*, 1994; Renzoni *et al.*, 1997; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b). En présence d'hydrates de carbone rapidement métabolisables, les protéines du PTS sont sous forme non phosphorylées et ceci entraînerait une forte diminution de l'activité de PrfA (Eylert *et al.*, 2008). Des études ont effectivement suggéré que l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence est régulée par le taux de phosphorylation des protéines du PTS (Herro *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2008). Youngman et ses collaborateurs ont montré l'implication de deux loci (*csr* et *gcr*) dans la régulation de l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004). Le locus *csr* est lié à un système PTS de la classe β -glucosides qui est un PTS incomplet composé seulement des protéines EIIA et EIIB (codé par les gènes *lmo1720* et *lmo1719* respectivement). Cet opéron est précédé du gène *csrA* qui code pour un activateur de transcription LevR-like. Une mutation dans *csr* entraîne une dé-répression des gènes de virulence par le cellobiose. Une mutation dans le locus *gcr* cependant, entraîne un phénotype prfA*-like en présence de cellobiose et aussi d'autres sucres PTS comme le glucose. L'implication d'un autre locus (*bvr*) (codant aussi pour un PTS de la classe β -glucosides) dans la régulation des gènes de virulence a également été montré (Brehm *et al.*, 1999; Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004).

Par ailleurs, en présence de glycérol (sucre non-PTS), une augmentation de l'activité de PrfA est observée. Freitag et ses collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel les protéines EII du PTS en présence de sucres PTS ou de co-facteurs non encore identifiés seraient impliquées dans la régulation de PrfA (Figure 21) (Freitag *et al.*, 2009).

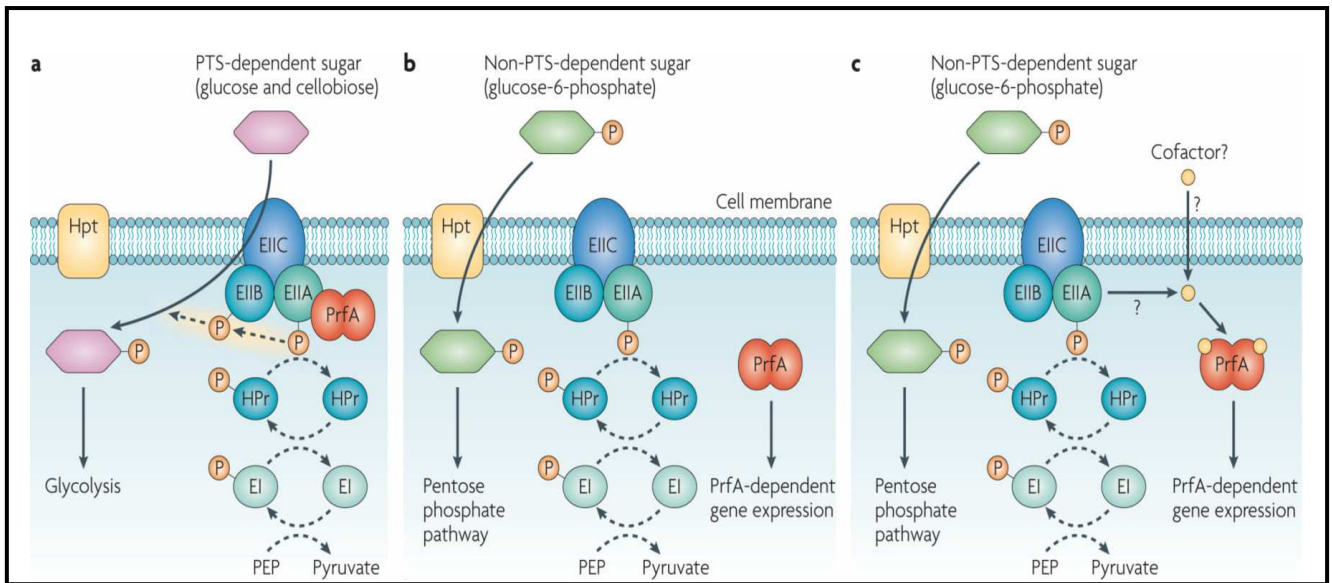


Figure 21 : Modèle représentant l'influence de transporteurs de sources de carbone et leur métabolisme sur l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (D'après Freitag *et al.*, 2009).

a : en présence de sucres PTS, les protéines EII sont sous forme non phosphorylées et la protéine EIIA correspondante pourrait interagir avec PrfA et l'inhiber.

b : en présence de sucres non-PTS comme le glucose-6-phosphate, le transport est réalisé via Hpt, la protéine EIIA est sous forme phosphorylée et ne peut interagir avec PrfA pour l'inhiber.

c : en absence de sucre PTS, PrfA pourrait nécessiter la présence d'un co-facteur (pas encore identifié) afin d'être active.

Le PTS est le système de transport de glucose le plus rencontré chez les firmicutes. Chez *L. monocytogenes*, la présence de glucose ou d'autres sucres rapidement métabolisables transportés par le PTS entraîne une faible activité de PrfA (régulateur transcriptionnel des gènes de virulence chez *L. monocytogenes*). En revanche, l'absence de sucres rapidement métabolisables et la présence de sources de carbone non-PTS (glycérol, hexoses phosphates) entraîne une forte activité de PrfA. La source de carbone semble donc jouer un rôle critique dans la modulation de l'activité de PrfA. Le PTS est impliqué dans la régulation de la virulence chez certaines bactéries (Poncet *et al.*, 2009) dont *L. monocytogenes*. Chez cette bactérie, des études ont montré un possible lien entre le PTS et la virulence (Freitag *et al.*, 2009; Herro *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2008). Cependant, le mécanisme de la régulation de PrfA et des gènes de virulence par le PTS n'a pas encore été bien élucidé. Nous avons ainsi, cherché à étudier l'implication du PTS dans la modulation de l'activité de PrfA.

MATERIELS ET METHODES

I- SOUCHES ET MILIEUX DE CULTURE

I-1- Souches

Les souches de *L. monocytogenes* utilisées au cours de ce travail sont les souches EGDe (Glaser *et al.*, 2001) et AML73 (Freitag *et al.*, 1993). La souche EGDe dont le génome entièrement séquencé, nous a été fournie par P. Cossart, Institut Pasteur (Paris). La souche AML73 issue de la souche de *L. monocytogenes* 10403S dont le génome est partiellement séquencé nous a été fournie par N. Freitag. Cette souche AML73 comporte dans son génome, la fusion *Phly-gus*, où le promoteur du gène *hly* est fusionné avec le gène *gus* ; *hly* est contrôlé par PrfA. Le dosage de l'activité β -glucuronidase nous permet de rapporter l'activité de PrfA. Les souches d'*E. coli* utilisées pour le clonage, la transformation et l'expression de protéines sont les souches NM522 (Gough and Murray, 1983), JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) et Dh5 α (Woodcock *et al.*, 1989).

La souche d'*E. coli* utilisée pour la complémentation hétérologue est la souche LJ140 (Pimentel-Schmitt *et al.*, 2009) qui est incapable de fermenter le glucose. Elle a été fournie par Knut Jahreis. Les différentes souches bactériennes utilisées sont répertoriées dans le tableau 6.

I-2- Plasmides ou vecteurs utilisés

- Vecteur pMAD

Le vecteur pMAD a été utilisé pour la construction des mutants par délétion de gènes ($\Delta ptsI$, $\Delta prfA$, $\Delta manL$, $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$...) et de mutants par insertion (*manL*, *manM*, *mpoA*, *glcU1*, *glcU2*) (Tableau 6). Il contient le gène *erm* conférant la résistance à l'érythromycine et le gène *amp* conférant la résistance à l'ampicilline, une origine de répllication pE194^{ts} Gram+ thermosensible qui permet la répllication du plasmide à des températures inférieures à 32°C, le gène *bgaB* codant pour une β -galactosidase de *Geobacillus stearothermophilus* et un site multiple de clonage. Ce plasmide navette se réplique chez les bactéries à Gram+ mais également chez les bactéries à Gram- car il contient une origine de répllication ColE1. Ce vecteur a une taille de 9,7 kb (Arnaud *et al.*, 2004).

- Vecteurs pAT-18 et pAT-28

Les plasmides pAT-18 et pAT-28 sont utilisés pour l'expression de la protéine PrfA chez les mutants de *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ afin d'identifier par cross-linking des protéines interagissant avec PrfA. Ces plasmides ont également été utilisés pour la complémentation du mutant $\Delta manL$ avec les gènes codant la protéine EIIAB^{Man} entière ou seulement le domaine A ou B. Ces deux plasmides sont identiques excepté que pAT-28 possède un gène de résistance à la spectinomycine et pAT-18, un gène de résistance à l'érythromycine. Ils possèdent une origine de réplication pUC, un fragment $\alpha lacZ$ (fragment du gène *lacZ* qui code pour le N-terminus de la β -galactosidase), une origine de transfert et un site multiple de clonage. Ces plasmides ont une taille de 6,7 kb (Trieu-Cuot *et al.*, 1990).

- Vecteur pSU18

Le plasmide pSU18 de 2,3 kb est utilisé pour la complémentation hétérologue afin de permettre la synthèse des protéines GlcU de *L. monocytogenes* dans *E. coli*. Les gènes *glcU1*, *glcU2* et *glcU3* de *L. monocytogenes* sont intégrés dans pSU18 et les plasmides résultants sont utilisés pour transformer la souche *E. coli* LJ140. Le plasmide contient un gène de résistance au chloramphénicol, le fragment $\alpha lacZ$, un site multiple de clonage et une origine de réplication pACYC184 (Martinez *et al.*, 1988).

Tableau 6 : Différentes souches et plasmide utilisés.

Souches et plasmides	Genotype/Propriétés	Origine
<i>L. monocytogenes</i>		
EGD-e	Souche de laboratoire, serotype 1/2a	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
AML73	Dérivée de la souche 10403S; <i>Phly-gus</i> , serotype 1/2a	(Freitag <i>et al.</i> , 1993)
EM1001	AML73 $\Delta ptsI$ (<i>lmo1003</i>)	Ce travail
EM1002	EGDe $\Delta ptsI$ (<i>lmo1003</i>)	Ce travail
FA1001	AML73 $\Delta manL$ (<i>lmo0096</i>)	Ce travail
FA1002	EGDe $\Delta manL$ (<i>lmo0096</i>)	Ce travail
FA1003	AML73 $\Delta manM$ (<i>lmo0097</i>)	Ce travail
FA1004	EGDe, <i>manL</i> (<i>lmo0096</i>)::pMAD (erm ^R)	Ce travail
FA1005	AML73, <i>glcU1</i> (<i>lmo0169</i>)::pMAD (erm ^R)	Ce travail
FA1006	AML73, <i>glcU2</i> (<i>lmo0176</i>)::pMAD (erm ^R)	Ce travail

FA1007	AML73, <i>manL</i> (<i>lmo0096</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1008	EGDe, <i>manM</i> (<i>lmo0097</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1009	AML73, Δ <i>manL/mpoA</i> (<i>lmo0096/lmo0784</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1010	AML73, Δ <i>manL/glcU1</i> (<i>lmo0096/lmo0169</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1011	AML73, Δ <i>manL/glcU2</i> (<i>lmo0096/lmo0176</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1012	EGDe, <i>manN</i> (<i>lmo0098</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1013	AML73, <i>manM</i> (<i>lmo0097</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1014	AML73, <i>manN</i> (<i>lmo0098</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1015	AML73 Δ <i>mpoA</i> (<i>lmo0784</i>)	Ce travail
FA1016	EGDe Δ <i>mpoA</i> (<i>lmo0784</i>)	Ce travail
FA1017	AML73 Δ <i>mpoB</i> (<i>lmo0783</i>)	Ce travail
FA1018	EGDe Δ <i>mpoB</i> (<i>lmo0783</i>)	Ce travail
FA1019	AML73 Δ <i>prfA</i> (<i>lmo00200</i>)	Ce travail
FA1020	EGDe Δ <i>prfA</i> (<i>lmo00200</i>)	Ce travail
FA1021	AML73 Δ <i>manL/\Delta</i> <i>prfA</i> (<i>lmo0096/lmo00200</i>)	Ce travail
FA1022	EGDe Δ <i>manL/\Delta</i> <i>prfA</i> (<i>lmo0096/lmo00200</i>)	Ce travail
FA1023	AML73 Δ <i>prfA/\Delta</i> <i>ptsI</i> (<i>lmo00200/lmo1003</i>)	Ce travail
FA1024	EGDe Δ <i>prfA/\Delta</i> <i>ptsI</i> (<i>lmo00200/lmo1003</i>)	Ce travail
FA1025	AML73 Δ <i>mpoB/\Delta</i> <i>prfA</i> (<i>lmo00200/lmo0783</i>)	Ce travail
FA1026	EGDe Δ <i>mpoB/\Delta</i> <i>prfA</i> (<i>lmo00200/lmo0783</i>)	Ce travail
FA1027	AML73, <i>mpoA</i> (<i>lmo0784</i> ::pMAD (<i>erm</i> ^R))	Ce travail
FA1028	Δ <i>prfA</i> EGDe, <i>prfA</i> (<i>lmo0784</i>)/ <i>streptag</i> ::pAT-28 (<i>spect</i> ^R)	Ce travail
FA1029	EGDe, Δ <i>prfA</i> (<i>lmo0784</i> ::pAT-28 (<i>spec</i> ^R))	Ce travail
<i>E. coli</i>		
LJ140	\square <i>ptsHIcrr</i> :: <i>kan</i> (<i>kan</i> ^R)	(Pimentel-Schmitt <i>et al.</i> , 2009)
LJ140[pSU18c]	\square <i>ptsHIcrr</i> :: <i>kan</i> (<i>kan</i> ^R) (<i>cat</i> ^R)	Ce travail
LJ140[pSU18c- <i>glcU1</i>]	\square <i>ptsHIcrr</i> :: <i>kan</i> (<i>lacZ-glcU1</i>) (<i>kan</i> ^R) (<i>cat</i> ^R)	Ce travail
LJ140[pSU18c- <i>glcU2</i>]	\square <i>ptsHIcrr</i> :: <i>kan</i> (<i>lacZ-glcU2</i>) (<i>kan</i> ^R) (<i>cat</i> ^R)	Ce travail
LJ140[pSU18c- <i>glcU3</i>]	\square <i>ptsHIcrr</i> :: <i>kan</i> (<i>lacZ-glcU3</i>) (<i>kan</i> ^R) (<i>cat</i> ^R)	Ce travail
NM522	<i>supE thi-1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>mcrB-hsdSM</i>) (<i>r_k</i> - <i>m_k</i> -) [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ GM15]	(Gough and Murray, 1983)
NM522[pSU18c]	<i>supE thi-1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) Δ (<i>mcrB-hsdSM</i>) (<i>r_k</i> - <i>m_k</i> -) [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ GM15] (<i>cat</i> ^R)	Ce travail
Dh5 α	<i>endA</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ <i>m_k</i> ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (<i>Nal</i> ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
Dh5 α [pSU18c]	<i>endA</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ <i>m_k</i> ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (<i>Nal</i> ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15(<i>cat</i> ^R))	Ce travail
Dh5 α [pAT-28- <i>prfA</i>]	<i>endA</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ <i>m_k</i> ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (<i>Nal</i> ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15 (<i>spec</i> ^R))	Milohanic

JM83	F- <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (str ^R)[Φ80 <i>dlac</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>thi</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
JM83[pRK24]	F- <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (str ^R)[Φ80 <i>dlac</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>thi</i> (tra)	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<u>Plasmides</u>		
pMAD	Origine de répliation pE194	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pSU18c	Dérivé de pACYC184	(Martinez <i>et al.</i> , 1988)
pAT-28/18	Origine de répliation pUC	(Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1990)
pRK24	Origine de répliation ColE1	(Figurski <i>et al.</i> , 1979)

I-3- Milieux de culture et croissance des souches

Les milieux utilisés pour la croissance des souches, les tests phénotypiques et la préparation des extraits totaux sont : le milieu liquide et solide LB, le milieu BHI (solide et liquide), le milieu minimum liquide (MM ou MWB), le milieu minimum solide (HTM), le milieu MacConkey solide.

LB (Miller, 1972) (Difco)

- Tryptone.....10 g/l
- Extrait de levure.....5 g/l
- NaCl.....5 g/l

pH 7

BHI : (Difco, Difco laboratories, USA)

- Cervelles de veau, infusion.....200 g/l
- Infusion cœur de bœuf.....250 g/l
- Peptone de protéase.....10 g/l
- Dextrose.....2 g/l
- Chlorure de sodium.....5 g/l
- Phosphate disodique.....2 g/l

MWB ou MM (Premaratne *et al.*, 1991): Milieu minimum liquide pour *L. monocytogenes*

- MOPS pH 7,4100 mM
- KH₂PO₄48 mM
- Na₂HPO₄115 mM
- MgSO₄1,7 mM
- Thiamine1 µg/ml
- Riboflavine.....0,5 µg/ml
- Biotine 0,5 µ g/ml
- Acide lipoic 0,5 µg/ml
- Citrate ferrique.....0,05 mg/ml
- Glutamine.....0,6 mg/ml
- Acides aminés.....0,1 mg/ml
(Cystéine, Leucine, Isoleucine, Arginine, Methionine, Valine)
- Substrats carbonés à différentes concentrations

HTM (Tsai and Hodgson, 2003): Milieu minimum solide pour *L. monocytogenes*

- MOPS pH 7,4100 mM
- KH₂PO₄4,8 mM
- Na₂HPO₄11,5 mM
- MgSO₄1,7 mM
- Thiamine1 µg/ml
- Riboflavine.....0,5 µg/ml
- Biotine0,5 µg/ml
- Acide lipoic0,5 µg/ml
- Cystéine0,1 mg/l
- Méthionine.....0,1 mg/l
- (NH₄)₂SO₄.....0,6 mg/ml
- Substrats carbonés à différentes concentrations

Gélose MacConkey (Difco MacConkey Agar Base)

Peptone.....	17 g/l
Proteose peptone	3 g/l
Sels biliaires.....	1,5 g/l
Chlorure de Sodium	5 g/l
Agar.....	13,5 g/l
Rouge neutre.....	0,03 g/l
Crystal violet.....	0,001 g/l

Les milieux gélosés LB, BHI et HTM sont obtenus par ajout de 1,5% d'agar.

I-4- Conservation des souches

Les souches sont conservées à -80°C à partir de culture liquide ou de colonies issues de réisolement sur boîte. Le milieu de conservation contient du LB ou BHI additionné de 15% de glycérol.

II- METHODES CONCERNANT LE MATERIEL GENETIQUE

II-1- Technique concernant l'ADN

II-1-1- Extraction de l'ADN chromosomique de *L. monocytogenes*

Deux ou trois colonies d'un réisolement de *L. monocytogenes* sur milieu solide BHI sont ensemencées dans 10 ml de BHI liquide sur la nuit. 4 ml de cette culture sont centrifugés à 7000 rpm pendant 10 min. Le culot bactérien est repris dans 200 µl de tampon TE 1X (Tris-HCl 1 M, pH 8 ; EDTA 0,5 M, pH 8), ensuite du lysozyme (4 mg/ml) y est ajoutée. Le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. L'extraction de l'ADN chromosomique est réalisée selon le protocole du kit Qiagen « DNeasy Blood and Tissue Kit ». L'ADN extrait est conservé à 4°C ou à -20°C.

II-1-2- Extraction d'ADN plasmidique

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

II-1-3- Amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction)

L'amplification par PCR à partir d'ADN génomique ou plasmidique a été réalisée en utilisant le Mastercycler (Eppendorf, Hambourg, Germany). La polymérase utilisée est l'enzyme Pfu purifiée au sein du laboratoire à partir de la souche d'*E. coli* BL21 fournie par Franz Narberhaus (Université de Bochum, Allemagne ; la souche a été construite par Torsten Waldminghaus, Norvège). Dans certains cas, la DyNAzyme™ I est utilisée. La quantité d'ADN génomique utilisée comme matrice est de 100 ng et celle de plasmide est de 10 ng. La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant des dNTP de 2,5 mM chacun, des amorces de 1 µM chacun, du tampon Pfu et de la polymérase Pfu.

La PCR permet d'amplifier des fragments d'ADN utilisés pour des clonages et elle est aussi utilisée pour des vérifications de clones. Le programme standard utilisé est représenté dans le tableau 7 et il varie selon le fragment à amplifier. Les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose afin d'avoir une confirmation de la taille du fragment attendu. Les différents produits d'amplification sont ensuite conservés à 4°C ou à -20°C.

Tableau 7 : Programme PCR utilisé pour amplifier les différentes séquences d'ADN.

Étapes	Nombre de cycle (s)	Température (°C)	Durée (min)
Dénaturation	1	94	5
Dénaturation	30	94	0,5
Hybridation		52-55	0,5
Elongation		72	1-3
Elongation	1	72	10
		10°C	

II-1-4- PCR 3 brins

La PCR 3 brins permet de fusionner deux fragments d'ADN préalablement amplifiés par PCR (Figure 22). Deux PCR sont réalisées avec deux paires d'amorces permettant d'amplifier deux fragments. Des sites de restriction ont été ajoutés aux extrémités 5' et 3' des amorces. De plus, 12 pb du fragment 1 (extrémité 3') sont complémentaires aux 12 pb du fragment 2 (extrémité 5'). Une troisième PCR est ensuite effectuée en utilisant comme matrice les deux fragments PCR précédents et comme couple d'amorces, l'amorce 5' du premier fragment et l'amorce 3' du deuxième fragment. Le programme PCR utilisé est décrit dans le tableau 8.

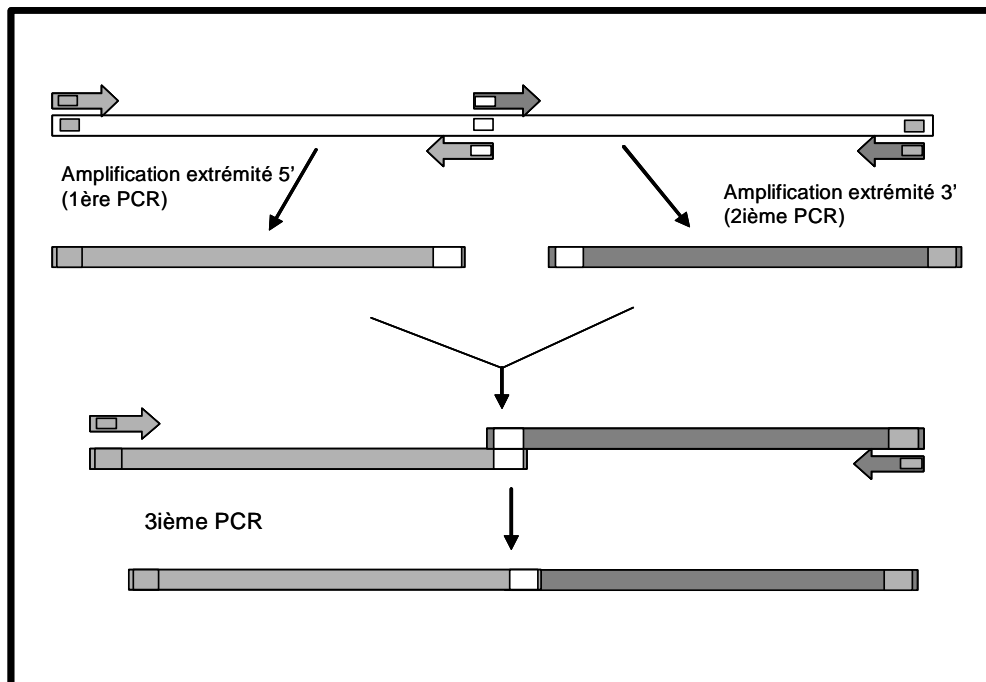


Figure 22 : Modèle schématisant la PCR 3 brins.

Tableau 8 : Programme PCR utilisé pour la PCR 3 brins.

Nombre de cycle (s)	Température (°C)	Durée (min)
1	90	1
	80	0,1
	60	2
	72	10
	90	1
	60	2
	72	3
30	94	0.5
	55	0.5
	72	1
1	72	10
	10	

II-1-5- Electrophorèse de l'ADN

L'ADN chromosomique, plasmidique ou les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ces gels sont préparés à partir de tampon TAE 0,5X (Tris 20 mM, Acétate 50 mM, EDTA 0,5 mM ; pH 8,3). La concentration en agarose des gels varie de 0,8 à 1,5% suivant la taille des fragments d'ADN à migrer. A ces gels est ajouté du bromure d'éthidium (BET) (0,2 µg/ml) pour permettre la visualisation de l'ADN sous lumière ultra violet (UV 365 nm). Les paramètres de migration (voltage, ampérage) sont adaptés en fonction de la taille du gel et de la résolution désirée.

II-1-6- Purification de l'ADN

L'ADN à purifier ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire « 1kb + leader » (Invitrogen) sont mis à migrer sur un gel d'agarose. Le fragment d'ADN correspondant à la taille attendue est découpé sous lumière UV. La bande est découpée et mise dans un tube. La purification est réalisée selon le protocole du Kit « Wizard^R SV Gel and PCR clean-Up System » de PROMEGA. L'ADN purifié est conservé à -20°C.

II-1-7- Digestion et ligature

Les enzymes de restriction utilisées proviennent de New England Biolabs, Invitrogen et Promega. Elles ont été utilisées dans les conditions (sels et température d'incubation) préconisées par les fournisseurs pour digérer les différents fragments d'ADN amplifiés par PCR ou les plasmides utilisés pour les clonages. La ligase utilisée pour les ligatures est la T4 DNA ligase (Gibco BRL/Invitrogen) et elle est utilisée selon les recommandations du fournisseur. Les ligases permettent de liguer les fragments D'ADN et le vecteur digérés par les mêmes enzymes ou des fragments d'ADN avec des bouts francs.

II-1-8- Construction des mutants

Les différentes amorces utilisées pour la construction des mutants ont été choisies en fonction des mutations recherchées. De manière générale, les amorces possèdent des sites de restriction permettant l'insertion des fragments amplifiés par PCR dans le plasmide souhaité. Les différentes amorces et les sites des enzymes de restriction (soulignés) sont mentionnés dans le tableau 9.

- Mutants par inactivation de gènes

Les mutants par insertion (*manL*, *mpoA*, *manM*, *glcU1*, *glcU2*) (Tableau 9) ont été construits en intégrant, par simple recombinaison homologue, dans le génome de la bactérie, le plasmide pMAD portant un fragment interne du gène à muter.

Un fragment interne au gène, de 500 pb, est amplifié par PCR à partir des amorces spécifiques contenant les sites de restriction *BamHI* à l'extrémité 5' et *NcoI* à l'extrémité 3' et ces enzymes de restriction diffèrent selon les mutants (Tableau 9). Le fragment et le vecteur sont digérés par les enzymes de restriction *BamHI* et *NcoI*. Le fragment d'ADN et le vecteur, digérés, sont ligaturés en utilisant la T4 DNA ligase. Le vecteur obtenu est transformé dans *E. coli* NM522. Chez les transformants, la présence du vecteur est vérifiée par PCR avec les amorces du gène, les amorces du vecteur et aussi par séquençage afin de confirmer l'absence de mutations dans le fragment amplifié. Après identification d'un clone positif, le vecteur est extrait et utilisé pour transformer par électroporation, *L. monocytogenes*.

Après électroporation, les cellules sont incubées pendant 3 h à 37°C pour exprimer la résistance à l'érythromycine, puis étalées sur des géloses BHI contenant de l'érythromycine, et incubées à 30°C (température permissive pour la réplique de pMAD) pendant 48 à 72 h. Une colonie est réisolée sur gélose BHI contenant de l'érythromycine et du X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) et incubée à 30°C pendant 48 h. Une colonie est ensemencée dans 10 ml de BHI liquide sans antibiotique et la culture est incubée à 30°C, sur la nuit, sous agitation. 10 ml de BHI sans antibiotique sont ensemencés avec 1% de la culture de nuit et incubés à 42°C sous agitation. Différentes dilutions de cette culture sont étalées sur des géloses BHI contenant de l'érythromycine et incubées à 37°C pendant 48 h (ceci permet de sélectionner des clones ayant intégré pMAD dans le chromosome). Une colonie est réisolée sur gélose BHI contenant de l'érythromycine et du X-Gal et incubée à 37°C pendant 24 à 48 h. Le clone considéré positif est un clone qui aura intégré le plasmide et ce clone est de couleur bleue. Une vérification par PCR est réalisée avec les amorces du vecteur et du gène.

- Mutants par délétion de gènes

Les mutants par délétion de gènes ($\Delta manL$, $\Delta ptsI$, $\Delta prfA$, $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$...) (Tableau 9) ont été construits par double recombinaison homologue (Figure 23). Deux fragments de 500 pb situés en amont et en aval du gène à déléter ont été amplifiés par PCR. La technique de PCR 3 brins a été utilisée pour fusionner ces deux fragments d'ADN. Le fragment d'ADN obtenu possède les sites de restriction *BamHI* à l'extrémité 5' et *NcoI* à l'extrémité 3' (ces enzymes de restriction diffèrent selon les mutants). Le principe de construction de ces mutants est identique à celui décrit pour les mutants par inactivation de gènes excepté une étape d'excision supplémentaire du plasmide permettant d'obtenir la délétion du gène.

Une préculture de 10 ml en BHI est réalisée à partir des clones ayant intégré le plasmide et incubée à 42°C (température non réplique) sur la nuit, sous agitation. 10 ml de BHI sans antibiotique sont ensemencés avec 1% de la culture de nuit et incubés à 30°C sur la journée (cette étape permet l'excision du plasmide du chromosome). Différentes dilutions de la culture sont étalées sur des géloses BHI contenant du X-Gal et incubées à 37°C pendant 48 h. Trois sous-cultures diluées à 1% et incubées à 30°C pendant 8 h, sous agitation, sont réalisées successivement. Différentes dilutions de ces sous-cultures sont étalées sur des géloses BHI contenant du X-Gal et incubées à 37°C pendant 48 h. Ceci permet de sélectionner des clones

blancs (qui ont perdu le plasmide). Les clones blancs sont testés par PCR et par séquençage afin d'identifier le clone positif. Les tests de vérification par PCR sont réalisés avec des amorces situées de part et d'autre de la délétion (amorces ext5' et 3', Tableau 9).

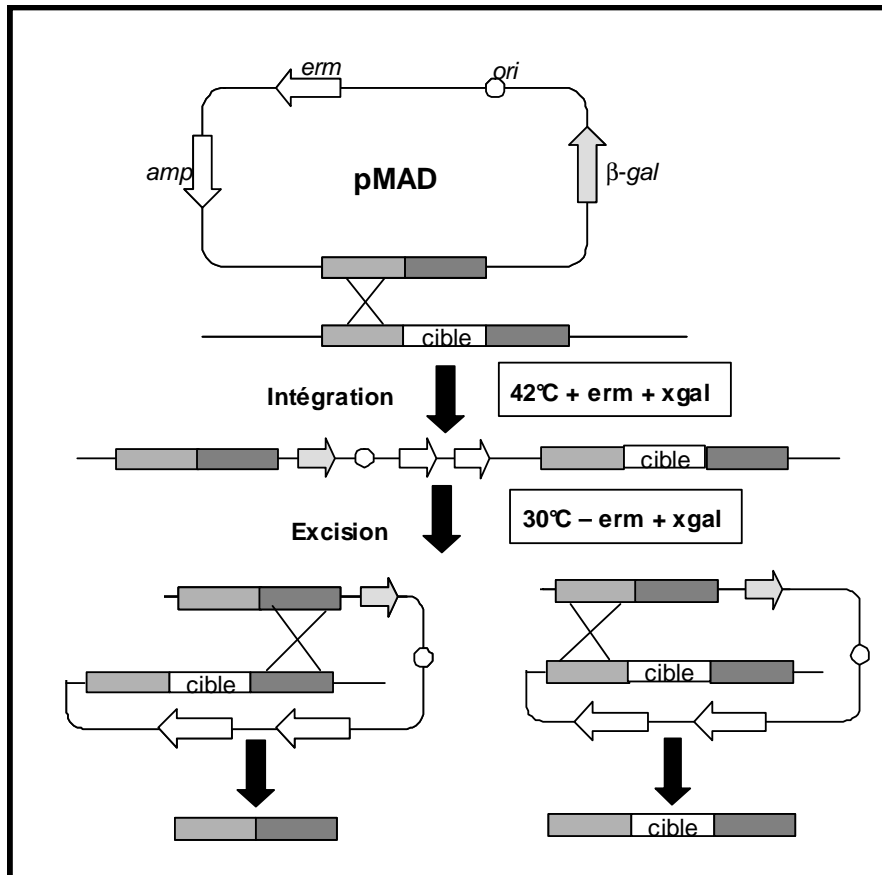


Figure 23 : protocole de mutagenèse avec le vecteur pMAD.

- Souches utilisées pour la complémentation hétérologue

Les gènes *glcU1*, *glcU2* et *glcU3* sont amplifiés par PCR à partir de leurs amorces respectives contenant les sites de restriction *BamHI* et *PstI* (Tableau 9) et leurs propres RBS. Le produit d'amplification est digéré par les sites de restriction appropriés (Tableau 9) et cloné dans le vecteur pSU18 à l'intérieur du fragment α *lacZ* et dans le même sens d'orientation que α *lacZ*. Les gènes *glcU* sont sous le contrôle du promoteur *lac*. Afin d'empêcher une fusion traductionnelle au fragment *lacZ*, un codon stop a été ajouté à la fin de chaque nucléotide 5' ; ce codon est dans la même phase de lecture que le codon d'initiation et

se situe en amont des gènes *glcU*. Le plasmide contenant le gène *glcU* est transformé dans les cellules compétentes d'*E. coli* LJ140 soit par choc électrique ou thermique. Le clone obtenu après transformation est vérifié par PCR et aussi par séquençage afin d'identifier le clone positif (clone qui a intégré le vecteur possédant le gène *glcU* correspondant sans mutation).

Tableau 9 : Liste des amorces et enzymes de restriction utilisées pour la construction des mutants.

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation
<i>ptsI1-5'BamHI</i>	TTAGGATCCACTATAAGCCATTA AAAAGTG	Délétion de EI
<i>ptsI1-3'SalI</i>	CGCGTGCACAATCCCATCAGATGCTGC	
<i>ptsI2-5'SalI</i>	GAAGTGCACGAATTAGTTGAAAAATATACTG	
<i>ptsI2-3'EcoRI</i>	AATGAATTCTACCACAATCCCAAGAATC	
<i>ptsI-ext5'</i>	CACTCCTTCAATTTTCGG	
<i>ptsI-ext3'</i>	GGGAAATTA AACTGATAG	
<i>manL1 5'BamHI</i>	AATGGATCCAGAGAACAACCAGAGTTTCC	Délétion de <i>manL</i>
<i>manL1 3'SalI</i>	ATTCGTGTTTTGGTTCGACCGTGAGTTGCGAGGATA	
<i>manL2 5'SalI</i>	TCGCAACTCACGGTTCGACCAAAACACGAATTAAAG	
<i>manL2 3'NcoI</i>	GTACCATGGCTACGCTGCGTATATTCC	
<i>manL1 ext</i>	GAGAAGGGTTTAGACTGGC	
<i>manL2 ext</i>	GAACGCTGTCTGCTGGAATG	
<i>manL 5'SalI</i>	GAGGTGCACACAATGATTTTCGGCGGAGC	Interruption <i>manL</i>
<i>manL 3'BglII</i>	AGCAGATCTACCAACGTTTACTTGTTCCG	
<i>manM 5'SalI</i>	TCTGTGCACGTCAAGTAGCCACTGCATGGA	Délétion de <i>manM</i>
<i>manM 3'SmaI</i>	CGCGAGAGTTTCCCGGGAAAAATGCAATAAGTACTACTA	
<i>manM2 5'SmaI</i>	TATTGCATTTTTCCCGGGAAACTCTCGCGATCCACT	
<i>manM2 3'BglII</i>	TACAGATCTAGCAACGAAGAATAAGATAGGTCC	
<i>manM1ext</i>	CTACTGAACAGCCACAAGC	
<i>manM2ext</i>	CACCAGAAAGGTCATCAG	
<i>manM1 5'BamHI</i>	AAGGGATCCAGATGAATTTTCAGTTCCATCAGCC	Interruption de <i>manM</i>
<i>manM1 5'NcoI</i>	TGTCCATGGAGAAATTGCTGCTACTACGAAACC	
<i>glcU1-BamHI</i>	GGCGGATCCGTGGGGGATTATGCCATTAG	Interruption de <i>glcU1</i>
<i>glcU1-NcoI</i>	AATCCATGGAGGTA AAAATCGCGTCCCACC	
<i>glcU1ext5'</i>	AATTACGGGAATAGGAATG	
<i>glcU1ext3'</i>	CATATTTAACCACGTTTG	
<i>lmo0169for-BamHI</i>	ATAAGGATCCGAATAAGGGGGAATAAAAAATGAACATAG	Expression de <i>glcU1</i>
<i>lmo0169rev-PstI</i>	TAACTGCAGCATTATATCAAACCGGAAGCTG	
<i>lmo0176for-BamHI</i>	TAAAGGATCCACTAGGAGGAAAACGATATGAACATTATG	Expression de <i>glcU2</i>
<i>lmo0176rev-PstI</i>	GACAAAATGATTGCTCTGCAGTCTTTGATTTG	
<i>glcU2 BamHI</i>	GGCGGATCCACAAGACAACAACGATGG	Interruption de <i>glcU2</i>
<i>glcU2 NcoI</i>	AAGCCATGGCGTTTATTGAAGCGTTTTTC	
<i>glcU2ext5'</i>	TTGAAAATAAATTAAGG	
<i>glcU2ext3'</i>	GATAACAACCTCCTAATTGCG	
<i>lmo0424for-BamHI</i>	AAATGGATCCACTAACCTAGAAAGGAAGCTTATTTATG	Expression de <i>glcU3</i>
<i>lmo0424rev-PstI</i>	GACAAAATGATTGCTCTGCAGTCTTTGATTTG	
<i>mpoA-BamHI5'</i>	AACGGATCCGATTATCGGCAAACAGG	Interruption de <i>mpoA</i>
<i>mpoA-NcoI3'</i>	CCACCATGGCCTGCTGTAAGAGCTGTTTC	
<i>mpoA1 5'-BamHI</i>	TTTGGATCCCGCGAACCAAAAGATATGC	Délétion de <i>mpoA</i>

<i>mpoA1</i> 3'- <i>Sall</i>	GACTTCGGTTTTCGTCGACAGCTTCACCATGTGTGCC	
<i>mpoA2</i> 5'- <i>Sall</i>	CATGGTGAAGCTGTTCGACGAAACCGAAGTCGGGGAG	
<i>mpoA2</i> 3'- <i>NcoI</i>	CTTCCATGGCAGATGCGACTTTACG	
<i>mpoA</i> ext5'	AAAAC TAGGATACAACTC	
<i>mpoA</i> ext3'	TAAACGTTTGCTTTTTTCGG	
<i>mpoB1</i> 5'- <i>BamHI</i>	AGTGGATCCGGATGATTATATCCACGC	
<i>mpoB1</i> 3'- <i>Sall</i>	TAATGGGATAAAGGTCGACGCGATCATCAATACGTGC	Délétion de <i>mpoB</i>
<i>mpoB2</i> 5'- <i>Sall</i>	ATTGATGATCGCGTCGACCTTATCCCATTACTAGAT	
<i>mpoB2</i> 3'- <i>NcoI</i>	TGACCATGGGCAGCTAGAGGAATCGCAAG	
<i>mpoB</i> ext5'	AGTACACGCTTACAAAAGCC	Délétion de <i>mpoB</i>
<i>mpoB</i> ext3'	CAGATTACCTTCCTTACC	
<i>prfA1</i> 5'- <i>BglII</i>	TCCAGATCTCTTATCAAGCTTCCAAAGC	
<i>prfA1</i> 3'- <i>Sal</i>	AGCAGGACATGCGTCGACATATTTTTTGAATTCTTC	Délétion de <i>prfA</i>
<i>prfA2</i> 5'- <i>Sall</i>	TTCAAAAAATATGTCGACGCATGTCCTGCTACTTGG	
<i>prfA2</i> 3'- <i>NcoI</i>	TGACCATGGTGGAGTTACTCGTGCC	
<i>prfA</i> ext5'	GCGCACCTAACCAAGTAATTCAAG	
<i>prfA</i> ext3'	CCAATTGATCACTTGAACGCAG	
<i>manN1</i> 5'- <i>BamHI</i>	AGCGGATCCCTCTACGTTCAATCAAG	Interruption de <i>manN</i>
<i>manN</i> 5'- <i>NcoI</i>	AAGCCATGGCCAATCAATGTACGCACC	
pUC_-48	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	Vérification des inserts
PUC_-40	GTTTTCCCAGTCACGAC	
pMAD_5'	GCGAGAAGAATCATAATGGG	Vérification des inserts
pMAD_3'	GTTACACATTAaCTAGACAG	

II-2- Technique concernant l'ARN

II-2-1- Extraction de l'ARN de *L. monocytogenes*

Une culture est réalisée en effectuant une dilution d'une culture de nuit, soit en milieu MM additionné de glucose (5 mM, 10 mM ou 25 mM), soit en milieu BHI. A des DO₆₀₀ correspondants aux phases exponentielles (0,7-0,8) et stationnaires de croissance, 30 à 40 ml de culture en MM sont récupérés et centrifugés à 7000 rpm pendant 10 min. Pour la culture en BHI, les cellules sont récoltées en phase exponentielle à une DO₆₀₀ comprise entre 0,7 et 0,8 et ensuite centrifugées. Le culot bactérien est soit conservé à -80°C (pour être traité plus tard) ou traité immédiatement en gardant les échantillons dans la glace. Les cellules sont lysées par des billes de verre de 200 à 300 µm (SIGMA) à l'aide du Fast Prep^R-24 MP (Qbiogene, California, USA) à une puissance de 6 pendant 30 secondes. Les cellules sont mises dans la glace pendant 5 min et lysées à nouveau. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C pendant

10 min. L'extraction de l'ARN est réalisée selon le protocole du kit Qiagen « RNeasy mini Kit ». L'ARN extrait est conservé à -80°C.

II-2-2- Analyse de la qualité de l'ARN

L'ARN est dosé au Nanodrop « NanoDrop spectrophotometer ND-1000 Babtech » (Paris, FRANCE) afin d'estimer la quantité et la qualité de l'ARN préparé. L'ARN montre une adsorption maximale à 260 nm et les contaminants protéiques, à 280 nm. La qualité de l'ARN est meilleure lorsque le rapport 260/280 est de 2 ou proche de 2. L'analyse de l'ARN est également réalisée à l'aide du Bioanalyseur « Agilent 2100 Bioanalyseur » (Waldbronn, GERMANY), selon le protocole du kit « Agilent RNA 6000 Nano kit Quick Start Guide » fourni par Agilent. L'ARN extrait est enfin analysé par migration électrophorétique sur gel d'agarose 2%.

II-2-3- Traitement à la DNase de l'ARN

L'ARN extrait et conservé à -80°C, est décongelé dans la glace. Le traitement à la DNase est réalisé selon le protocole du Kit Ambion « Turbo DNA Free ». Un mélange réactionnel contenant 10 µg d'ARN, 5 µl de tampon et 1 µl de DNase dans un volume de 50 µl est incubé à 37°C pendant 20 min. 1 µl de DNase est ajouté et le tout est à nouveau incubé à 37°C pendant 20 min. Ensuite, 5 µl d'inhibiteur de DNase sont ajoutés au mélange qui est incubé pendant 2 min à température ambiante, puis centrifugé à 13000 rpm pendant 1 min. Le surnageant qui constitue l'ARN traité est récupéré et congelé à -80°C. L'ARN est dosé à nouveau au NanoDrop afin d'estimer la quantité pour la réalisation de la reverse transcription.

II-2-4- Vérification par PCR de L'ARN traité

Afin de confirmer l'absence de contamination par de l'ADN génomique résiduel, une PCR est réalisée sur 1 µg d'ARN à partir des oligos rpoB-RFT et rpoB-RRT (Tableau 11) et selon le programme PCR classique mentionné dans le tableau 7.

II-2-5- Reverse Transcription (RT) de L'ARN

La réaction de reverse transcription est réalisée selon le protocole du Kit Invitrogen « superscript III^R, reverse transcriptase ». Un mélange réactionnel contenant 1 µg d'ARN, 0,5 mM dNTPs et 500 ng d'hexamères est incubé à 70°C pendant 10 min. Après incubation, du tampon, 5 mM de dithiothreitol (DTT) et 40 U d'inhibiteur de RNase (RNase out, Invitrogen) sont ajoutés au mélange qui est incubé pendant 2 min à 42°C. L'enzyme Superscript III est ensuite ajoutée et le tout est incubé pendant 2 h à 42°C. Après la réaction de reverse transcription, l'enzyme est inactivée pendant 15 min à 70°C. Les cDNA obtenus sont conservés à -20°C.

II-2-6- Quantitative PCR (qPCR)

La PCR quantitative permet de quantifier la quantité de cDNA, donc l'expression d'un gène. Cette valeur est corrigée par un gène de référence (*rpoB* dans ce travail). La qPCR est réalisée selon le protocole du Kit Roche « LigthCycler^R FastStart DNA SYBR green I ». Le principe est de mesurer la fluorescence pendant la phase linéaire en fonction du temps. La fluorescence est apportée par le fluorochrome SYBR Green I contenu dans le Kit. Le fluorochrome s'intercale dans la double hélice d'ADN. Ainsi au cours de la PCR, l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN double brin généré. La détermination du point de fusion permet d'observer la spécificité du gène. Les cDNA utilisés sont dilués au 100^{ème} ou au 1000^{ème}. L'appareil qui permet de réaliser la qPCR est le « LightCycler 1.5 Roche » (Rotkreuz, Suisse). Le programme utilisé est décrit dans le tableau 10.

Tableau 10 : Programme utilisé pour la qPCR

Etapes	Nombre de cycle (s)	Température (°C)	Durée (min)
Dénaturation	1	95	8
Amplification	45	95	0,16
		55	0,1
		72	0,16
Fusion	1	65-95	5
refroidissement		10	

Les amorces utilisées pour la qPCR ont une concentration de 1 µM. Elles sont préalablement testées sur une gamme de dilutions de l'ADN génomique. Une pente correspondant à -3,3 signifie une efficacité de 100% du couple d'amorces. Les amorces sont également testées sur de l'eau afin de vérifier à nouveau qu'elles ne forment pas de dimères (si elles n'amplifient pas de fragments). Les différentes amorces utilisées pour la qPCR sont mentionnées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Amorces utilisées pour la réalisation de la qPCR.

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation
<i>actA</i> -F	AGCAGATGAGTCTTCACCACA	Quantitative PCR
<i>actA</i> -R	CCCTGCACTTTTATCAACAATC	Quantitative PCR
<i>hly</i> -F	ATGCAATTTTCGAGCCTAACCT	Quantitative PCR
<i>hly</i> -R	TTATTGTCTTGATTAGTCATAC	Quantitative PCR
<i>plcA</i> -F	AATGCATCACTTTCAGGTGTATTAGA	Quantitative PCR
<i>plcA</i> -R	GTTGATTAGTGGTTGGATCCGATAA	Quantitative PCR
<i>plcB</i> -F	TCAAGGAATATATGATGCGGATCAT	Quantitative PCR
<i>plcB</i> -R	CTTTGCTCCTGTTATTTTCGCATTA	Quantitative PCR
<i>prfA</i> -F	CAGGCTACCGCATACGTTATCAAA	Quantitative PCR
<i>prfA</i> -R	AGCCAAGCTTCCCGTTAATCGAAA	Quantitative PCR
<i>Lmo0095</i> -F	AGGGGATATTACTTTAACGGC	Quantitative PCR
<i>Lmo0095</i> -R	TGTTCTTTGCCAGTCTAAACC	Quantitative PCR
<i>glcU1</i> -F	GCATTTACACAAGTAGGCGT	Quantitative PCR
<i>glcU1</i> -R	TCCCGATAATAATTAATGCTAATGCG	Quantitative PCR
<i>glcU2</i> -F	GATGGTTATAAGTGCCTAATTATG	Quantitative PCR
<i>glcU2</i> -R	GTTGCGACTCCAACAAG	Quantitative PCR
<i>manR</i> -F	CTTCTCGCAACATGCCA	Quantitative PCR
<i>manR</i> -R	GACAAGCCCGCCTTTATC	Quantitative PCR
<i>manL</i> -F1	CTACATAAAGATAAGTGGGC	Quantitative PCR
<i>manL</i> -R1	GTTCTTCTGGTTTAAACGC	Quantitative PCR
<i>manM</i> -F1	CAGCATGTATCATCCTTGGC	Quantitative PCR
<i>manM</i> -R1	TTGCGGACGGAATACCTG	Quantitative PCR
<i>mpoA</i> -F1	TATTACCTTTGTCCCTGG	Quantitative PCR

<i>mpoA</i> -R1	GGCGATTTGACTAGATG	Quantitative PCR
<i>mpoB</i> -F1	GCTAGTGTTGTTGATGTGC	Quantitative PCR
<i>mpoB</i> -R1	GGAATGCCATACCACCAAT	Quantitative PCR
<i>ptsI</i> -R	GGAATCCTAAGAATGGGTTTCATTT	Quantitative PCR
<i>ptsI</i> -F	CAACGGAAGAAGAGCAGT	Quantitative PCR
<i>Lmo0027</i> -F	TCCTAGGTTACACAGCAATG	Quantitative PCR
<i>Lmo0027</i> -R	TGTTACGTGAATTGGAGATTCAAA	Quantitative PCR
<i>rpoB</i> -F2	CAGAAACTGGTGAAATTATCGC	Quantitative PCR
<i>rpoB</i> -R2	TAGATTGAACGAGTACGCTATCTT	Quantitative PCR
<i>rpoB</i> _FRT	GCGGATGAAGAGGATAATTACG	Vérification de l'ARN traité à la DNase
<i>rpoB</i> _RRT	GGAATCCATAGATGGACCGTT	

III- METHODES CONCERNANT LES CELLULES

III-1- Préparation de cellules compétentes d'*E. coli*

III-1-1- Préparation des cellules électrocompétentes

Un litre de LB estensemencé avec 1% d'une préculture de nuit et incubé à 37°C sous agitation jusqu'en phase exponentielle de croissance (DO_{600} comprise entre 0,6 et 0,7). La culture est gardée sur la glace pendant 15 à 30 min puis centrifugée pendant 20 min à 5000 rpm. Le culot est repris dans 1 l d'eau froide stérile puis centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm. Le culot est repris à nouveau dans 0,5 l d'eau froide stérile et centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans 20 ml de glycérol 10% froid, puis centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm. Le culot est ensuite repris dans un volume final de 2 ml de glycérol 10%. Des aliquots de 100 μ l sont conservés à -80°C.

III-1-2- Préparation des cellules thermocompétentes

Différents tampons sont utilisés pour la préparation des cellules compétentes d'*E. coli* :

- Tampon RF1 composé de : 30 mM d'acétate de potassium, 100 mM de RbCl₂, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂, 15% de glycérol final (volume/volume). Le pH de l'ensemble est ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique 0,2 M. Le tout est stérilisé par filtration et stocké à 4°C.

- Tampon RF2 composé de : 10 mM de MOPS, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de RbCl₂, 15% de glycérol (volume/volume). Le pH de l'ensemble est ajusté à 6,5 avec du KOH. Le tout est stérilisé par filtration et stocké à 4°C.

Une préculture en LB est réalisée à partir de quelques coloniesensemencées sur LB solide contenant du MgSO₄ à 5 g/l final. 100 ml de LB sontensemencés avec 1% de la préculture de manière à avoir une DO₆₀₀ de 0,02. La culture est incubée à 37°C jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,5. La culture est gardée sur la glace pendant quelques minutes et ensuite centrifugée pendant 5 min à 6000 rpm. Le culot est repris dans du tampon RF1 froid (à raison de 2/5 du volume de départ : soit 40 ml de RF1 pour un volume de départ de 100 ml), ensuite la suspension est gardée pendant 5 min dans la glace et centrifugée pendant 5 min à 6000 rpm à 4°C. Le culot est repris dans du tampon RF2 (à raison de 1/25 du volume de départ : soit 4 ml de RF2 pour un volume de départ de 100 ml) et la suspension est laissée pendant 5 min dans la glace. Des aliquots de 100 µl sont ensuite conservés à -80°C.

III-2- Transformation des cellules compétentes d'*E. coli*

III-2-1- Transformation par choc électrique

Les cellules compétentes conservées à -80°C sont transférées dans la glace jusqu'à décongélation. Ensuite 50 µl de cellules compétentes et 0,5 ou 5 µl d'ADN (vecteur natif ou produit de ligation, respectivement) sont déposés dans un tube Eppendorf stérile préalablement mis dans la glace. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation froide puis déposé dans la glace pendant quelques minutes. Le choc électrique est réalisé à l'aide du Gene Pulser (Bio-Rad) sous les paramètres suivants : 2,5 kV, 25 µF, 100 Ω. Après le choc électrique, les cellules sont immédiatement resuspendues dans 1 ml de LB puis incubées

à 37°C pendant 30 min à 1 h afin de laisser les cellules développer la résistance contre l'antibiotique associé au plasmide. Les cellules sont ensuite étalées sur gélose LB contenant l'antibiotique approprié et éventuellement 100 µg/ml de X-Gal et 1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Les géluses sont ensuite incubées à 37°C pendant 16 à 24 h.

III-2-2- Transformation par choc thermique

Les cellules compétentes conservées à -80°C, sont transférées dans la glace pendant 10 à 15 min jusqu'à décongélation. Les tubes contenant l'ADN à transformer sont également mis dans la glace pendant le temps de décongélation des cellules compétentes. Un mélange de 50 à 100 µl de cellules compétentes et 1 à 5 µl d'ADN est réalisé. Le mélange est gardé dans la glace pendant 30 min. Un choc thermique à 42°C est ensuite effectué pendant 1 min. Après le choc thermique, le mélange est de nouveau déposé dans la glace pendant 5 min. Ensuite, 900 à 950 µl de LB sont ajoutés au mélange et le tout est incubé à 37°C pendant 30 min à 1 h afin de laisser les cellules développer la résistance contre l'antibiotique associé au plasmide. Les cellules sont ensuite étalées sur gélose LB contenant l'antibiotique approprié et éventuellement 100 µg/ml de X-Gal et 1 mM d'IPTG. Les géluses sont ensuite incubées à 37°C pendant 16 à 24 h.

III-3- Préparation de cellules électrocompétentes de *Listeria*

100 ml de BHI sontensemencés avec 1% d'une préculture de nuit et incubés à 37°C sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,2. Ensuite de la pénicilline G à 0,12 µg/ml final est ajoutée à la culture. La culture est laissée sous agitation jusqu'à une DO₆₀₀ comprise entre 0,8 et 0,9 puis centrifugée pendant 20 min à 4000 rpm. Le culot est repris dans 100 ml de tampon d'électroporation froid (816 mM de sucrose, 1 mM MgCl₂) et la suspension est centrifugée pendant 20 min à 4000 rpm. Le culot est repris à nouveau dans 33 ml de tampon d'électroporation et la suspension est centrifugée à 4000 rpm pendant 20 min. Le culot est repris dans 16 ml de tampon d'électroporation et la suspension est centrifugée pendant 20 min à 4000 rpm. Le culot est repris dans un volume final de 1 ml de tampon d'électroporation. Des aliquots de 100 µl sont congelés à -80°C.

III-4- Transformation des cellules compétentes de *Listeria* par choc électrique

La transformation est réalisée dans les mêmes conditions que celle d'*E. coli* sauf que, le choc électrique est réalisé sous les paramètres suivants : 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω . Après le choc électrique, les cellules sont immédiatement reprises dans 1 ml de BHI puis incubées à 37°C pendant 1 à 3 h afin de laisser les cellules développer la résistance contre l'antibiotique associé au plasmide. Les cellules sont ensuite étalées sur géloses BHI contenant l'antibiotique approprié et éventuellement 100 μ g/ml de X-Gal. Les géloses sont incubées à 30°C (dans le cas de pMAD) ou à 37°C pendant 2 à 3 jours.

III-5- Transformation par conjugaison

La transformation par conjugaison ne nécessite pas de cellules compétentes. Elle utilise trois types de souches (exemple : complémentation d'une souche $\Delta prfA$).

- 1- La souche donatrice contenant le plasmide à transférer (le plasmide doit posséder une origine de transfert) (souche *E. coli* Dh5a contenant le vecteur conjugatif « pAT28 + gène *prfA* »).
- 2- La souche réceptrice (la souche de *L. monocytogenes* $\Delta prfA$).
- 3- La souche d'*E. coli* qui contient le plasmide pRK24 possédant les gènes *tra* qui permet la mobilité du plasmide conjugatif.

La souche contenant le plasmide « pAT28 + *prfA* » estensemencée dans 10 ml de LB contenant de la spectinomycine 60 μ g/ml, la souche $\Delta prfA$ dans 10 ml de BHI et la souche contenant le plasmide pRK24 dans 10 ml de LB contenant de la tétracycline 10 μ g/ml, et incubée sur la nuit, à 37°C, sous agitation. Le lendemain, les cultures sont lavées en BHI pour éliminer l'antibiotique et 100 μ l de chaque culture sont déposés sur un filtre Millipore préalablement déposé sur une gélose BHI qui est ensuite incubée à 37 °C pendant 18 h. Le lendemain un amas de colonies est observé sur la gélose. Cet amas de bactéries est prélevé et resuspendu dans 1 ml de BHI. Les cellules sont ensuite étalées sur géloses BHI contenant de la colistine 10 μ g/ml, de l'acide nalidixique 50 μ g/ml et de la spectinomycine 60 μ g/ml. Les géloses sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 h. La colistine et l'acide nalidixique permettent d'éliminer toutes les souches d'*E. coli*, la spectinomycine permet d'éliminer toutes les souches de *Listeria* n'ayant pas intégré le plasmide « pAT28 + *prfA* ». Les colonies qui

pousseront sur ces géloses sont des *Listeria* qui auront intégré le plasmide « pAT28 + *prfA* ». La souche de *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ contenant le plasmide « pAT28 + *prfA* » est ainsi obtenue et elle est conservée à -80°C dans du BHI contenant 15% de glycérol. Un schéma classique de la conjugaison est représenté dans la figure 24.

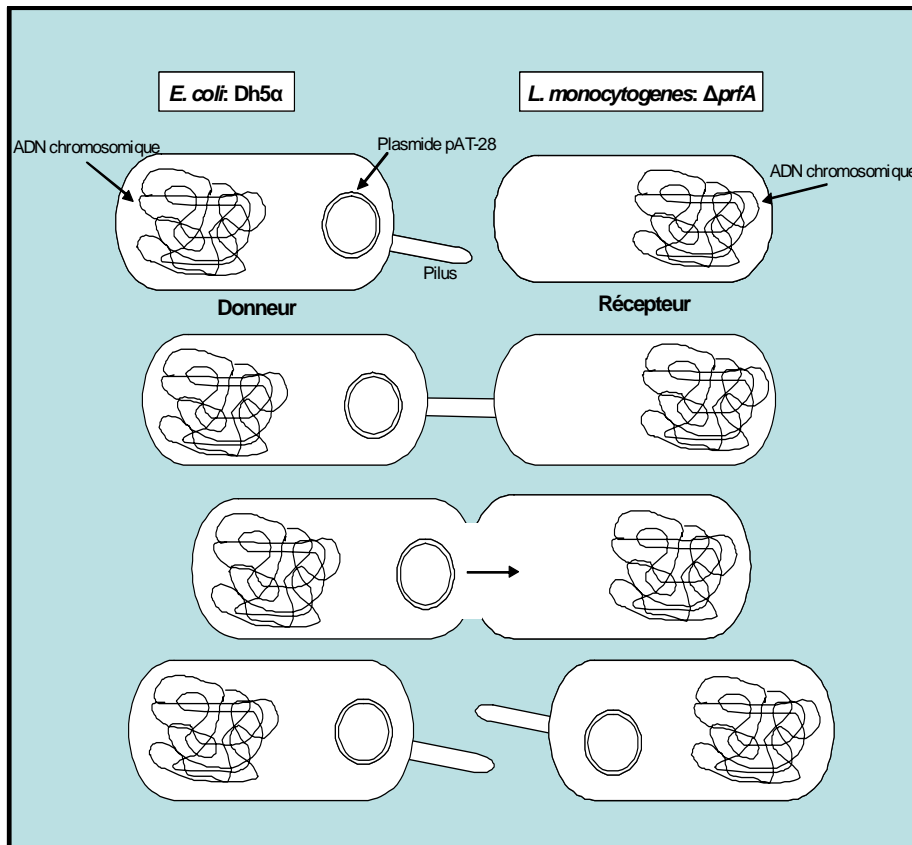


Figure 24 : Schéma classique d'une conjugaison.

IV- METHODES DE CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS OU MUTANTS

IV-1- Résistance aux antibiotiques

Des transformants d'*E. coli* sont sélectionnés sur les antibiotiques appropriés ; ampicilline (100 µg/ml), spectinomycine (60 µg/ml) ou tétracycline (10 µg/ml). Des mutants obtenus par insertion de plasmide dans *L. monocytogenes* (interruption de gènes) sont sélectionnés sur érythromycine (5 µg/ml) et les transformants obtenus par conjugaison sur

colistine (10 µg/ml) + acide nalidixique (50 µg/ml) + antibiotique apporté par le plasmide conjugatif (spectinomycine (60 µg/ml) pour pAT28 *prfA*).

IV-2- Test de criblage bleu/blanc

Le criblage bleu/blanc est utilisé lorsque le plasmide répliatif utilisé porte le gène codant pour le fragment α de la β -galactosidase et la souche transformée porte l'allèle $\Delta lacZM15$ ou lorsque le plasmide intégratif utilisé contient le gène *bgaB* qui code pour la β -galactosidase de la bactérie *Geobacillus stearothermophilus* (comme le plasmide pMAD). Le test bleu/blanc est communément utilisé pour vérifier la présence ou non d'un insert dans le site de clonage. Ce criblage est utilisé pour la construction de mutants par délétion de gène afin de vérifier l'absence du vecteur et il permet aussi d'identifier des transformants contenant des plasmides avec insertion.

Le test bleu/blanc est aussi réalisé lorsque la souche renferme une fusion génique avec le gène rapporteur *lacZ* ou *gus* (exemple: *hly/gus* dans la souche de *L. monocytogenes* AML73) et ceci permet de montrer une activation ou une inhibition de l'activité de PrfA dans les différents mutants construits à cet effet. Le test bleu/blanc est réalisé sur gélose sélective contenant du X-GlcA (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide) ou du X-Gal à 100 µg/ml.

IV-3- Vérification des clones par PCR

Les interruptions et délétions de gènes ont été vérifiées par PCR sur plasmide et sur l'ADN génomique en utilisant des amorces spécifiques des mutations et aussi des amorces situées de part et d'autre du site de clonage du plasmide.

Les PCR sur colonies ont été réalisées pour identifier les clones positifs (les clones correspondants au génotype attendu) aussi bien pour les transformants d'*E. coli* que de *L. monocytogenes*.

La PCR sur colonie chez *E. coli* consiste à prélever une colonie à l'aide d'un cône et de la mettre dans le mélange qui servira à réaliser la PCR.

Chez *L. monocytogenes*, la technique consiste à reprendre quelques colonies isolées dans 200 µl d'eau stérile et le tout est vortexé. La suspension est chauffée au bloc chauffant (Block heater Stuart) pendant 30 à 40 min et est vortexée à nouveau. 5 µl de la suspension sont utilisés pour la PCR.

IV-4- Vérification des clones par séquençage

Les différentes mutations réalisées ont été vérifiées par séquençage effectué par la société Génome Express et Eurogentec (United Kingdom). Les produits d'amplification ou des plasmides ont été séquencés à l'aide des amorces ayant servi pour la vérification des différentes mutations. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences présentes dans les banques de données à l'aide des programmes suivants :

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

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

V- ANALYSE PHENOTYPIQUE DES MUTANTS

V-1- Croissance des souches

Les cultures de *L. monocytogenes* sont réalisées en milieu liquide ou gélosé (MM, LB ou BHI) contenant différentes concentrations de substrats carbonés (glucose, glycérol, cellobiose ...) et incubées à 37°C, parfois à 30°C (souches contenant le plasmide pMAD). La sélection de quelques transformants de *L. monocytogenes* est réalisée en présence de l'antibiotique approprié.

Les cultures d'*E. coli* sont réalisées en LB liquide ou gélosé et incubées à 37°C et la sélection des transformants est réalisée en présence de l'antibiotique approprié. De l'IPTG 1 mM est ajouté au milieu pour l'induction de l'expression de certains gènes.

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

V-2- Dosage de l'activité β -glucuronidase

Le niveau de synthèse de la β -glucuronidase (codée par la fusion *Phly-gus*) sera déterminé par le dosage enzymatique de cette enzyme. Le gène *hly* étant contrôlé par PrfA, ce test permet ainsi d'identifier les mutations qui ont un effet sur l'activité de PrfA. Les différents mutants obtenus sontensemencés dans 10 ml de BHI et incubés à 37°C sous agitation sur la nuit. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu minimum et 5 μ l de ces suspensions bactériennes sont déposés sur du milieu HTM contenant différentes concentrations de glucose (1 à 55 mM) et comme substrat du X-GlcA (100 μ g/ml).

Un test similaire est également réalisé en milieu liquide MM. Le substrat utilisé est le PNP- β -D-glucuronide. Les cellules sontensemencées dans 10 ml de BHI et incubées à 37°C, sous agitation, sur la nuit. 50 ml de MM contenant 5, 10 ou 25 mM glucose sontensemencés avec 1% de la culture de nuit et incubés à 37°C sous agitation. Lorsque la culture en MM atteint la phase exponentielle ou stationnaire (dont la DO_{600} varie selon les mutants), 4 ml de la culture sont centrifugés et le culot est soit conservé à -80°C, soit gardé dans la glace pour être traité immédiatement. Le culot bactérien est repris dans 1 ml de tampon *gus* (0,5 M NaH_2PO_4 ; 0,5 M Na_2HPO_4 ; 0,5 M EDTA, pH 8). La suspension obtenue est ensuite centrifugée à 7000 rpm pendant 4 min et le culot est repris dans 600 μ l de tampon *gus*. La suspension est mise dans un tube contenant des billes de verre de 200 à 300 μ m (SIGMA) et les cellules sont lysées par les billes à l'aide du Fast prep^R-24 MP (Qbiogene, California, USA). Après lyse des bactéries, le lysat obtenu est centrifugé à 15000 rpm à 4°C pendant 10 min. Le surnageant recueilli est conservé à 4°C. Pour effectuer le dosage, 200 μ l de ce surnageant sont mélangés à 800 μ l de tampon *gus* contenant du DTT et du PNP- β -D-glucuronide. Le tout est incubé à 37°C jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. A différents temps, 200 μ l sont prélevés et la réaction est arrêtée par l'ajout de 800 μ l de Na_2CO_3 0,4 M. Le dosage est ensuite réalisé à 415 nm au spectrophotomètre « Pharmacia Biotech Novaspec II » (Cambridge, England). La quantité de protéines des échantillons est estimée par un dosage par la méthode de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) et une mesure de la densité optique à 595 nm.

V-3- Test de consommation de glucose

Le test de consommation de glucose a été réalisé selon le protocole décrit par Viana et ses collaborateurs en 2000 (Viana *et al.*, 2000). Ce protocole a été modifié afin de l'adapter à *L. monocytogenes*. 10 ml de BHI sontensemencés avec les cellules bactériennes correspondantes et incubés à 37°C sur la nuit. Les cellules sont ensuite lavées, utilisées pour une dilution au 100^{ème} dans 50 ml de LB (contenant 25 mM de glucose ou de glycérol 1%) tamponné avec du MOPS et incubées à 37°C sous agitation. A une DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,8, la culture est centrifugée à 7000 rpm pendant 5 min. Les cellules sont lavées avec du tampon phosphate (0,5 M NaH₂PO₄; 0,5 M Na₂HPO₄) à pH 7 puis resuspendues dans 3 ml de tampon phosphate afin d'obtenir une DO₆₀₀ de 1,5. Du glucose 1 mM est ajouté à la suspension et le tout est incubé à 37°C. Des prélèvements de 300 µl sont effectués à des intervalles de temps de 3, 5 ou 7 min selon les souches ainsi qu'au temps 0. Ensuite, les 300 µl de suspension prélevée, sont chauffés à 100°C au bloc chauffant pendant 10 min. La suspension est centrifugée, le surnageant est récupéré et des aliquots de 250 µl sont utilisés pour les réactions de dosage au spectrophotomètre Kontron Bio-teck (BIOSERV) à une DO de 340 nm pendant 1 h en utilisant le programme « Autorate ». Le kit utilisé pour la réaction est le « glucose Assay Reagent » (SIGMA) contenant de l'hexokinase et du glucose-6-phosphate utilisé selon les recommandations du fournisseur.

V-3- Test de complémentation hétérologue : transport de glucose

Le protocole utilisé est décrit par Pimentel-Schmitt en 2009 (Pimentel-Schmitt *et al.*, 2009). Les gènes *glcU*₁, *glcU*₂ et *glcU*₃ de *L. monocytogenes* ont été clonés dans le vecteur d'expression pSU18. Ces constructions ont été introduites dans la souche d'*E. coli* LJ140 incapable d'utiliser le glucose. Le contrôle négatif utilisé est la souche *E. coli* LJ140 contenant le vecteur pSU18 vide et les contrôles positifs sont les souche *E. coli* NM522 et Dh5α contenant le plasmide pSU18 (vide également). Les différents transformants ont été striés sur gélose MacConkey contenant différentes concentrations de glucose (2,5 à 55 mM), du chloramphénicol 20 µg/ml et de l'IPTG 1 mM car l'expression des gènes *glcU* dans pSU18 est inductible à l'IPTG. Des expériences en absence d'IPTG ont également été réalisées. La gélose MacConkey est utilisée pour tester la capacité de certaines bactéries à

fermenter un sucre ou une source de carbone. Ce milieu contient un indicateur de pH (rouge neutre) et le sucre dont on veut tester la fermentation (dans ce travail : le glucose). La dégradation par fermentation de ce sucre provoque une acidification qui fait virer la coloration des colonies au rouge vif grâce à l'indicateur de pH. Les bactéries qui ne fermentent pas le sucre testé restent à pH neutre et ont une couleur beige.

VI- METHODES CONCERNANT LES PROTEINES

VI-1- Extraction de protéines

Une préculture est réalisée dans 50 ml de BHI à partir de la souche appropriée (contenant la protéine à purifier) et incubée sur la nuit, à 37°C, sous agitation. 500 ml de LB contenant 25 mM de glucose sontensemencés avec 1% de la préculture de nuit. La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'en phase exponentielle de croissance. La culture est arrêtée et centrifugée à 7000 rpm à 4°C pendant 10 min. Les cellules sont ensuite lavées avec 500 ml de Tris HCl (0,1 M, pH 7,4). Elles sont centrifugées à nouveau à 7000 rpm, à 4°C, pendant 10 min. Le culot est repris dans 3 ml de tampon de lavage (NaCl 150 mM, Tris HCl 100 mM, EDTA 1 mM). Ensuite, 850 µl de cette suspension sont mis dans 0,6 g de billes de verre contenues dans des tubes. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide du Fast Prep à une puissance de 6 pendant 30 secondes. Les cellules sont gardées dans la glace pendant 5 min, lysées à nouveau et centrifugées. Ensuite, la suspension sans billes est récupérée dans un tube. A cette suspension sont ajoutés de la RNase A (5 mg/ml), de la DNase I (5 mg/ml) et du MgCl₂ 1 M. Le tout est laissé pendant 20 min à température ambiante. Un aliquot de 40 µl est prélevé et le reste de la suspension est centrifugé à 20000 rpm, à 4°C, pendant 20 min. Le surnageant contenant la protéine d'intérêt sous forme soluble est recueilli et un aliquot de 40 µl est prélevé à nouveau. Le reste du surnageant et les différents aliquots sont conservés à 4°C pour des tests de purification.

VI-2- Cross-linking *in vivo*

Le cross-linking *in vivo* est utilisé pour identifier chez *L. monocytogenes*, les interactants de PrfA. 250 ml de LB contenant 25 mM de glucose et de l'antibiotique approprié sont ensemencés avec 2% de préculture de nuit réalisée en BHI et avec la souche appropriée (contenant le gène codant la protéine PrfA inséré dans le plasmide pAT-28). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C sous agitation. A une DO₆₀₀ comprise entre 0,6 et 0,8, la culture est séparée en deux ; dans l'une, du paraformaldehyde à une concentration finale de 0,6% est ajouté et dans l'autre, rien n'est ajouté. Le paraformaldehyde permet la formation de liaisons covalentes entre les protéines formant des complexes irréversibles. La culture non traitée au paraformaldehyde est utilisée comme contrôle. Les deux cultures sont incubées pendant 20 min, à 37°C, sous agitation puis centrifugées à 7000 rpm, à 4°C pendant 10 min. Les cellules sont ensuite lavées avec du Tris HCl (0,1 M, pH 7,4), centrifugées à nouveau à 7000 rpm, à 4°C pendant 10 min. Les culots bactériens sont ensuite congelés à -80°C ou gardés sur la glace pour être traités immédiatement. Les extraits protéiques sont obtenus selon le protocole d'extraction de protéines décrit ci-dessus.

VI-3- Purification des protéines avec des colonnes « streptactin »

La purification des protéines a été réalisée à l'aide du kit « Strep.Tactin^R Purification Kits » (Novagen). Les colonnes sont lavées avec 10 ml de solution de lavage. Les extraits protéiques sont ensuite déposés sur la colonne et les protéines sont retenues dans la colonne grâce à l'interaction streptag-streptavidin. 10 ml de solution de lavage sont déposés à nouveau sur la colonne. Ensuite, les protéines retenues dans la colonne sont récupérées en 6 fractions de 500 µl de la solution d'élution. La quantité de protéines dans ces différentes fractions est estimée par un dosage de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) au spectrophotomètre à 595 nm et aussi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS. Les différentes fractions d'élution sont conservées à 4°C.

VI-4- Dosage des protéines par la méthode de Bradford

La quantité de protéines dans les différents extraits protéiques est estimée par dosage par la méthode de Bradford « Bio-Rad Protein Assay 5X (BIO RAD, München) » au spectrophotomètre à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une protéine de référence, la BSA (Serum Albumine Bovine) et de la solution « Protein Assay » 1X. A cet effet, des quantités de 2, 4, 6, 8 et 10 µg de BSA sont mélangées avec 1 ml de solution de « Protein Assay » 1X. 10 µl des différents extraits protéiques sont également mélangés dans 1 ml de solution de « Protein Assay » 1X. L'absorbance des échantillons « Protein Assay + BSA » et « Protein Assay + extraits protéiques » est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre. La quantité de protéines présentes dans les extraits protéiques est calculée à partir de la gamme étalon.

VI-5- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS

Les protéines sont séparées par électrophorèse en condition dénaturante (SDS) sur gel de polyacrylamide en fonction de leur taille. La concentration en polyacrylamide du gel est de 12,5%. La séparation électrophorétique en condition SDS se déroule en plusieurs étapes dont le montage des plaques, le coulage des gels qui consiste à couler tout d'abord le gel de résolution dans les plaques montées et ensuite le gel de concentration par-dessus le gel de résolution après polymérisation de celui-ci. Après le montage des plaques et le coulage des gels, les échantillons sont préparés et ceci consiste à faire un mélange constitué de 24 µl des différents fractions d'élution ou aliquots de protéines et de 6 µl de tampon Laemmli utilisé pour les gels de protéines. Le tampon Laemmli est composé de glycérol 20%, SDS 5%, β-mercaptoéthanol 1%, bleu de bromophénol 0,25%, Tris HCl 0,1 M (pH 6,8). Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 5 min à 100°C pour permettre la dénaturation des protéines puis déposés dans les puits du gel. Le tout est déposé dans le bac d'électrophorèse dans lequel est ajouté du tampon de migration (Tris 0,025 M, glycine 0,2 M, SDS 0,1%). La migration est effectuée jusqu'à l'arrivée du bleu de bromophénol à l'extrémité inférieure du gel. Les constituants des différents gels sont décrits dans le tableau 12.

Tableau 12 : Composition des gels de résolution et de concentration.

Gel de résolution 12,5%		Gel de concentration	
Acrylamide	2,34 ml	Acrylamide	0,5 ml
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	1,875 ml	Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,225 ml	H ₂ O	3,17 ml
SDS 10%	75 µl	SDS 10%	50 µl
Temed	15 µl	Temed	15 µl
APS 10%	30 µl	APS 10%	30 µl

VI-6- Coloration des gels au bleu de Coomassie

Les gels d'électrophorèse sont colorés au bleu de Coomassie. La coloration au bleu de Coomassie consiste à mettre le gel pendant 1 à 2 h dans un bain colorant constitué de 0,25% (p/v) de bleu de Coomassie (Brillant blue R, Sigma), d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 7% (v/v). Le gel est ensuite décoloré dans une solution de décoloration constituée d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v).

VI-7- Western blot

Après la migration électrophorétique des extraits protéiques, les protéines sont ensuite transférées du gel d'acrylamide vers une membrane de nitrocellulose polyvinylidifluoride (Immobilon-PVDF) (Protran). Ce transfert électrophorétique est réalisé à l'aide d'un electroblotter (Millipore) selon les recommandations du fournisseur. La solution tamponnée utilisée pour le transfert est composée de Tris 25 mM, Glycine 40 mM, Ethanol 20%. Pour la réalisation du transfert, un « sandwich » constitué d'une membrane de nitrocellulose, de papiers Whatman « Whatman chromatography paper » (Maldstone, Angleterre), du gel de polyacrylamide qui a servi de migration électrophorétique, de serviettes, est réalisé et le tout est monté dans l'electroblotter (Figure 25). Les constituants du sandwich sont préalablement trempés dans du tampon de transfert avant le montage. Après le transfert des extraits protéiques du gel vers la membrane de nitrocellulose, la membrane est récupérée et colorée au

rouge Ponceau pendant 2 à 5 min et ceci permet d'évaluer l'efficacité du transfert. Le Western blot est réalisé selon le protocole Biorad (Opti-4CN™ substrat and détection Kit). La membrane est ensuite lavée 2 fois de suite avec du 1X PBS-Tween (PBS 10X, Tween 20 1%) pendant 15 min sous agitation. Elle est ensuite déposée dans un mélange de PBS, Tween et lait (5%) (lait écrémé en poudre : Difco skim milk) sous agitation pendant 1 à 2 h. La membrane est de nouveau incubée dans un mélange PBS-Tween-Lait et du premier anticorps pendant 1 h sous agitation. Trois lavages successifs de 5 min avec du PBS-Tween sont réalisés. La membrane est ensuite incubée dans un mélange PBS-Tween-Lait et du deuxième anticorps pendant 1 h sous agitation. Trois lavages successifs de 5 min avec du PBS-Tween sont effectués à nouveau. Les protéines interagissant avec l'anticorps sont révélées suivant le protocole du Kit Amersham ECL^{plus} Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) par exposition des membranes PVDF aux films « Amersham Hyperfilm™ MP » (GE Healthcare).

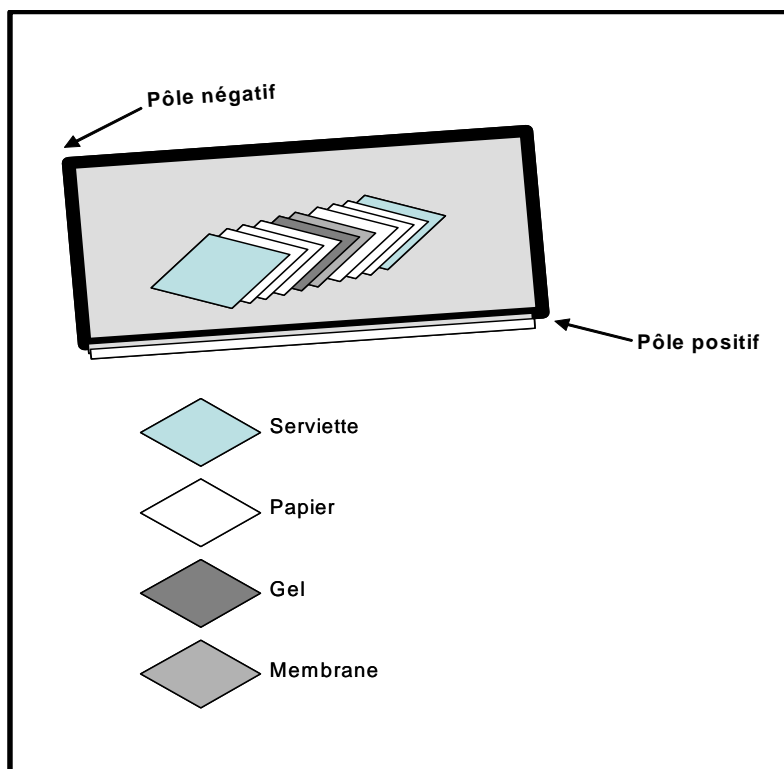


Figure 25 : Schéma du montage d'un transfert protéique.

RESULTATS

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

L. monocytogenes est une bactérie qui fait l'objet de nombreuses études du fait de son pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux. Elle est également étudiée en raison de sa capacité exceptionnelle à s'adapter et à survivre dans des environnements hostiles (basse température, forte concentration en sels ...). *L. monocytogenes* est un pathogène alimentaire (Jacquet *et al.*, 1999; Rocourt and Bille, 1997) responsable chez l'homme de nombreuses infections telles que les infections foeto-maternelles, des méningo-encéphalites et des septicémies (Aureli *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 1997). Des travaux sur la régulation de PrfA et des gènes de virulence PrfA-dépendants ont montré que la protéine PrfA est régulée par plusieurs facteurs environnementaux tels la température, des conditions nutritionnelles et le métabolisme de sucres (Ermolaeva *et al.*, 2004; Johansson *et al.*, 2002; Stoll *et al.*, 2008). Aussi, des études sur la structure tridimensionnelle de la protéine ont permis de mettre en évidence une similarité entre la protéine PrfA et la protéine Crp de *E. coli* (qui nécessite l'AMPc pour être fonctionnelle). L'hypothèse proposée était que PrfA aurait aussi besoin d'un co-facteur encore non identifié pour être fonctionnelle ou que ce co-facteur pourrait inhiber l'activité de PrfA (Eiting *et al.*, 2005; Freitag *et al.*, 2009; Herro *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 1998). De nombreux travaux ont montré que la présence d'hydrates de carbone tels que le cellobiose, le glucose, le fructose, le mannose entraîne une inhibition de l'activité de PrfA et donc de l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants (Datta and Kothary, 1993; Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). Ainsi, les systèmes de transport de ces sucres pourraient probablement être impliqués dans la régulation de PrfA (Mertins *et al.*, 2007; Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004).

Au moment où j'ai débuté ma thèse, le rôle de différents PTS de la classe mannose dans la régulation de PrfA et les mécanismes de régulation de ces PTS n'étaient pas encore bien élucidés. Le transporteur principal de glucose n'avait pas encore été identifié et peu de données sur un possible lien entre ce transporteur et la virulence chez *L. monocytogenes* étaient disponibles. Des études avaient préalablement montré que l'inactivation du gène *resD* (gène impliqué dans la respiration chez *L. monocytogenes*) entraîne une diminution de l'expression de l'opéron *mptABC* (qui a été renommé opéron *manLMN*) et une augmentation de l'expression des gènes de virulence (Larsen *et al.*, 2006). D'autres études ont par la suite suggéré que des composants du PTS^{Man} (codé par l'opéron *manLMN*) ou du PTS principal de

cellobiose (PTS^{Lac}-4) seraient probablement impliqués dans la régulation de PrfA. Ils ont également supposé que l'état de phosphorylation des EIIA ou EIIB jouerait un rôle important dans la régulation de PrfA (Stoll *et al.*, 2008; Stoll and Goebel, 2010). Freitag et ses collaborateurs ont proposé comme hypothèse, que des EII du PTS, seules ou en interaction avec des co-facteurs non encore identifiés, pourraient être impliquées dans la régulation de PrfA (Freitag *et al.*, 2009).

Au vu des données sur le transport des hydrates de carbone et sur leur effet sur la virulence chez *L. monocytogenes* d'une part, et d'autre part, du fait que le glucose soit le sucre préférentiellement utilisé par la bactérie, différentes hypothèses ont été envisagées dans ce travail pour comprendre les mécanismes de modulation de l'activité de PrfA:

- 1- Un composant de l'opéron *man* interagirait avec PrfA pour soit l'activer (composant sous forme phosphorylée en absence de glucose), soit l'inhiber (composant sous forme non phosphorylée en présence de glucose).
- 2- Un intermédiaire de la glycolyse (produit en excès lors de l'utilisation du glucose ou d'autres sucres inhibant l'activité de PrfA) interagirait avec PrfA pour l'inhiber.
- 3- Un composant du PTS^{Man} interagirait avec un intermédiaire de la glycolyse formant ainsi un complexe qui interagirait avec PrfA pour soit l'inhiber (sous forme non phosphorylée), soit l'activer (sous forme phosphorylée).

Afin de mieux comprendre la régulation de PrfA en présence de sucres, par les composants du PTS principalement des PTS de la classe mannose (systèmes codés par les opérons *man* et *mpe*), les objectifs de la thèse ont été centrés autour des points suivants :

- ❖ Etudier le transport de glucose chez *L. monocytogenes* et l'implication des transporteurs PTS de glucose (PTS^{Man}, PTS^{Mpe}) et non-PTS (GlcU).
- ❖ Etudier la régulation de l'expression des gènes codant les composants des PTS^{Man} et PTS^{Mpe} et déterminer le rôle de ManR dans cette régulation.
- ❖ Déterminer l'implication des transporteurs PTS et non-PTS de glucose dans la régulation de PrfA.

- ❖ Etudier les effets de l'inactivation des transporteurs PTS de glucose sur la virulence de *L. monocytogenes* dans des modèles *in vitro* (culture cellulaire) et *in vivo* (modèle animal).
- ❖ Montrer des possibles interactions entre les protéines du PTS et PrfA, principalement les composants des PTS^{Man} et PTS^{Mpo}.

Ce travail s'inscrit dans le cadre des études des interactions pathogène-habitat et pathogènes-hôtes visant à déterminer les différentes protéines nécessaires à la modulation de la virulence PrfA-dépendante.

Un article portant sur les différents travaux réalisés pour répondre aux objectifs de ce travail est mentionné ci après.

I- PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

“Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*”

Francine Aké, Philippe Joyet, Josef Deutscher and Eliane Milohanic

« Accepté à Molecular Microbiology »

Cet article décrit les travaux réalisés sur la caractérisation des différents systèmes de transport de glucose chez *L. monocytogenes*, la régulation des opérons *man* et *mpo* codant les 2 PTS majeurs de transport de glucose chez *L. monocytogenes* et l'effet des mutations *man*, *mpo* et *ptsI* sur la modulation de l'activité de PrfA. L'effet des mutations PTS sur l'activité de PrfA a été étudié en déterminant l'expression de 2 gènes contrôlés par PrfA (les gènes *hly* et *actA*).

I-1- Caractérisation des transporteurs PTS et non-PTS de glucose

Afin d'identifier les transporteurs PTS et non-PTS de glucose, différents mutants ont été construits. Au niveau de l'opéron *man* : les mutants $\Delta manL$, $\Delta manM$; au niveau de l'opéron *mpo* : les mutants $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$; pour les protéines générales du PTS, le mutant $\Delta ptsI$. Pour les transporteurs non-PTS, des recherches de BLAST sur listilist ont permis d'identifier 2 gènes codant des protéines homologues aux transporteurs non-PTS (GlcU) de glucose chez *S. xylosum* (Fiegler *et al.*, 1999) et *L. lactis* (Castro *et al.*, 2009). Ces deux gènes sont situés à proximité l'un de l'autre dans le chromosome (*lmo0169* : *glcU1* et *lmo0176* : *glcU2*) et codent pour des protéines montrant 50% d'identité de séquence avec les protéines GlcU connues (*L. lactis*, *S. xylosum*...). Les mutants par inactivation de gènes *glcU1* et *glcU2* ont été construits.

Les différents mutants ont été testés pour leur capacité à croître sur milieu minimum contenant différentes sources de carbone et pour leur capacité à utiliser le glucose et ceci a été effectué par des tests de consommation de glucose réalisés en présence de 1 mM glucose. Afin de mettre en évidence l'implication des protéines GlcU dans le transport de glucose, des tests de complémentation hétérologues (dans un mutant *E. coli* incapable de transporter le

glucose) ont été effectués. Les résultats montrent que le PTS^{Man} (codé par l'opéron *man*) est le système principal de transport de glucose chez *L. monocytogenes*. Les mutants $\Delta manL$ et $\Delta manM$ montrent une forte diminution de la consommation de glucose (1 mM). De même, le PTS^{Mpo} contribue au transport de glucose mais avec une faible affinité. Le mutant $\Delta mpoA$ consomme le glucose (1 mM) avec une vitesse identique que la souche sauvage. En revanche, le mutant $\Delta mpoB$ consomme moins vite le glucose que les mutants $\Delta manL$ et $\Delta manM$. Ce mutant n'exprime presque plus l'opéron *man*, ce qui explique sa faible capacité à transporter le glucose. La différence de consommation de glucose entre les mutants *man* et le mutant $\Delta mpoB$ peut être considéré comme étant la contribution du PTS^{Mpo} au transport de glucose (1 mM). L'effet le plus important sur l'utilisation du glucose, a été observé au niveau du mutant $\Delta ptsI$. Dans ce mutant, aucun PTS n'est fonctionnel. Du fait que le mutant $\Delta ptsI$ consomme le glucose mais moins vite que le mutant $\Delta mpoB$ (dans lequel le PTS^{Man} et le PTS^{Mpo} ne sont pas fonctionnels) suggère qu'il y'aurait d'autres PTS également capables de transporter le glucose. A cet effet, les gènes codant un PTS de la classe glucose (PTS^{Glc}-1) et un PTS de la classe mannose (PTS^{Man}-4) ont été identifiés et sont fortement exprimés dans des mutants comportant une délétion complète de l'opéron *man* ou de l'opéron *mpo* (Stoll *et al.*, 2008; Stoll and Goebel, 2010). Nos résultats ont également permis de montrer que les protéines GlcU pourraient transporter le glucose mais avec une très faible affinité.

I-2- Régulation des opérons *man* et *mpo*

Différents opérons de transport d'hydrates de carbone via le PTS sont régulés par des activateurs de transcription similaires à ManR qui est nécessaire pour l'expression de l'opéron *man* (Vu-Khac and Miller, 2009). ManR fait partie des régulateurs LevR-like mais les détails du mode de régulation de ManR chez *L. monocytogenes* restaient peu connus. Par des tests de qRT-PCR, nous avons tout d'abord montré que l'opéron *man* est inductible par le glucose et l'opéron *mpo* serait exprimé de manière constitutive. Nous avons ensuite pu observer que, l'activité de ManR serait régulée à trois niveaux :

a- dans un mutant $\Delta ptsI$, on n'a pas d'expression de l'opéron *man* et par conséquent ManR serait inactif car il n'est plus phosphorylé par la P~His-HPr sur l'histidine 506 dans PRD1.

b- dans un mutant $\Delta mpoA$, l'expression de l'opéron *man* devient constitutive car ManR n'est plus phosphorylé par la P~EIIB^{Mpo} sur l'histidine 871 dans PRD2 et donc actif.

c- en revanche, l'insertion d'une cassette de résistance à l'érythromycine dans *mpoA* (aucun gène de l'opéron *mpo* n'est exprimé) ou la délétion de *mpoB*, entraîne une inactivation de ManR indiquant que l'EIIB doit être présente sous forme non phosphorylée afin que ManR soit actif. Ces résultats suggèrent que le PTS^{Mpo} fonctionnerait comme senseur de glucose qui, synthétisé constitutivement, contrôle l'expression de l'opéron *man* en régulant l'activité de ManR.

I-3- Effets des mutations PTS dans la régulation de PrfA

Des études antérieures ont montré l'implication du PTS dans la virulence de *L. monocytogenes* (Stoll *et al.*, 2008). Afin de mettre en évidence des effets des mutations *ptsI*, *man* ou *mpo* dans la virulence chez *L. monocytogenes*, des tests de dosage β -D-glucuronidase sur milieux liquides et solides ont été réalisés en utilisant la souche AML73. Cette souche comporte dans son génome la fusion *Phly-gus*, où le promoteur du gène *hly* est fusionné avec le gène *gus* ; l'expression de *hly* est contrôlée par PrfA. Des tests de qRT-PCR ont également été effectués pour estimer l'expression de gènes contrôlés par PrfA (*actA* et *hly*). Nous avons observé que tous les mutants n'exprimant plus ou exprimant peu le gène *manL* (codant pour la protéine EIIB^{Man}), montrent un effet sur l'expression des gènes de virulence étudiés et par conséquent sur l'activité de PrfA. Afin de démontrer que ces effets observés sont dû à l'activité de PrfA, plusieurs doubles mutants contenant une délétion du gène *prfA* ont été construits à cet effet. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les effets des mutations (*man*, *mpo* et *ptsI*) sur l'expression des gènes de virulence sont exclusivement dépendants de PrfA.

Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*

Running title: Glucose utilization and virulence in *L. monocytogenes*

Francine M. D. Aké, Philippe Joyet, Josef Deutscher* and Eliane Milohanic*

Laboratoire de Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé (MICALIS),
AgroParisTech-INRA UMR1319, 78850, Thiverval-Grignon, France. §

*For correspondence. E-mail Josef.Deutscher@grignon.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 81 54 47 ; Fax (+33) 1 30 81 54 57; E-mail eliane.milohanic@grignon.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 81 54 82 ; Fax (+33) 1 30 81 54 57;

§A major part of this work was carried out at the former Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, CNRS-AgroParisTech-INRA UMR2585, 78850, Thiverval-Grignon, France.

Key words: *Listeria monocytogenes*, phosphotransferase system, glucose transport, PrfA, virulence

This is an Accepted Article that has been peer-reviewed and approved for publication in the *Molecular Microbiology*, but has yet to undergo copy-editing and proof correction. Please cite this article as an "Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07692.x

Mutational analysis of glucose transport regulation and glucose-mediated virulence gene repression in *Listeria monocytogenes*

Running title: Glucose utilization and virulence in *L. monocytogenes*

Francine M. D. Aké, Philippe Joyet, Josef Deutscher* and Eliane Milohanic*

Laboratoire de Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé (MICALIS),
AgroParisTech-INRA UMR1319, 78850, Thiverval-Grignon, France. §

*For correspondence. E-mail Josef.Deutscher@grignon.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 81 54 47 ; Fax (+33) 1 30 81 54 57; E-mail eliane.milohanic@grignon.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 81 54 82 ; Fax (+33) 1 30 81 54 57;

§A major part of this work was carried out at the former Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, CNRS-AgroParisTech-INRA UMR2585, 78850, Thiverval-Grignon, France.

Key words: *Listeria monocytogenes*, phosphotransferase system, glucose transport, PrfA, virulence

Summary

Listeria monocytogenes transports glucose/mannose via non-PTS permeases and phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems (PTS). Two mannose class PTS are encoded by the constitutively expressed *mpoABCD* and the inducible *manLMN* operons. The *man* operon encodes the main glucose transporter because *manL* or *manM* deletion significantly slows glucose utilization, whereas *mpoA* deletion has no effect. The PTS^{Mpo} mainly functions as a constitutively synthesized glucose sensor controlling *man* operon expression by phosphorylating and interacting with ManR, a LevR-like transcription activator. EIIB^{Mpo} plays a dual role in ManR regulation: P~EIIB^{Mpo} prevailing in the absence of glucose phosphorylates and thereby inhibits ManR activity, whereas unphosphorylated EIIB^{Mpo} prevailing during glucose uptake is needed to render ManR active. In contrast to *mpoA*, deletion of *mpoB* therefore strongly inhibits *man* operon expression and glucose consumption. A $\Delta ptsI$ (EI) mutant consumes glucose at an even slower rate probably via GlcU-like non-PTS transporters. Interestingly, deletion of *ptsI*, *manL*, *manM* or *mpoB* causes elevated PrfA-mediated virulence gene expression. The PTS^{Man} is the major player in glucose-mediated PrfA inhibition because the $\Delta mpoA$ mutant showed normal PrfA activity. The four mutants showing PrfA derepression contain no or only little unphosphorylated EIIB^{Man} (ManL), which probably plays a central role in glucose-mediated PrfA regulation.

Introduction

Listeria monocytogenes is a food-borne Gram-positive pathogen that causes the severe disease listeriosis. It can efficiently utilize glucose and was reported to take up this sugar via proton motive force-driven transport as well as via the phosphoenolpyruvate (PEP):carbohydrate phosphotransferase system (PTS) (Christensen and Hutkins, 1994). The PTS is a complex sugar transport system usually composed of five or six proteins or domains. One of them (EIIC) is a trans-membrane protein binding the substrate. Mannose/glucose-type PTSs contain an additional integral membrane protein (EIID). The other four PTS components form a phosphorylation cascade using PEP as phosphoryl donor. The general PTS protein enzyme I (EI) autophosphorylates at a conserved histidyl residue and passes the phosphoryl group on to His15 in the second general PTS component HPr. P~His-HPr transfers the phosphoryl group to usually one of several sugar-specific EIIA proteins, which in turn phosphorylate their corresponding EIIB. In the last step, the phosphoryl group is transferred from P~EIIB to the EIIC-bound (or EIIC/EIID-bound) sugar, which is subsequently released as phospho-derivative into the cytoplasm (Deutscher *et al.*, 2006) (see also Fig. 6).

While listerial glucose-specific non-PTS uptake systems have not been intensively studied, one glucose/mannose transporting PTS has been identified in *L. monocytogenes* and the closely related non-pathogenic *Listeria innocua* and it was called Mpt (mannose permease two) (Dalet *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2005). This PTS resembles the main glucose transporter identified in several firmicutes, because EIIA^{Man} and EIIB^{Man} are fused to a single protein and the corresponding operon is followed by a homologue of *manO*. This gene encodes a protein of unknown function and is usually associated with the *man* operon of firmicutes (Asanuma *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2009; Cochu *et al.*, 2003; Lortie *et al.*, 2000; Yebra *et al.*, 2006). Due to their similarity to the glucose/mannose operon in other firmicutes, we call the genes *lmo0096* to *lmo0098* encoding the *L. monocytogenes* PTS^{Man} (former PTS^{Mpt}) *manLMN*, thereby following the established nomenclature for the glucose/mannose operon in other firmicutes. Compared to the EIID components specific for fructose (Mazé *et al.*, 2004), sorbose (Yebra *et al.*, 2000) or gluconate (Brockmeier *et al.*, 2009), the EIID component of the PTS^{Man} contains an insertion of about 30 amino acids close to the C-terminus (Yebra *et al.*, 2006). Expression of this operon is induced by glucose and mannose (Dalet *et al.*, 2001) and it was suggested to encode the major *L. monocytogenes* glucose PTS (Stoll and Goebel, 2010).

Expression of the listerial *manLMNO* operon is controlled by several regulators. The operon is preceded by a gene coding for a regulator distantly related to Crp/Fnr. Indeed, inactivation of this gene in *L. innocua* (*lin0142*; *lmo0095* for *L. monocytogenes*) strongly inhibited *manL* expression and therefore provided resistance to bacteriocins (Xue *et al.*, 2005). Inactivation of *resD*, which encodes the response regulator of a two-component system controlling respiration and *cydA* expression, also significantly diminished *manL* expression (Larsen *et al.*, 2006). Expression of the *man* operon apparently occurs from a -12, -24 promoter and therefore requires σ^{54} (RpoN) (Arous *et al.*, 2004a; Dalet *et al.*, 2001). The corresponding enhancer DNA binding protein was identified to be ManR (Dalet *et al.*, 2001), a transcription activator resembling LevR from *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*, which each contains two PTS regulation domains (PRDs) (Deutscher *et al.*, 2006). Indeed, mutations altering the potential PTS phosphorylation sites in the two PRDs of ManR affected *man* operon expression (Xue and Miller, 2007), suggesting that similar to LevR, ManR regulation occurs via phosphorylation by PTS proteins.

In contrast to most PRD-containing regulators, the *manR* gene is not located close to the *man* operon, but precedes an operon encoding the proteins of a second mannose-type PTS. This PTS was called *mpo* (for mannose permease one) (Arous *et al.*, 2004b), and it has recently been established that this system can also transport glucose and mannose (Stoll and Goebel, 2010). The *mpo* operon is composed of the four genes *mpoA* to *mpoD* (*lmo0781-0784*) and encodes one of the four glucose/mannose type PTS present in *L. monocytogenes* (Barabote and Saier Jr, 2005; Glaser *et al.*, 2001; Stoll and Goebel, 2010). Homologous proteins of PTS^{Man} and PTS^{Mpo} exhibit between 59 and 75% sequence similarity. The *mpo* operon was also thought to be controlled by ManR, because it contains a potential -12, -24 promoter sequence almost identical to that of the *man* operon (ttggcacagttttgcgt and ttggcacagaacttgcaa, respectively). However, in a global analysis inactivation of *rpoN* did not affect expression of the *mpo* genes (Arous *et al.*, 2004a), arguing against ManR controlling *mpo* expression. Indeed, deletion of *manR* in strain EGD-e had no inhibitory effect on *mpoA* expression but almost completely prevented *man* transcription (Stoll and Goebel, 2010; Vu-Khac and Miller, 2009). Mutations in the *mpo* operon can also lead to partial resistance to bacteriocins, but the effect was claimed to be indirect. Disruption of *mpoA* was reported to lower the expression of the *man* genes, which in turn was thought to be responsible for the observed partial bacteriocin resistance (Arous *et al.*, 2004b).

Most *L. monocytogenes* virulence genes are organized within a pathogenicity island, which is absent from the non-pathogenic *L. innocua*. Expression of these virulence genes

depends on the transcription activator PrfA (Scotti *et al.*, 2007), a Crp/Fnr-like regulator mainly responsible for the saprophyte to pathogen transition of this organism (Freitag *et al.*, 2009). In addition to pH (Behari and Youngman, 1998b), temperature (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992) and general nutritional conditions (Loh *et al.*, 2009), efficient sugar metabolism provides another environmental signal regulating the expression of virulence genes in *L. monocytogenes*. A correlation between carbon metabolism and virulence gene expression has been reported for several other pathogens such as *Streptococcus pyogenes* (Almengor *et al.*, 2007) and *Brucella melitensis* (Dozot *et al.*, 2010) (for reviews, see (Eisenreich *et al.*, 2010; Poncet *et al.*, 2009; Sonenshein, 2007). Growth of *L. monocytogenes* on efficiently metabolized carbon sources such as glucose, cellobiose, fructose, etc., lowers the expression of several virulence genes (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). Catabolite repression of virulence genes does not alter the amount of PrfA in the cells, but affects PrfA activity (Klarsfeld *et al.*, 1994; Milenbachs *et al.*, 1997; Renzoni *et al.*, 1997; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). In addition, virulence gene repression is not mediated via the classical CcpA/P-Ser-HPr mechanism operative in firmicutes, because it persists in a *ccpA* mutant (Behari and Youngman, 1998a). Nevertheless, preliminary experiments suggest that PTS proteins play a crucial role in this repression mechanism (Herro *et al.*, 2005; Mertins *et al.*, 2007). A phosphorylation state-dependent interaction of one or several PTS proteins with PrfA was proposed to control its activity.

We here demonstrate that in *L. monocytogenes* the PTS^{Man} is the major transporter for glucose followed by the PTS^{Mpo}. In addition, we report that components of PTS^{Mpo} control the expression of the *man* operon. For reasons not understood, previously studied mutants carrying a deletion of the entire *mpo* operon or polar insertions in *mpoA* exhibited poor *man* operon expression. We here demonstrate that deletion of only *mpoA* leads to the expected constitutive *man* expression. We also demonstrate that ManR requires unphosphorylated EIIB^{Mpo} in order to be active. The PTS^{Mpo} functions as a glucose sensor, which uses ManR to translate its received signal into regulation of *man* operon expression. We further show that four mutants containing no or only little unphosphorylated EIIB^{Man} (ManL) exhibit derepressed PrfA-dependent virulence gene expression. Finally, we identify three potential non-PTS glucose transporters, which do not seem to play a role in PrfA regulation.

Results

Effects of deletion of the man genes on man and mpo operon expression

Expression of the *man* operon is controlled by several regulators, including ManR (Xue *et al.*, 2005; Xue and Miller, 2007), a LevR-like protein containing several potential phosphorylation domains: two PTS regulation domains (PRDs), an EIIB^{Gat}- and an EIIA^{Man}-like domain. Phosphorylation of these transcription activators in PRD2 (His871 in ManR) requires EI, HPr and the corresponding EIIA and EIIB components. This phosphorylation lowers the activity of the transcription regulator and its absence therefore leads to induction of the genes encoding the corresponding PTS proteins (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004). Replacement of His871 in the PRD2 domain of *L. innocua* ManR with an alanine caused indeed constitutive *man* expression (Xue and Miller, 2007), but it remained unknown which mannose type PTS components are required for ManR phosphorylation and little was known about the regulation of *mpo* expression. We therefore tested by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) whether deletion of *manL* or *manM* in *L. monocytogenes* strain AML73 would have an effect on *man* or *mpo* operon expression. Indeed, expression of the truncated *man* operon in glucose-grown $\Delta manL$ and $\Delta manM$ mutants was 6- to 8-fold higher than in the parental strain AML73 (tested with *manM*- and *manL*-specific primers, respectively) (Fig. 1A), suggesting an autoregulation of the PTS^{Man}. In addition, glycerol-grown AML73 cells contained 17-fold less *man* mRNA than glucose-grown cells, confirming that expression of the *L. monocytogenes* *man* operon is inducible by the presence of glucose (Fig. 1A). Glycerol-grown wild-type, $\Delta manL$ and $\Delta manM$ strains produced low levels of *man* transcripts compared to glucose-grown strains. In contrast, *mpo* operon expression was constitutive and even slightly repressed by the presence of glucose, because glycerol-grown wild-type cells contained about 3-fold higher levels of *mpo* mRNA than glucose-grown cells. In line with this result, *mpo* expression in the $\Delta manL$ and $\Delta manM$ mutants, which utilize glucose less efficiently, was also significantly elevated compared to the wild-type strain (2- to 3-fold) (Fig. 1A).

Antagonistic effects of mpoA and mpoB deletion on man operon expression

Polar insertions in *mpoA* (Arous *et al.*, 2004b) or deletion of the entire *mpo* operon (Stoll and Goebel, 2010), which encodes a second glucose/mannose type PTS (PTS^{Mpo}), were reported to lower *man* operon expression. We also constructed an *mpoA* insertion mutant with polar

effects on the expression of *mpoBCD* genes and this mutant indeed exhibited no expression of the *mpoA* downstream genes and low expression of the *man* operon (data not shown). Components of the PTS^{Mpo} therefore seem to control the activity of the LevR-like transcription activator ManR, the major regulator of the *man* operon (Stoll and Goebel, 2010; Vu-Khac and Miller, 2009). However, LevR proteins are known to exhibit constitutive activity when the corresponding sugar-specific PTS components necessary for their phosphorylation at PRD2 are inactivated (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004). In order to better understand the role of the PTS^{Mpo} components in ManR regulation and consequently *man* operon expression, we constructed mutants carrying a deletion of either *mpoA* or *mpoB*. Interestingly, deletion of *mpoA* led to constitutive expression of the *man* operon. Independently of whether Δ *mpoA* was grown on glycerol or glucose, it contained similar high levels of *man* mRNA. In order to be sure that the constitutive phenotype caused by the *mpoA* mutation was indeed mediated via ManR we constructed an *mpoA manR* double mutant. Deletion of *manR* completely prevented constitutive as well as glucose-induced *man* operon expression in Δ *mpoA*, indicating that the effects of *mpo* mutations on *man* operon expression are indeed mediated via ManR.

In contrast to *mpoA*, deletion of *mpoB* strongly diminished *man* operon expression even in glucose-grown cells (Fig. 1B). According to qRT-PCR experiments, the *mpoB* gene is normally expressed in Δ *mpoA* (tested with *mpoB*-specific primers) (data not shown), but EIIB^{Mpo} is not phosphorylated in Δ *mpoA* owing to the absence of EIIA^{Mpo} (see Fig. 6). In contrast, *mpoB* transcripts are not detectable in the *mpoA* insertion mutant FA1027 (see Table 2) and are of course absent from Δ *mpoB* (data not shown); both strains exhibit low *man* operon expression. These results therefore suggest that ManR requires unphosphorylated EIIB^{Mpo} to be functional.

Complementation of the Δ mpoB mutant with various mpoB alleles

In order to confirm that unphosphorylated EIIB^{Mpo} is required for ManR activation we complemented the Δ *mpoB* mutant with the wild-type and the *mpoBH14A* allele, which encodes a mutant EIIB^{Mpo} in which the phosphorylatable His14 is replaced with a non-phosphorylatable Ala. The Δ *mpoB* mutant complemented with the empty pAT18 exhibited only weak *man* operon expression (data not shown). Complementation with the wild-type *mpoB* allele restored *man* expression during growth on glucose to almost the same level as observed for the wild-type strain AML73. In contrast, low *man* expression was detected when

the complemented strain was grown in the presence of glycerol (Fig. 1C), thus confirming the inducible phenotype. When the $\Delta mpoB$ mutant complemented with the vector containing the $mpoBH14A$ allele was grown on glucose it exhibited 1.5-fold stronger expression of the man operon than $\Delta mpoB$ complemented with wild-type $mpoB$. Unphosphorylated EIIB^{Mpo} is therefore necessary for ManR activation. In fact, expression of the man operon in the strain complemented with the $mpoBH14A$ allele is constitutive because it was also very strong when the strain was grown in the presence of glycerol. The constitutive phenotype probably owes to the absence of the inactivating P~EIIB^{Mpo}-mediated phosphorylation of ManR at His871 (see Fig. 6) (Xue and Miller, 2007).

Deletion of the ptsI gene lowers man operon expression

EI is encoded by the $ptsI$ gene (Christensen *et al.*, 1998) and it is one of the two general PTS proteins (Deutscher *et al.*, 2006). While proteobacteria frequently possess one or more homologues or paralogues of EI, firmicutes usually contain only a single EI, which serves in the phosphorylation cascade for all different sugar-specific PTS. Its inactivation therefore leads to a complete loss of PTS transport function. LevR-like transcription activators also become phosphorylated by PEP, EI and HPr. This phosphorylation is necessary to render the transcription regulator active (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004). We therefore tested whether inactivation of EI would have an effect on man operon expression. Indeed, deletion of the $ptsI$ gene significantly lowered the expression of the man operon in glucose-grown cells (Fig. 1D). In contrast, mpo operon expression in glucose-grown $\Delta ptsI$ mutant was about 2-times higher than in glucose-grown wild-type cells (Fig. 1D). Mutations in $ptsI$ usually exert two opposing effects on PRD-containing regulators. In the case of ManR, $ptsI$ deletion prevents the stimulating ManR phosphorylation by P~His-HPr at His506 and the inhibiting phosphorylation by P~EIIB^{Mpo} at His871. The above results establish that similar to LevR (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004), inhibition of ManR caused by the absence of phosphorylation by P~His-HPr seems to dominate over the activating effect resulting from the absence of phosphorylation via P~EIIB^{Mpo}.

Growth studies and glucose consumption assays with man, mpo and ptsI mutants

In order to determine the effect of the various mutations on glucose utilization, we carried out growth studies and glucose consumption assays as described in Experimental procedures. When grown in minimal medium (MM) complemented with 5 mM glucose, significant

differences in the growth behaviour could be observed (Fig. 2A). The wild-type and $\Delta mpoA$ mutant exhibited the fastest growth followed by the $\Delta manL$ and $\Delta manM$ mutants. The $\Delta mpoB$ mutant grew even more slowly and very slow growth was observed for the $\Delta ptsI$ mutant. The observed differences were mainly due to slower growth during the first 10 h. The differences diminished by increasing the glucose concentration to 10 and 15 mM and completely disappeared at 25 mM, except for the $\Delta ptsI$ mutant (Fig. 2B, C and D). The $\Delta ptsI$ mutant always exhibited a very long lag phase of about 10 to 15 h before it started to grow. This delayed growth does not seem to be due to slowly developing pseudo-revertants or contaminants, because we isolated 5 clones from a culture (MM with 25 mM glucose) of the $\Delta ptsI$ strain approaching stationary phase, which we confirmed to be *L. monocytogenes ptsI* deletion mutants by carrying out PCR with appropriate primers and sequencing the amplified products. In addition, when these clones were again grown in MM supplemented with glucose, they all exhibited the lag phase characteristic for the $\Delta ptsI$ mutant. The lag phase was also observed when an aliquot from an exponential phase culture in BHI medium was used to inoculate fresh BHI medium. The doubling time of the $\Delta ptsI$ mutant was also significantly longer than that of the wild-type strain. Even at 25 mM glucose, exponential growth was about 2-fold slower than with the wild-type strain (Fig. 2D). Similar to other firmicutes, *ptsI* deletion prevented growth on MM containing glycerol (data not shown), probably because glycerol kinase needs to be activated by EI- and HPr-catalyzed phosphorylation at a conserved histidyl residue (Darbon *et al.*, 2002). All other mutants grew on glycerol as fast as the wild-type strain (data not shown).

Results typically obtained during consumption assays with 1 mM glucose are presented in Fig. 3A. The mean values and standard deviations calculated from 7 independent experiments for glucose-grown wild-type, $\Delta manL$ and $\Delta manM$ strains and from at least 4 independent experiments for all other mutants are shown in Fig. 3B. We observed that deletion of either *manL* or *manM* strongly slowed glucose utilization by glucose-grown cells compared to the glucose-grown wild-type strain (Fig. 3A and B). In contrast, deletion of *mpoA* had no significant effect on glucose consumption. PTS^{Man} therefore seems to be the main glucose transporter in *L. monocytogenes*. When the $\Delta mpoA$ mutant was pre-grown on glycerol in place of glucose it also exhibited a high rate of glucose consumption (data not shown). The efficient glucose utilization by the glycerol-grown $\Delta mpoA$ mutant is probably due to its elevated constitutive *man* expression (Fig. 1B).

In contrast, the $\Delta mpbB$ mutant expresses the *man* operon only at a very low level (Fig. 1B) and glucose-grown cells therefore exhibited only slow glucose consumption (Fig. 3). The observed difference in glucose consumption between $\Delta manL$ and $\Delta mpbB$ mutants therefore probably reflects the contribution of PTS^{Mpo} to glucose uptake. The strongest inhibition of glucose consumption was observed for the $\Delta ptsI$ mutant, which nevertheless was still capable of slowly utilizing glucose and to moderately grow on MM containing glucose at concentrations of 15 mM or higher (Fig. 2). *L. monocytogenes* must therefore contain non-PTS glucose transporters with low glucose affinity. Glucose consumption by the $\Delta ptsI$ strain was significantly slower than that observed for the $\Delta mpbB$ mutant (Fig. 3), which produces very little PTS^{Man} (Fig. 1B) and lacks a functional PTS^{Mpo}. This difference suggests that *L. monocytogenes* contains one or more additional glucose-transporting PTS, as was indeed recently reported (Stoll and Goebel, 2010), which probably account for the more efficient glucose consumption by $\Delta mpbB$ compared to $\Delta ptsI$.

Inactivation of genes encoding presumed non-PTS glucose transporters and their functional expression in Escherichia coli

A BLAST search on ListiList (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>) revealed that *L. monocytogenes* possesses three genes encoding homologues of the *Staphylococcus xylosus* (Fiegler *et al.*, 1999) and *L. lactis* (Castro *et al.*, 2009) non-PTS glucose/mannose transporter GlcU. Two of them are located close to each other (*lmo0169* and *lmo0176*) and encode proteins with about 50% identity to known GlcU proteins. The third potential glucose transporter is encoded by *lmo0424* and exhibits only about 35% identity to known GlcUs. In order to determine whether the three potential *L. monocytogenes* non-PTS glucose transporters GlcU1 (*lmo0169*), GlcU2 (*lmo0176*) and GlcU3 (*lmo0424*) can transport glucose, the corresponding genes together with their ribosome binding site were cloned into the vector pSU18c and the resulting plasmids were subsequently used to transform the glucose-negative *E. coli* $\Delta ptsHIcrr$ mutant LJ140 (Pimentel-Schmitt *et al.*, 2009). Indeed, transformation with either the *glcU1*- or the *glcU2*-carrying pSU18c plasmid, but not with empty pSU18c, allowed slow glucose fermentation by LJ140 on MacConkey agar plates when the glucose concentration was 15 mM. At 25 mM glucose, fermentation by the *glcU*-expressing strains was as efficient as in *E. coli* strains containing an active glucose PTS (Fig. S1). Expression of *glcU3* in the *E. coli* $\Delta ptsHIcrr$ mutant LJ140 allowed slow glucose utilization only at 55 mM glucose (data not shown). GlcU1 and/or GlcU2 were therefore assumed to be primarily

responsible for the observed glucose uptake by the *L. monocytogenes* $\Delta ptsI$ mutant and we tested whether inactivation of *glcU1* or *glcU2* would have an effect on glucose transport. We observed that the growth behaviour of the two *glcU* mutants and their glucose consumption activity were very similar to those of the wild-type strain (data not shown). These results suggest that under the conditions tested the GlcU-like low affinity glucose transporters do not significantly contribute to glucose uptake. This assumption was further supported by results obtained with $\Delta manL$ *glcU1* and $\Delta manL$ *glcU2* double mutants, which grew as slowly as the $\Delta manL$ single mutant in MM containing 5 or 10 mM glucose (data not shown). Unfortunately, we did not succeed in constructing the $\Delta ptsI$ *glcU* double or triple mutants or the $\Delta ptsI$ *glcU1* *glcU2* *glcU3* quadruple mutant, which would have allowed us to determine whether one or several of the *L. monocytogenes* GlcU-like proteins are indeed responsible for the slow glucose transport activity observed in the $\Delta ptsI$ mutant at elevated glucose concentrations.

Effect of the man, mpo and ptsI mutations on the expression of a Phly-gus fusion

Although repression of virulence gene expression by glucose and other rapidly metabolizable carbon sources is not mediated via P-Ser-HPr/CcpA, PTS components nevertheless seem to play a major role in this regulatory process (Herro *et al.*, 2005; Mertins *et al.*, 2007). We therefore tested the effect of the various mutations on the activity of β -D-glucuronidase produced from a fusion of the PrfA-controlled *hly* promoter to the β -D-glucuronidase-encoding *gus* gene (*Phly-gus*) in strain AML73 (Behari and Youngman, 1998b). AML73 and the different mutants derived from it were grown to exponential phase in MM containing 5, 10 or 25 mM glucose (Fig. 4) and on solid MM containing glucose between 2.5 and 55 mM (Fig. 5). Interestingly, deletion of the *manL* or *manM* gene caused an approximately 6-fold increase of β -D-glucuronidase activity when the cells were grown to exponential phase in liquid MM supplemented with 5 mM glucose. At higher glucose concentrations, derepression of *Phly-gus* expression was weaker (2- to 5-fold). Strongly elevated *Phly-gus* expression was also observed when the $\Delta manL$ mutant was grown on solid MM complemented with glucose at concentrations between 2.5 and 20 mM (Fig. 5). At higher glucose concentrations *gus* expression was repressed to the level of the wild-type strain. Interestingly, when the $\Delta manM$ mutant was grown on solid MM it exhibited slightly elevated *Phly-gus* expression only at 2.5 and 5 mM glucose. In liquid medium, the $\Delta mpoB$ mutant showed 7- to 12-fold elevated β -D-glucuronidase activity (Fig. 4). It also exhibited very strong *gus* expression when grown on solid MM containing 5 mM glucose, but was repressed to wild-type level at 15 mM or higher

glucose concentrations (Fig. 5). In contrast, when the $\Delta ptsI$ mutant was grown on solid MM it showed elevated β -D-glucuronidase activity over the whole range of glucose concentrations and the highest activities were usually observed at 25 and 50 mM. Similarly, when grown in liquid MM *Phly-gus* expression in the $\Delta ptsI$ mutant was 2-fold elevated at 5 mM glucose and increased to about 8-fold at 25 mM glucose (Fig. 4). Glucose uptake via one or several of the low affinity GlcU-like glucose transporters allows efficient growth of the $\Delta ptsI$ strain only at glucose concentrations higher than 10 mM (Fig. 2). The weak β -D-glucuronidase activity measured at low glucose concentrations therefore probably results from the poor growth of this mutant under these conditions. Finally, deletion of *mpoA* had no significant effect on β -D-glucuronidase activity, which on solid and in liquid media was similar to that measured with the wild-type strain AML73 (Fig. 4 and 5). Similarly, disruption of *glcU1* or *glcU2* did not affect *Phly-gus* expression, neither in liquid nor on solid media (data not shown).

The stimulating effect of the manL, manM, mpoB and ptsI deletions on Phly-gus expression requires functional PrfA

The expression of most virulence genes in *L. monocytogenes* depends on PrfA, a Crp/Fnr-like transcription activator. We nevertheless wanted to exclude the possibility that glucose repression might be mediated via PrfA-independent *hly* expression and therefore tested whether the observed derepression in some mutants requires functional PrfA. Starting from strain AML73 we constructed a *prfA* deletion strain as well as $\Delta prfA$ double mutants containing also deletions of either *manL*, *manM*, *mpoB* or *ptsI*. In the wild-type strain as well as in the $\Delta manL$ mutant, deletion of *prfA* caused a complete loss of *Phly-gus* expression independently of whether the cells were grown in liquid or on solid medium (Fig. 4 and 5). Identical results were obtained with the other three double mutants (data not shown). These results confirm that the stimulating effect of the $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta mpoB$ and $\Delta ptsI$ mutations on *gus* expression is mediated via PrfA.

Effect of the man, mpo and ptsI deletions on the expression of virulence genes

In order to confirm the observed stimulating effect of certain *pts* mutations on PrfA-controlled *hly* expression, we also measured the level of expression of two PrfA-controlled virulence genes, *actA* and *hly*, by qRT-PCR. Compared to the wild-type strain AML73 strongly elevated expression of *hly* and *actA* (up to 200-fold) was observed with the $\Delta manL$, $\Delta manM$ and $\Delta mpoB$ mutants when they were grown to exponential phase in MM containing 5, 10 or

25 mM glucose (Table 1). The weakest stimulating effects were observed for the *ΔmanM* mutant, the strongest for the *ΔmpoB* strain. Similar to the expression of the *Phly-gus* fusion, increased virulence gene expression depended on PrfA, because it was completely absent from the *ΔprfA* mutant and the *ΔmanL/ΔprfA* double mutant (Table 1) as well as the *ΔmanM/ΔprfA* and *ΔmpoB/ΔprfA* mutants (data not shown). The *ΔmpoA* mutant exhibited virulence gene expression similar to the wild-type strain (Table 1). Surprisingly, the *ΔptsI* mutant did not exhibit elevated expression of the virulence genes. Because this was contradictory to the results obtained with the reporter gene fusion, we carried out qRT-PCR experiments and β-glucuronidase assays with cells from the same culture, but again obtained contradictory results. It therefore seems that in the *ΔptsI* mutant the virulence-specific mRNA must be rapidly degraded during RNA preparation.

Discussion

In *L. monocytogenes*, growth on efficiently metabolized carbohydrates such as glucose and cellobiose, exerts a repressive effect on the expression of not only catabolic operons but also certain virulence genes (Behari and Youngman, 1998b; Brehm *et al.*, 1999; Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). PTS components seem to play a major role in the regulation of virulence gene expression, but the molecular details of the underlying mechanisms remained obscure. We therefore characterized transport systems catalyzing the uptake of glucose and studied their impact on virulence gene expression.

So far, two PTS of the mannose class (PTS^{Man} and PTS^{Mpo}) and one PTS belonging to the glucose family (PTS^{Glc-1}, *lmo0027*) have been shown to contribute to glucose transport in *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 2001; Stoll and Goebel, 2010). The *mpo* operon is preceded by the *manR* gene, which encodes the main regulator of *man* operon expression (Xue *et al.*, 2005), a LevR-like transcription activator. These regulators are controlled by phosphorylation via PTS proteins and the absence of phosphorylation by the corresponding sugar-specific PTS proteins leads to constitutive LevR function (Deutscher *et al.*, 2006). It could therefore not be explained why almost no *man* expression occurred in Δ *mpoABCD* deletion and *mpoA* insertion mutants (Arous *et al.*, 2004b; Stoll and Goebel, 2010). In order to understand this discrepancy we studied the effect of *mpo* mutations on *man* expression in more detail. In contrast to *mpoA* insertion, in frame deletion of *mpoA* caused the expected constitutive expression of the *man* operon. Constitutive *man* expression was also observed when His871 in PRD2 of ManR from *L. innocua* (the two listerial ManR exhibit 98% amino acid sequence identity) was replaced with an Ala (Xue and Miller, 2007) or when the *mpoB* deletion strain was complemented with the *mpoBH14A* allele. In contrast, *man* expression was inducible in the Δ *mpoB* strain complemented with the wild-type allele (Fig 1D). It is therefore likely that the absence of ManR phosphorylation by P~EIIB^{Mpo} in the *mpoB* deletion strain complemented with the *mpoBH14A* allele leads to constitutive *man* expression. Based on the results reported by (Xue and Miller, 2007) and on our results as well as in analogy with the regulation of LevR proteins (Martin-Verstraete *et al.*, 1998; Mazé *et al.*, 2004), we propose that His871 in PRD2 is the site of the inhibitory phosphorylation by P~EIIB^{Mpo} (Fig. 6). Unexpectedly deletion of *mpoB* strongly inhibited expression of *manLMN*, which nevertheless explains why in contrast to the constitutive Δ *mpoA* strain the *mpoA* insertion mutant with polar effects on the downstream genes or a Δ *mpoABCD* mutant (Stoll and Goebel, 2010)

exhibit poor *man* operon expression. Apparently, induction of the *man* operon requires not only the absence of phosphorylation at His871 of ManR, but also the presence of unphosphorylated EIIB^{Mpo}, which possibly interacts directly with ManR (Fig. 6). In *L. monocytogenes*, both ManR-activating conditions are accomplished when glucose is transported via the PTS^{Mpo}. We obtained results that similar to *L. monocytogenes* ManR *B. subtilis* MtlR also requires activation by the EIIB^{Mtl} domain. Inactivation of EIIA^{Mtl} caused constitutive *mtl* operon expression (Joyet *et al.*, 2010), while the additional deletion of the EIIB^{Mtl} domain strongly diminished MtlR activity (P. Joyet and J. Deutscher, unpublished results). In addition, the EIIB domain of the *E. coli* β -glucoside transporter BglF has been reported to interact with BglG, a PRD-containing antiterminator (Lopian *et al.*, 2003). Activation of PRD-containing regulators by interaction with EIIB domains might therefore be a frequently used mechanism.

Replacement of His506 in *L. innocua* ManR with Ala lowers its activity (Xue and Miller, 2007). We observed that deletion of *ptsI* also leads to low *man* expression. It was therefore tempting to assume that, similar to LevR proteins, ManR requires activation via phosphorylation by the common PTS proteins EI and HPr (Deutscher *et al.*, 2006). When phosphorylation of LevR by P~His-HPr was prevented, expression of the *lev* operon dropped about 100-fold (Mazé *et al.*, 2004; Stülke *et al.*, 1995). Based on previous studies (Stoll and Goebel, 2010; Xue and Miller, 2007) and our results it is likely that ManR controls the expression of the *man* operon in response to phosphorylation via EI and HPr at His506 and via EI, HPr, EIIA^{Mpo} and EIIB^{Mpo} at His871 as well as in response to the presence of unphosphorylated EIIB^{Mpo}. In this new type of PTS-mediated regulation the PTS^{Mpo} functions as a glucose sensor regulating the expression of the *man* operon by using ManR as a signal transducer (Fig. 6).

We identified the PTS^{Man} as the major glucose transporter, because only Δ *manL* and Δ *manM*, but not the Δ *mpoA* mutant, were significantly impaired in glucose utilization. The contribution of the PTS^{Mpo} to glucose uptake was not known before because, as mentioned above, all *mpo* mutants studied so far were lacking EIIB^{Mpo} and therefore exhibited very low *man* expression and consequently utilized glucose similar to *man* mutants. Interestingly, deletion of *manL* or *manM* caused significantly elevated expression of the truncated *man* operon (6- to 8-fold). This indicates an autoregulation of the *man* operon, which might be mediated via ManR: ManR in *man* mutants lacking the main glucose transporter might be more efficiently phosphorylated by EI and HPr at His506 than in a wild-type strain and

therefore be hyper-active. Alternatively, *man* autoregulation might be mediated via the Crp/Fnr-like regulator encoded by the gene located upstream from the *man* operon (*lmo0095*) or via the two-component system ResD/ResE. Inactivation of *lmo0095* (Xue *et al.*, 2005) and of *resD* (Larsen *et al.*, 2006) lowers *man* operon expression.

A *L. monocytogenes* $\Delta ptsI$ mutant cannot transport any carbon source via the PTS. Nevertheless, the $\Delta ptsI$ strain grew moderately on MM only when it was supplemented with glucose at concentration of 15 mM or higher, but consumed 1 mM glucose about 10-times slower than the wild-type and about twice as slow as the $\Delta mpoB$ mutant. The difference in glucose consumption between $\Delta mpoB$ (very low *man* expression and *mpo* inactive) and $\Delta ptsI$ suggests that firstly *L. monocytogenes* contains one or several other glucose-transporting PTS. Indeed, *lmo0027* encoding PTS^{Glc}-1, but also *lmo1997/lmo2000-2002* encoding another mannose class PTS, were overexpressed in $\Delta manLMN$ and $\Delta mpoABCD$ mutants grown at 10 mM glucose (Stoll and Goebel, 2010). In addition, at high concentrations glucose might be taken up via one of the cellobiose-like PTS, as has been demonstrated for *L. lactis* (Castro *et al.*, 2009), or via the fourth listerial PTS belonging to the mannose family (Barabote and Saier Jr, 2005; Glaser *et al.*, 2001). Secondly, the observed growth of the $\Delta ptsI$ mutant at 15 mM glucose indicates that this organism contains one or more non-PTS glucose transporters. Indeed, *L. monocytogenes* possesses three genes encoding proteins with significant sequence similarity to mannose and glucose transporting GlcU proteins from other firmicutes (Castro *et al.*, 2009; Fiegler *et al.*, 1999). Inactivation of *glcU1* or *glcU2* had no effect on glucose consumption or growth on glucose-containing MM. Nevertheless, complementation of a glucose-negative *E. coli* strain with *glcU1* or *glcU2* allowed fermentation of glucose at concentrations of 15 mM or higher. Similarly, the *L. monocytogenes* $\Delta ptsI$ mutant requires 15 mM glucose for moderate growth. At 25 mM glucose fermentation by the complemented *E. coli* strains was as efficient as in a wild-type strain. GlcU1 and GlcU2 therefore seem to transport glucose with relatively high efficiency, but low affinity. When an identical experiment was carried out with *glcU3*, slight glucose fermentation by the complemented *E. coli* strain occurred only at 55 mM glucose, indicating that this transporter has very low affinity for glucose.

Because utilization of glucose and other efficiently metabolized carbon sources represses the expression of several virulence genes (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993), we also measured the effect of the various mutations on the activity of the virulence gene regulator PrfA. Indeed, several mutations had a significant impact on the expression of a

PrfA-controlled reporter gene. This effect disappeared when *prfA* was deleted in these mutants. The stimulating effect is therefore due to PrfA derepression. Deletion of *manL* or *manM* caused a strong increase of *Phly-gus* expression when the cells were grown in MM containing 5 mM glucose. PrfA derepression diminished at higher glucose concentrations. The $\Delta manL$, $\Delta manM$ and $\Delta mpoB$ mutants also exhibited derepressed PrfA activity when qRT-PCR experiments with *hly*- and *actA*-specific primers were carried out. Elevated *Phly-gus* expression was also observed when the $\Delta manL$ strain was grown on solid MM containing glucose at concentrations between 2.5 and 20 mM. Although deletion of *manL* and *manM* had similar inhibitory effects on growth on glucose-containing MM and on glucose consumption, *manM* deletion generally caused a significantly weaker stimulatory effect on PrfA activity, especially on solid medium. This result shows that derepression of PrfA activity caused by *manL* deletion is not solely due to slow glucose utilization, but results at least partly from the absence of unphosphorylated EIIAB^{Man}. This form of EIIAB^{Man} is assumed to prevail during growth on glucose (Hogema *et al.*, 1998), a condition known to repress PrfA activity (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). Nevertheless, when $\Delta manM$ is grown on glucose, *manL* is overexpressed (Fig. 1A) and the resulting large amounts of EIIAB^{Man} should lower PrfA activity. However, up to 5 mM glucose most of the EIIAB^{Man} is probably present in phosphorylated form, because glucose is taken up via PTS^{Mpo} or other low affinity PTS (Fig. 2 and 3) and PrfA is derepressed. P~EIIAB^{Man} is assumed to exert no repressive effect on PrfA activity (Fig. 6). At higher glucose concentrations PTS^{Mpo} transports glucose almost as efficiently as PTS^{Man}. The rapid PTS^{Mpo}-mediated glucose transport and phosphorylation in the *manM* mutant will lower the amount of P~His-HPr; P~EIIAB^{Man} will therefore be partly dephosphorylated to EIIAB^{Man}, which might inhibit PrfA.

In-frame deletion of *mpoA* did not lead to derepression of PrfA. In contrast, the $\Delta mpoB$ strain exhibited very strong β -glucuronidase activity on solid as well as in liquid media and very high *hly* and *actA* expression. Again, PrfA derepression in $\Delta mpoB$ coincides with low amounts of EIIAB^{Man}. When grown in liquid media, $\Delta mpoB$ produces very little *man* mRNA, whereas $\Delta mpoA$ slightly overproduces it compared to the wild-type strain. PrfA activity in the *mpoB* mutant is repressed when grown on solid MM with more than 10 mM glucose, but is derepressed in liquid MM up to 25 mM glucose as shown by both the β -D-glucuronidase assay and qRT-PCR experiments. Differences in expression of the *man* operon during growth on solid and in liquid media might account for these discrepancies. Repression of PrfA activity in $\Delta manL$ grown at higher glucose concentrations might be caused by the

EIIA/EIIB components of the PTS^{Mpo}. Another PTS of the mannose family (PTS^{Man}-4, *lmo1997/lmo2000-2002*) might also be involved in PrfA repression at elevated glucose concentrations, because it was reported to be induced in $\Delta manLMN$ and $\Delta mpoABCD$ mutants grown at glucose concentrations higher than 10 mM (Stoll and Goebel, 2010). The EIIA/EIIB components of this PTS exhibit 47% and 58% sequence similarity, respectively, to EIIAB^{Man}. This hypothesis is in agreement with the observation that in the $\Delta ptsI$ mutant, which also expresses low levels of *man* mRNA and additionally is unable to take up any PTS sugar, β -glucuronidase activity was elevated over the whole range of glucose concentrations tested (2.5 to 55 mM). PrfA activity was even stronger at higher glucose concentrations, which is probably due to more efficient growth of the $\Delta ptsI$ strain under these conditions. Unexpectedly, elevated expression of the virulence genes *hly* and *actA* could not be observed in the $\Delta ptsI$ mutant when carrying out qRT-PCR assays after growth in glucose-supplemented MM. Contradictory results were also obtained when β -D-glucuronidase assays and qRT-PCR experiments were carried out with cells from the same growth culture. However, in BHI medium an approximately 10-times higher level of *hly* transcripts was detected in the $\Delta ptsI$ mutant compared to the wild-type strain (data not shown).

In conclusion, all our mutants exhibiting derepressed PrfA activity contain either no or very little unphosphorylated EIIAB^{Man}. This holds also for a previously described *resD* mutant, which had lost not only *manL* expression but also the repressive effect of carbohydrates on virulence gene expression (Larsen *et al.*, 2006). It is therefore likely that EIIAB^{Man} plays a major role in PrfA regulation in response to carbon source availability. Indeed, EIIAB^{Man} has been shown to be involved in carbon catabolite repression in *Streptococcus mutans* (Zeng and Burne, 2010). In *L. monocytogenes*, repressing carbon sources do not alter the intracellular amount of PrfA but affect its activity (Klarsfeld *et al.*, 1994; Milenbachs *et al.*, 1997; Renzoni *et al.*, 1997; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). We therefore propose a model, in which the constitutively produced PTS^{Mpo} functions as a sensor for the availability of glucose. When glucose is present, the PTS^{Mpo} activates ManR in a two step process including dephosphorylation of ManR at His871 and the formation of unphosphorylated EIIB^{Mpo}. Glucose is mainly transported via the PTS^{Man} and EIIAB^{Man} is therefore present mainly in the unphosphorylated form, which prevents PrfA from binding to its target sites, the PrfA boxes (Freitag *et al.*, 1992), either by directly interacting with the transcription activator (Fig. 6) or alternatively by interacting with a not yet identified PrfA-activating factor (Freitag *et al.*, 2009).

Experimental procedures

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The *L. monocytogenes* strains and plasmids used in this study are listed in Table 2. For growth studies, β -D-glucuronidase, glucose consumption and qRT-PCR assays *L. monocytogenes* cells were grown in MM (Premaratne *et al.*, 1991) supplemented with glucose at the indicated concentration. On solid MM, the glucose concentration ranged from 2.5 to 55 mM. MacConkey plates contained the same range of glucose concentrations and were used for the complementation experiments with an *E. coli* strain unable to ferment glucose. Otherwise *L. monocytogenes* cells were grown in brain heart infusion (BHI) broth and *E. coli* cells in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with shaking.

The concentration of antibiotics used for the selection of *E. coli* transformants was 100 μ g per ml for ampicillin and 20 μ g per ml for chloramphenicol; 5 μ g per ml erythromycin was used for the selection of *L. monocytogenes* integrants. X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) and X-GlcA (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide) were added to solid media at a concentration of 100 μ g per ml for the screening of *L. monocytogenes* clones expressing β -galactosidase during mutant construction and for measuring PrfA-controlled expression of a *Phly-gus* fusion in AML73 and mutants derived from it, respectively.

The plasmid pMAD (Arnaud *et al.*, 2004) confers resistance to erythromycin and ampicillin and contains a thermosensitive pE194 replication origin (Villafane *et al.*, 1987) and the promoterless *Geobacillus stearothermophilus* *bgab* gene encoding a thermostable β -galactosidase (under control of the constitutive *Staphylococcus aureus* *clpP* promoter).

The plasmid pSU18c confers resistance to chloramphenicol and is a pACYC184-derived vector containing the multiple cloning site and the *lacZ α* reporter gene of pUC18 (Martinez *et al.*, 1988).

The pAT18 plasmid confers resistance to erythromycin and contains the replication origin and multiple cloning site of pUC18 and the pAM β 1 replication origin (Trieu-Cuot *et al.*, 1991).

DNA techniques

General molecular biological and genetic experiments were essentially carried out as previously described (Sambrook *et al.*, 1989). Chromosomal and plasmid DNA were

extracted from *L. monocytogenes* strains with the Qiaprep Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen) and were purified by using the Wizard^R kit (Promega). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were obtained from New England Biolabs and were used as recommended by the manufacturer. DNA sequencing was carried out by Cogenics (Essex, United Kingdom). *E. coli* and *L. monocytogenes* strains were transformed by electroporation with a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad Laboratories) (Michel *et al.*, 1990). Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) programmed for 30 cycles composed of the following three steps: 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 1 min at 72°C, followed by a final extension cycle at 72°C for 10 min.

Construction of L. monocytogenes mutants

Mutants with in frame deletions were constructed by homologous recombination using the pMAD vector (Arnaud *et al.*, 2004) and strain AML73 (Wünscher *et al.*, 1991). To construct the AML73-derived $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$, $\Delta ptsI$ and $\Delta prfA$ mutants (*lmo0096*, *lmo0097*, *lmo0784*, *lmo0783*, *lmo1003* and *lmo0200*, respectively), two DNA fragments located upstream and downstream from the respective gene were amplified by using genomic DNA as template and the appropriate primer pairs (Table 3). In a second PCR the two PCR products were used as template together with the two distal primers which allowed fusion of the two DNA fragments. The various resulting PCR products were cloned via their restriction sites into vector pMAD. The obtained plasmids were used to electroporate *L. monocytogenes* AML73 and erythromycin-resistant blue colonies able to grow at 42°C owing to the integration of the plasmid into the chromosome were selected on solid BHI medium containing X-Gal. One integration mutant was isolated and grown at 30°C in liquid BHI medium for several days to allow excision of the plasmid. Subsequently several erythromycin-sensitive white colonies obtained on solid BHI medium containing X-Gal were screened by PCR to identify mutants in which the second recombination step had resulted in deletion of the respective gene. The correct in-frame deletion was confirmed by DNA sequencing. The same technique was used for the construction of the $\Delta manL \Delta prfA$, $\Delta manM \Delta prfA$ and $\Delta mpoB \Delta prfA$ double mutants. $\Delta manL$, $\Delta manM$ and $\Delta mpoB$ were transformed with the pMAD-derived plasmid used for *prfA* deletion. Finally, because no transformants could be obtained with the $\Delta ptsI$ mutant, the *ptsI* deletion was introduced into the $\Delta prfA$ mutant.

We also constructed an *mpoA manR* double mutant. For that purpose, the upstream region of *manR* and a small 3' part of *manR* (336 bp) together with the intergenic region between *manR* and *mpoA* were amplified by PCR by using appropriate primers (Table 3). The

two DNA fragments were fused and cloned into pMAD and the resulting plasmid was used to transform the wild-type strain AML73. The *mpoA* gene of the resulting $\Delta manR$ mutant was subsequently deleted as described above in order to obtain the *mpoA manR* double deletion mutant.

In order to construct the plasmid used for the complementation of the $\Delta mpoB$ mutant, the *mpoB* wild-type gene and the promoter and ribosome binding site of the *L. monocytogenes ptsH* gene were amplified by using appropriate primers (Table 3). The obtained PCR products contained overlapping sequences at their 5' and 3' end, respectively. PCR with the two DNA fragments as template and the 3' and 5' primers, respectively, was used to fuse the two PCR products. They were subsequently cut with the restriction enzymes BamHI and Sall and inserted into plasmid pAT18 (Trieu-Cuot *et al.*, 1991) cut with the same enzymes. The vector carrying the *mpoBH14A* allele was obtained by using the corresponding mutagenic primer (Table 3). The two resulting plasmids pAT18mpoBwt and pAT18mpoBH14A were subsequently used to transform the $\Delta mpoB$ mutant.

For the insertional inactivation of the *glcU1* (*lmo0169*), *glcU2* (*lmo0176*) and *mpoA* (*lmo0784*) genes by single homologous recombination, internal fragments of the corresponding genes were amplified by PCR using appropriate primers (Table 3) and the PCR products were digested and cloned into pMAD. The resulting plasmids were used to transform *L. monocytogenes* strain AML73 or the $\Delta manL$ mutant and cells were subsequently grown overnight at 30°C in BHI medium containing erythromycin. To force the integration of the plasmid into the chromosome, several clones were isolated and grown at 42°C in BHI medium containing erythromycin. Disruption mutants formed blue colonies on solid BHI medium containing X-Gal and their correct insertion was confirmed by PCR with appropriate primers followed by DNA sequencing.

Glucose consumption assays with resting cells

To follow the consumption of glucose by resting *L. monocytogenes* wild-type and mutant cells, we modified the method described for *L. casei* (Viana *et al.*, 2000). Bacteria were grown in LB medium containing 25 mM glucose, harvested at an OD₆₀₀ between 0,6 and 0,8 and centrifuged. Cells were washed with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, and subsequently resuspended in 3 ml of the same buffer containing 0,02% (1 mM) glucose and incubated at 37°C. During glucose consumption samples of 300 µl were withdrawn at different time intervals, boiled for 10 min and clarified by centrifugation. The glucose content in the supernatants was determined with a coupled spectrophotometric assay using a

commercially available mixture of hexokinase and glucose-6-P dehydrogenase as recommended by the supplier (Sigma). The optical density was followed up to 40 min at 314 nm with a Kontron Bio-Tek spectrophotometer using the “Auratorate” program.

Complementation of an E. coli strain unable to utilize glucose with three L. monocytogenes glcU-like genes

Heterologous complementation assays were carried out by following a previously described method (Pimentel-Schmitt *et al.*, 2009). The *L. monocytogenes* genes *glcU1*, *glcU2* and *glcU3* were amplified by PCR with appropriate oligonucleotides introducing BamHI and PstI restriction sites (Table 3). The two forward PCR primers were chosen in such a way that the amplified *glcU* genes contained their proper ribosome binding site. The resulting PCR fragments were digested with the indicated restriction enzymes (Table 3) and ligated into vector pSU18c in the same orientation as the 5'-part of *lacZ* encoding the α -fragment of β -galactosidase (Chandler, 1991), thus putting the *glcU* genes under control of the promoter preceding *lacZ*. In order to avoid a fusion of the GlcU proteins to the N-terminus of the α -fragment of β -galactosidase the 5' oligonucleotides were chosen in such a way that they created a stop codon located upstream from the respective *glcU* ribosome binding site and in frame with the *glcU* start codon. The correct sequence of the inserts was confirmed by DNA sequencing. The resulting three plasmids were introduced into *E. coli* LJ140, a strain carrying a $\Delta ptsHIcrr$ deletion. This strain exhibits very poor fermentation of glucose (Lévy *et al.*, 1990). Transformants were plated on MacConkey agar supplemented with glucose (2.5 to 55 mM) in order to test for heterologous complementation of the glucose-negative phenotype. Empty pSU18c was used to transform *E. coli* strains NM522 and LJ140, thus providing positive and negative controls, respectively, for glucose fermentation.

β -D-Glucuronidase assays

AML73 and the various mutants derived from it were grown in MM buffered with 100 mM MOPS (pH 7.0) supplemented with 5, 10 or 25 mM glucose. To carry out β -D-glucuronidase assays with bacteria grown in liquid medium to exponential phase, cells from 4 ml cultures were harvested, washed and resuspended in 0.6 ml “gus” buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.0; 1 mM EDTA). Cells were lysed with glass beads, cell debris was removed by centrifugation and 100 or 200 μ l of the supernatant were used for the β -D-glucuronidase

assay. β -D-Glucuronidase activity was measured using p-nitrophenyl β -D-glucuronide as substrate. The reaction was stopped by adding 800 or 900 μ l of 0.4 M Na_2CO_3 .

In order to detect β -D-glucuronidase activity on solid media, a pre-culture was grown on BHI to stationary phase, cells were washed with MM and 5 μ l aliquots were spotted onto buffered MM agarose containing different concentrations of glucose (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 or 55 mM) and 100 μ g/ml X-GlcA. The plates were kept for 72 to 96 h at 37°C in order to allow the hydrolysis of X-GlcA and the resulting formation of blue colour by β -D-glucuronidase-producing strains (Milenbachs Lukowiak *et al.*, 2004).

RNA isolation and qRT-PCR

L. monocytogenes strains were grown to exponential phase in MOPS-buffered MM (pH 7.0) supplemented with 5, 10 or 25 mM glucose. Cells from 30 ml cultures were collected by centrifugation and RNA was extracted using the RNeasy mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Residual DNA was removed using the Turbo DNA-free kit (Ambion). The quality of the RNA preparation was tested with an Agilent Bioanalyzer before RT reactions were performed using random hexamers (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. qRT-PCR experiments were carried out with the LightCycler (Roche) using primers specific either for the *man* or *mpo* operons or for the PrfA-controlled *hly* and *actA* genes and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) by following the protocol of LightCycler Faststart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche). For the *man* and for the *mpo* operon *manL*- as well as *manM*-specific and *mpoA*- as well as *mpoB*-specific primer pairs were used, respectively, and provided identical results within experimental errors. Data were processed with the Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software. In order to normalize transcript levels of the studied genes the constitutively expressed *rpoB* gene was used as a reference (Milohanic *et al.*, 2003). Statistical analyses of the data were carried out with the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Acknowledgements

We are thankful to Knut Jahreis and Fritz Titgemeyer for sending us *E. coli* strain LJ140 and plasmid pSU18c and to Nancy Freitag for providing us with *L. monocytogenes* strain AML73. We acknowledge the fruitful discussions with Sandrine Poncet and Werner Goebel. We thank Grégory da Costa for his assistance with the qRT-PCR experiments.

References

- Almengor, A.C., Kinkel, T.L., Day, S.J., and McIver, K.S. (2007) The catabolite control protein CcpA binds to *Pmga* and influences expression of the virulence regulator Mga in the Group A streptococcus. *J Bacteriol* **189**: 8405-8416.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.
- Arous, S., Buchrieser, C., Folio, P., Glaser, P., Namane, A., Hébraud, M., and Héchard, Y. (2004a) Global analysis of gene expression in an *rpoN* mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **150**: 1581-1590.
- Arous, S., Dalet, K., and Héchard, Y. (2004b) Involvement of the *mpo* operon in resistance to class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 37-41.
- Asanuma, N., Yoshii, T., and Hino, T. (2004) Molecular characteristics of phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system in *Streptococcus bovis*. *Curr Microbiol* **49**: 4-9.
- Barabote, R.D., and Saier Jr, M.H. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 608-634.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998a) A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol* **180**: 6316-6324.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998b) Regulation of *hly* expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. *Infect Immun* **66**: 3635-3642.
- Brehm, K., Ripio, M.T., Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. (1999) The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J Bacteriol*: 5024-5032.
- Brockmeier, A., Skopnik, M., Koch, B., Herrmann, C., Hengstenberg, W., Welti, S., and Scheffzek, K. (2009) Activity of the *Enterococcus faecalis* EIIA^{gnt} PTS component and its strong interaction with EIIB^{gnt}. *Biochem Biophys Res Commun* **388**: 630-636.
- Castro, R., Neves, A.R., Fonseca, L.L., Pool, W.A., Kok, J., Kuipers, O.P., and Santos, H. (2009) Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Mol Microbiol* **71**: 795-806.
- Chandler, M.S. (1991) New shuttle vectors for *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli*: P15A-derived plasmids replicate in *H. influenzae* Rd. *Plasmid* **25**: 221-224.
- Christensen, D.P., and Hutkins, R.W. (1994) Glucose uptake by *Listeria monocytogenes* Scott A and inhibition by pediocin JD. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3870-3873.
- Christensen, D.P., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (1998) Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* Scott A *ptsH* and *ptsI* genes, coding for HPr and enzyme I, respectively, of the phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3147-3152.
- Cochu, A., Vadeboncoeur, C., Moineau, S., and Frenette, M. (2003) Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5423-5432.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., and Héchard, Y. (2001) A σ^{54} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 3263-3269.

- Darbon, E., Servant, P., Poncet, S., and Deutscher, J. (2002) Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA, and inducer exclusion elicited by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* *glpFK* expression. *Mol Microbiol* **43**: 1039-1052.
- Deutscher, J., Franke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Dozot, M., Poncet, S., Nicolas, C., Copin, R., Bouraoui, H., Mazé, A., Deutscher, J., X., d.B., and Letesson, J.-J. (2010) Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS ONE* **5**: e12679.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., and Goebel, W. (2010) Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol* **8**: 401-412.
- Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I., and Brückner, R. (1999) Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *J Bacteriol* **181**: 4929-4936.
- Freitag, N.E., Youngman, P., and Portnoy, D.A. (1992) Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**: 1293-1298.
- Freitag, N.E., Port, G.C., and Miner, M.D. (2009) *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**: 623-628.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., L. Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Gough, J.A., and Murray, N.E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* **166**: 1-19.
- Herro, R., Poncet, S., Cossart, P., Buchrieser, C., Gouin, E., Glaser, P., and Deutscher, J. (2005) How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**: 224-234.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., and Postma, P.W. (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Mol Microbiol* **30**: 487-498.
- Joyet, P., Derkaoui, M., Poncet, S., and Deutscher, J. (2010) Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Mol Microbiol* **76**: 1279-1294.
- Klarsfeld, A.D., Goossens, P.L., and Cossart, P. (1994) Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol* **13**: 585-597.
- Larsen, M.H., Kallipolitis, B.H., Christiansen, J.K., Olsen, J.E., and Ingmer, H. (2006) The response regulator ResD modulates virulence gene expression in response to carbohydrates in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **61**: 1622-1635.

- Leimeister-Wächter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**: 947-952.
- Lévy, S., Zeng, G.Q., and Danchin, A. (1990) Cyclic AMP synthesis in *Escherichia coli* strains bearing known deletions in the *pts* phosphotransferase operon. *Gene* **86**: 27-33.
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., Repoila, F., Buchrieser, C., Cossart, P., and Johansson, J. (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **139**: 770-779.
- Lopian, L., Nussbaum-Shochat, O'Day-Kerstein, K., Wright, A., and Amster-Choder, O. (2003) The BglF sensor recruits the BglG transcription regulator to the membrane and releases it on stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7099-7104.
- Lortie, L.A., Pelletier, M., Vadeboncoeur, C., and Frenette, M. (2000) The gene encoding IIAB_L^{Man} in *Streptococcus salivarius* is part of a tetracistronic operon encoding a phosphoenolpyruvate:mannose/glucose phosphotransferase system. *Microbiology* **146**: 677-685.
- Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Stülke, J., Galinier, A., Erni, B., Rapoport, G., and Deutscher, J. (1998) Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR. *Mol Microbiol* **28**: 293-303.
- Martinez, E., Bartolomé, B., and de la Cruz, F. (1988) pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and *lacZ* α reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68**: 159-162.
- Mazé, A., Boël, G., Poncet, S., Mijakovic, I., Le Breton, Y., Benachour, A., Monedero, V., Deutscher, J., and Hartke, A. (2004) The *Lactobacillus casei ptsHI47T* mutation causes overexpression of a LevR-regulated but RpoN-independent operon encoding a mannose class phosphotransferase system. *J Bacteriol* **186**: 4543-4555.
- Mertins, S., Joseph, B., Goetz, M., Ecke, R., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W., and Müller-Altrock, S. (2007) Interference of components of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system with the central virulence gene regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **189**: 473-490.
- Michel, E., Reich, K.A., Favier, R., Berche, P., and Cossart, P. (1990) Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol Microbiol* **4**: 2167-2178.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., and Youngman, P. (1997) Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **23**: 1075-1085.
- Milenbachs Lukowiak, A., Mueller, K.J., Freitag, N.E., and Youngman, P. (2004) Deregulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology* **150**: 321-333.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. (2003) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**: 1613-1625.
- Park, S.F., and Kroll, R.G. (1993) Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **8**: 653-661.
- Pimentel-Schmitt, E.F., Jahreis, K., Eddy, M.P., Amon, J., Burkovski, A., and Titgemeyer, F. (2009) Identification of a glucose permease from *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**: 169-175.
- Poncet, S., Milohanic, E., Mazé, A., Nait Abdallah, J., Aké, F., Larribe, M., Deghmane, A.E., Taha, M.K., Dozot, M., de Bolle, X., Letesson, J.J., and Deutscher, J. (2009)

- Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol* **16**: 88-102.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3046-3048.
- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. (1997) Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* **65**: 1515-1518.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scotti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., and Vázquez-Boland, J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect* **9**: 1196-1207.
- Sonenshein, A.L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 917-927.
- Stoll, R., and Goebel, W. (2010) The major PEP-phosphotransferase systems (PTs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. *Microbiology* **156**: 1069-1083.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Klier, A., Deutscher, J., and Rapoport, G. (1995) The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* **177**: 6928-6936.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., and Courvalin, P. (1991) Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *lacZ α* gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *Gene* **102**: 99-104.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.
- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Pérez-Martínez, G., and Deutscher, J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol* **36**: 570-584.
- Villafane, R., Bechhofer, D.H., Narayanan, C.S., and Dubnau, D. (1987) Replication control genes of plasmid pE194. *J Bacteriol* **169**: 4822-4829.
- Vu-Khac, H., and Miller, K.W. (2009) Regulation of mannose phosphotransferase system permease and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* by the EII_t^{Man} transporter. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6671-6678.
- Wünscher, M.D., Köhler, S., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1991) Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet* **228**: 177-182.
- Xue, J., Hunter, I., Steinmetz, T., Peters, A., Ray, B., and Miller, K.W. (2005) Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1283-1290.
- Xue, J., and Miller, K.W. (2007) Regulation of the *mpt* operon in *Listeria innocua* by the ManR protein. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5648-5652.
- Yebrá, M.J., Veyrat, A., Santos, M.A., and Pérez-Martínez, G. (2000) Genetics of L-sorbose transport and metabolism in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* **182**: 155-163.
- Yebrá, M.J., Monedero, V., Zúñiga, M., Deutscher, J., and Pérez-Martínez, G. (2006) Molecular analysis of the glucose-specific phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system from *Lactobacillus casei* and its links with the control of sugar metabolism. *Microbiology* **152**: 95-104.

Zeng, L., and Burne, R.A. (2010) Seryl-phosphorylated HPr regulates CcpA-independent carbon catabolite repression in conjunction with PTS permeases in *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol* **75**: 1145-1158.

Table 1. Relative expression of the virulence genes *hly* and *actA* determined by qRT-PCR in the wild-type strain AML73 (WT, always set to 1) and various mutants derived from it after growth in MM containing glucose at the indicated concentrations. Mean values and standard deviations (in parentheses) calculated from the results obtained with at least four independent RNA preparations are shown.

Genes tested Strains	MM + 5 mM glucose		MM + 10 mM glucose		MM + 25 mM glucose	
	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>
WT	1	1	1	1	1	1
$\Delta manL$	29,3 (10,1)	24,9 (2,1)	16,0 (0,7)	16,9 (2,2)	15,8 (4,4)	63,3 (29,1)
$\Delta manM$	22,2 (9,4)	21 (4,7)	12,3 (0,8)	11,8 (0,7)	6,5 (1,8)	23,5 (3,0)
$\Delta mpoB$	40,9 (17,1)	43,2 (13,4)	32,6 (2,0)	28,8 (4,0)	58,7 (16,0)	214,1 (69,2)
$\Delta ptsI$	0,54 (0,3)	0,28 (0,17)	0,25 (0,06)	0,2 (0,02)	0,68 (0,51)	1,25 (1,36)
$\Delta mpoA$	0,61 (0,23)	0,8 (0,11)	0,56 (0,13)	0,5 (0,14)	0,33 (0,02)	0,27 (0,04)
$\Delta prfA$	0,01 (0,009)	0,06 (0,09)	0,014 (0,01)	0,012 (0,01)	0,009 (0,008)	0,064 (0,09)
$\Delta prfA/\Delta manL$	0,002 (0,001)	0,067 (0,08)	0,016 (0,01)	0,01 (0,011)	0,003 (0,002)	0,06 (0,008)

Table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains/plasmids	Genotype/properties	Origin
<i>L. monocytogenes</i>		
AML73	Derivative of strain 10403S; <i>Phly-gus</i> , serotype 1/2a	(Milenbachs Lukowiak <i>et al.</i> , 2004)
EM1001	AML73 $\Delta ptsI$ (<i>lmo1003</i>)	This work
FA1001	AML73 $\Delta manL$ (<i>lmo0096</i>)	This work
FA1003	AML73 $\Delta manM$ (<i>lmo0097</i>)	This work
FA1005	AML73, pMAD:: <i>glcU1</i> (<i>lmo0169</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
FA1006	AML73, pMAD:: <i>glcU2</i> (<i>lmo0176</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
FA1007	AML73, pMAD:: <i>glcU3</i> (<i>lmo0424</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
FA1009	AML73, $\Delta manL$ pMAD:: <i>mpoA</i> (<i>lmo0096/lmo0784</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
FA1010	AML73, $\Delta manL$ pMAD:: <i>glcU1</i> (<i>lmo0096/lmo0169</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
FA1011	AML73, $\Delta manL$ pMAD:: <i>glcU2</i> (<i>lmo0096/lmo0176</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
FA1015	AML73, $\Delta mpoA$ (<i>lmo0784</i>)	This work
FA1017	AML73, $\Delta mpoB$ (<i>lmo0783</i>)	This work
FA1019	AML73 $\Delta prfA$ (<i>lmo0200</i>)	This work
FA1021	AML73, $\Delta manL$ $\Delta prfA$ (<i>lmo0096/lmo0200</i>)	This work
FA1023	AML73, $\Delta ptsI$ $\Delta prfA$ (<i>lmo1003/lmo0200</i>)	This work
FA1025	AML73, $\Delta mpoB$ $\Delta prfA$ (<i>lmo0783/lmo0200</i>)	This work
FA1027	AML73, pMAD:: <i>mpoA</i> (<i>lmo0784</i>) (<i>erm^R</i>)	This work
EM1002	AML73, $\Delta manR$ (<i>lmo0785</i>)	This work
FA1029	AML73, $\Delta mpoA$ $\Delta manR$ (<i>lmo0784/lmo0785</i>)	This work
EM1003	AML73, $\Delta mpoB$ pAT18mpoBwt	This work
EM1004	AML73, $\Delta mpoB$ pAT18mpoBH14A	This work
<i>E. coli</i>		
LJ140	$\Delta ptsHIcrr::kan$ (<i>kan^R</i>)	(Pimentel-Schmitt <i>et al.</i> , 2009)
LJ140[pSU18c]	$\Delta ptsHIcrr::kan$ (<i>kan^R</i> , <i>cat^R</i>)	This work
LJ140[pSU18c- <i>glcU1</i>]	$\Delta ptsHIcrr::kan$ pSU18c:: <i>glcU1</i> (<i>kan^R</i> , <i>cat^R</i>)	This work
LJ140[pSU18c- <i>glcU2</i>]	$\Delta ptsHIcrr::kan$ pSU18c:: <i>glcU2</i> (<i>kan^R</i> , <i>cat^R</i>)	This work
NM522	<i>supE thi-1</i> $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(mcrB-hsdSM)$ (<i>r_k- m_k-</i>) [F' <i>proAB lacI^qZ</i> $\Delta GM15$]	(Gough and Murray, 1983)
NM522[pSU18c]	<i>supE thi-1</i> $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(mcrB-hsdSM)$ (<i>r_k- m_k-</i>) [F' <i>proAB lacI^qZ</i> $\Delta GM15$] (<i>cat^R</i>)	This work
Plasmids		
pMAD	Thermosensitive pE194 replication origin	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pSU18c	Derivative of pACYC184	(Martinez <i>et al.</i> , 1988)
pAT18	shuttle vector with pUC18 and pAM β 1 replication origins	(Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1991)

Table 3. List of oligonucleotides used in this study.

Name of primer	Sequence	Used for	
<i>ptsI1</i> -5'BamHI	TTAGGATCCACTATAAGCCATTA AAAAAGTG ^a	<i>ptsI</i> deletion	
<i>ptsI1</i> -3'SalI	CGCGTCGACAATCCCATCAGATGCTGC		
<i>ptsI2</i> -5'SalI	GAAGTCGACGAATTAGTTGAAAAATATACTG		
<i>ptsI2</i> -3'EcoRI	AATGAATTCTACCACAATCCCAAGAATC		
<i>ptsI</i> -ext5 ^b	CACTCCTTCAATTTTTCGG		
<i>ptsI</i> -ext3'	GGGAAATTAAACTGATAG	<i>manL</i> deletion	
<i>manL1</i> 5'BamHI	AATGGATCCAGAGAACAACCAGAGTTTCC		
<i>manL1</i> 3'SalI	ATTCGTGTTTTGGTTCGACCGTGAGTTGCGAGGATA		
<i>manL2</i> 5'SalI	TCGCAACTCACGGTCGACCAAACACGAATTAAG		
<i>manL2</i> 3'NcoI	GTACCATGGCTACGCTGCGTATATTCC		
<i>manL1</i> ext	GAGAAGGGTTTAGACTGGC	<i>manM</i> deletion	
<i>manL2</i> ext	GAACGCTGTCTGCTGGAATG		
<i>manM1</i> 5'SalI	TCTGTTCGACGTCAAGTAGCCACTGCATGGA		
<i>manM1</i> 3'SmaI	CGCGAGAGTTTCCCCGGGAAAATGCAATAAGTACTACTA		
<i>manM2</i> 5'SmaI	TATTGCATTTTTCCCCGGGAAACTCTCGCGATCCACT		
<i>manM2</i> 3'BglII	TACAGATCTAGCAACGAAGAATAAGATAGGTCC	<i>glcU1</i> disruption	
<i>manM1</i> ext	CTACTGAACAGCCACAAGC		
<i>manM2</i> ext	CACCAGAAAGGTCATCAG		
<i>glcU1</i> -BamHI	GCGGATCCGTGGGGGATTATGCCATTAG		
<i>glcU1</i> -NcoI	AATCCATGGAGGTAAAATCGCGTCCCACC		
<i>glcU1</i> ext5'	AATTACGGGAATAGGAATG	<i>glcU1</i> expression	
<i>glcU1</i> ext3'	CATATTTAACCACGTTG		
<i>lmo0169</i> for-BamHI	ATAAGGATCCGAATAAGGGGGAATAAAAAATGAACATAG		
<i>lmo0169</i> rev-PstI	TTAACTGCAGCATTATATCAAACCGGAAGCTG		
<i>glcU2</i> BamHI	GCGGATCCACAAGACAACAACGATGG		<i>glcU2</i> disruption
<i>glcU2</i> NcoI	AAGCCATGGCGTTTATTGAAGCGTTTTTC		
<i>glcU2</i> ext5'	TTGAAAACATAAATTAAGG		
<i>glcU2</i> ext3'	GATAACAACCTCCTAATTGCG		
<i>lmo0176</i> for-BamHI	TAAAGGATCCACTAGGAGGAAAACGATATGAACATTATG	<i>glcU2</i> expression	
<i>lmo0176</i> rev-PstI	CACGCTGCAGGAAATAATTAATTAAGCGCC		
<i>lmo0424</i> for-BamHI	AAATGGATCCACTAACCTAGAAAGGAAGCTTATTTATG		<i>glcU3</i> expression
<i>lmo0424</i> rev-PstI	GACAAAATGATTGCTCTGCAGTCTTTGATTTG		
<i>mpoA</i> -Bam5'	AACGGATCCGATTATCGGCAAACAGG		
<i>mpoA</i> -NcoI3'	CCACCATGGCCTGCTGTAAGAGCTGTTTC		
<i>mpoA1</i> 5'-BamHI	TTTGGATCCCCGCGAACC AAAAGATATGC		
<i>mpoA1</i> 3'-SalI	GACTTCGTTTTCTGTCGACAGCTTACCATGTGTGCC		
<i>mpoA2</i> 5'-SalI	CATGGTGAAGCTGTGCGACGAAACCGAAGTCGGGGAG		
<i>mpoA2</i> 3'-NcoI	CTTCCATGGCAGATGCGACTTTACG	<i>mpoA</i> deletion	
<i>mpoA</i> ext5'	AAAAC TAGGATACAAACTC		
<i>mpoA</i> ext3'	TAAACGTTTGCTTTTTTCGG		
<i>mpoB1</i> 5'-BamHI	AGTGGATCCGGATGATTATATCCACGC		<i>mpoB</i> deletion
<i>mpoB1</i> 3'-SalI	TAATGGGATAAGGTGCGACGATCATCAATACGTGC		
<i>mpoB2</i> 5'-SalI	ATTGATGATCGCGTCGACCTTATCCCATTACTAGAT		
<i>mpoB2</i> 3'-NcoI	TGACCATGGGCAGCTAGAGGAATCGCAAG		
<i>mpoB</i> ext5'	AGTACACGCTTACAAAAGCC		
<i>mpoB</i> ext3'	CAGATTACCTTCCTTACC		

<i>PptsH</i> BamHI	GAGGGATCCAAGATATTGTGAAGATTGAAA	
<i>PptsH</i> NdeI	TAAGCGAATTTCCATATGTATCATTCTCCTTTTAACTTAAAG	
<i>mpoB</i> compl5' NdeI	AGGAGAATGATACATATGGAAATTCGCTTAGCACGTATTGA	<i>mpoB</i> complementation
<i>mpoB</i> compl3' SalI	AAAGTCGACGAGCCGCGGATGAATTA	
<i>mpoB</i> compl5'H15A NdeI	AGGAGAATGATACATATGGAAATTCGCTTAGCACGTATTGA	
	TGATCGCTTAATTGCTGGTCAAGTAGC ^a	
<i>manR1</i> 5'-BamHI	AACGGATCCATATTTGTCTGCTGCTAAG	<i>manR</i> deletion
<i>manR1</i> 3'-SalI	TTCGTTAAGACTGTCGACGGTCAATACGCTTCATTATAAAAC	
<i>manR2</i> 5'-SalI	AGCGTATTGACCGTCGACAGTCTTAACGAATTTCTAACC	
<i>manR2</i> 3'-NcoI	AAGCCATGGGCCTTAATACGCTAAATGC	
<i>manR</i> ext5'	GAAAGATTTTCCAGCAATAAC	
<i>manR</i> ext3'	CAAAAACCTGTGCCAACATTC	
<i>prfA1</i> 5'-BglII	TCCAGATCTCTTATCAAGCTTCCAAAGC	<i>prfA</i> deletion
<i>prfA1</i> 3'-SalI	AGCAGGACATGCGTCGACATATTTTTTGAATTCTTC	
<i>prfA2</i> 5'-salI	TTCAAAAATATGTCGACGCATGTCCTGCTACTTGG	
<i>prfA2</i> 3'-NcoI	TGACCATGGTGGAGTTACTCGTGCC	
<i>prfA</i> ext5'	GCGCACCTAACCAAGTAATTCAAG	
<i>prfA</i> ext3'	CCAATTGATCACTTGAACGCAG	
<i>manL</i> -F1	CTACATAAAGATAAGTGGGC	qRT-PCR
<i>manL</i> -R1	GTTCTTCTGGTTTAAACGC	qRT-PCR
<i>manM</i> -F1	CAGCATGTATCATCCTTGGC	qRT-PCR
<i>manM</i> -R1	TTGCGGACGGAATACCTG	qRT-PCR
<i>mpoA</i> -F1	TATTACCTTTGTCCCTGG	qRT-PCR
<i>mpoA</i> -R1	GGCGATTTGACTAGATG	qRT-PCR
<i>mpoB</i> -F1	GCTAGTGTTGTTGATGTGC	qRT-PCR
<i>mpoB</i> -R1	GGAATGCCATACCACCAAT	qRT-PCR
<i>rpoB</i> -F2	CAGAAACTGGTGAATTATCGC	qRT-PCR
<i>rpoB</i> -R2	TAGATTGAACGAGTACGCTATCTT	qRT-PCR
<i>actA</i> -F	AGCAGATGAGTCTTACCACA	qRT-PCR
<i>actA</i> -R	CCCTGCACTTTTATCAACAATC	qRT-PCR
<i>hly</i> -F	ATGCAATTTTCGAGCCTAACCT	qRT-PCR
<i>hly</i> -R	TTATTGTCTTGATTAGTCATAC	qRT-PCR
pMAD_5'	GCGAGAAGAATCATAATGGG	Sequencing of pMAD inserts
pMAD_3'	GTTACACATTAaCTAGACAG	

^aRestriction sites are underlined and mutated codons are in italics.

^bPrimers labeled “ext” were used for the verification of the corresponding deletion.

Figure legends

Fig. 1. qRT-PCR of *man* and *mpo* operon expression in wild-type strain AML73 and mutants derived from it. A. $\Delta manL$ and $\Delta manM$; B. $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$ and the $\Delta mpoA \Delta manR$ double mutant; C. $\Delta mpoB$ and $\Delta mpoB$ complemented with wild-type *mpoB* or *mpoBH14A* and D. $\Delta ptsI$ mutant. Transcript levels in the mutant strains are indicated relative to the wild-type strain, which was always set to 1. The strains were grown in MM containing either glucose or glycerol. Primers specific for *manL*, *manM* or *mpoA* were used. Presented are the mean values and standard deviations calculated from 6 independent experiments. Asterisks indicate significant differences from the wild-type strain as determined by the Wilcoxon-Mann-Whitney test (P values smaller or equal to 0.05).

Fig. 2. Growth studies with wild-type AML73 and $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta ptsI$, $\Delta mpoA$ and $\Delta mpoB$ mutants in MM supplemented with A. 5 mM; B. 10 mM; C. 15 mM and D. 25 mM glucose. The symbols represent: filled squares, WT AML73; open squares, $\Delta mpoA$; open triangles, $\Delta manL$; filled triangles, $\Delta manM$; open circles, $\Delta mpoB$; and filled circles, $\Delta ptsI$. In all experiments, the OD was measured at 600 nm.

Fig. 3. The PTS^{Man} is the main glucose transporter. Glucose consumption assays were carried out with resting cells of AML73 and mutants derived from it. Cells were pre-grown in LB medium containing 25 mM glucose and consumption assays were carried out with 1 mM glucose. A. Typical results of a single experiment. The symbols represent: black squares, wild-type; grey circles, $\Delta mpoA$; black triangles, $\Delta manL$; open triangles, $\Delta manM$; grey squares, $\Delta mpoB$; grey triangles, $\Delta ptsI$. B. Mean values of glucose consumption and standard deviations calculated for each mutant based on 4 to 7 independent experiments. Glucose consumption by the wild-type strain (WT) was set to 1. Asterisks in B indicate significant differences from the wild-type strain as determined by the Wilcoxon-Mann-Whitney test (P values smaller or equal to 0.05).

Fig. 4. Strongest derepression of virulence gene expression in the $\Delta manL$ mutant. PrfA-dependent *Phly-gus* expression was measured in various *L. monocytogenes* strains grown to exponential phase in MM containing 5, 10 or 25 mM glucose. β -D-Glucuronidase activity was determined in AML73 (WT) and the isogenic $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta ptsI$, $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$,

$\Delta prfA$ and $\Delta manL/\Delta prfA$ mutants. Presented are the mean values and standard deviations calculated from 4 to 9 independent experiments. The activity measured with the wild-type strain was set to 1. Asterisks indicate significant differences from the wild-type strain at all glucose concentrations tested as determined by the Wilcoxon-Mann-Whitney test (P values smaller or equal to 0.05).

Fig. 5. Effect of mutations on PrfA-dependent expression of *Phly-gus* in solid MM containing XGlcA and varying concentrations of glucose (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 and 55 mM). β -D-Glucuronidase activity was determined in crude extracts of strain AML73 (WT) and isogenic $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$, $\Delta ptsI$, $\Delta prfA$ and $\Delta prfA/\Delta manL$ mutants. 5 μ l of stationary phase cultures of these strains were spotted onto solid MM and incubated at 37°C for 3 to 4 days. The intensity of blue colour is proportional to the activity of β -D-glucuronidase.

Fig. 6. Proposed model for the regulation of *man* operon expression and PrfA activity via PTS^{Mpo}-mediated control of ManR activity. The uptake of glucose via the constitutively synthesized PTS^{Mpo} leads to dephosphorylation of EIIA^{Mpo} and EIIB^{Mpo} and thus prevents the inhibitory phosphorylation at His871 of ManR, but allows the presumed stimulating interaction of unphosphorylated EIIB^{Mpo} with its EIIA^{Man}-like domain. Activation of ManR, the gene of which is located upstream from the *mpo* operon, induces *man* operon expression. ManR binds upstream from the RpoN-dependent -12/-24 promoter at an upstream activating sequence (UAS) and thus stimulates *man* operon expression. The uptake of glucose via PTS^{Man} will cause dephosphorylation of EIIB^{Man}, which directly or indirectly inhibits the transcription activator PrfA, which binds to conserved DNA sequences (PrfA boxes) located in front of several virulence genes (Milohanic *et al.*, 2003). Dashed arrows indicate proteins encoded by the corresponding genes, hatched arrows signify protein/protein or protein/DNA interactions; + and – stand for stimulatory or inhibitory effects, respectively. Filled gray squares indicate PrfA boxes in front of virulence genes in the major pathogenicity island of *L. monocytogenes*. The two presumed phosphorylation sites in ManR are written in italics (His506 and His871); other potential ManR phosphorylation sites are also indicated.

Fig. S1. GlcU1 and GlcU2 transport glucose when expressed in *E. coli*. Heterologous complementation of the glucose negative phenotype of *E. coli* LJ140 by *glcU1* and *glcU2* was demonstrated on MacConkey agar plates containing different concentrations of glucose (2.5,

5, 10, 15, 20, 25 and 55 mM). Pigmented red colonies indicate fermentation of glucose, whereas white colonies reflect a deficiency in glucose fermentation. *E. coli* NM522 containing the pSU18c vector (strain 1) was used as a positive and *E. coli* LJ140 containing empty pSU18c as a negative control (strain 2). Strain 3 is *E. coli* LJ140 containing pSU18c-glcU1 and strain 4 is *E. coli* LJ140 containing pSU18c-glcU2.

Fig. 1A

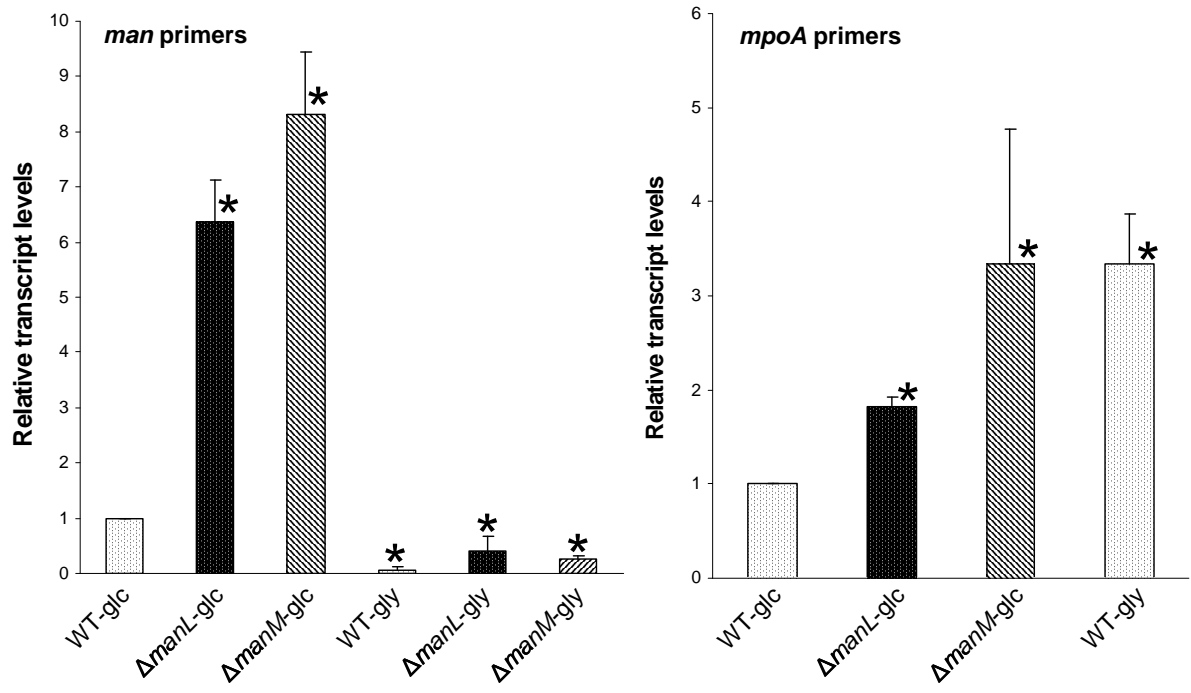


Fig. 1B

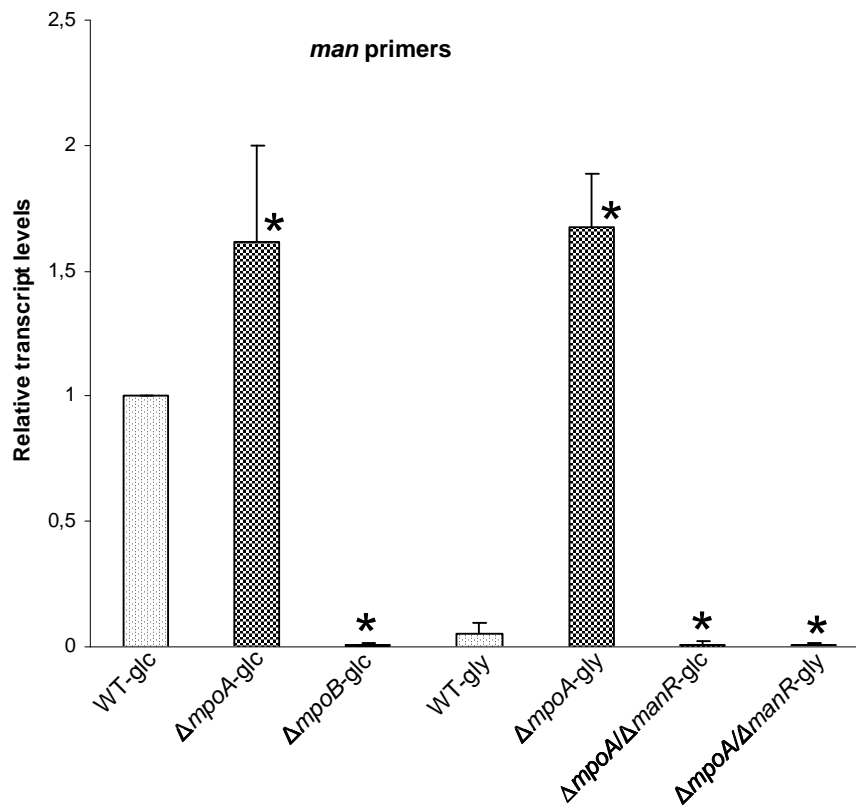


Fig. 1C

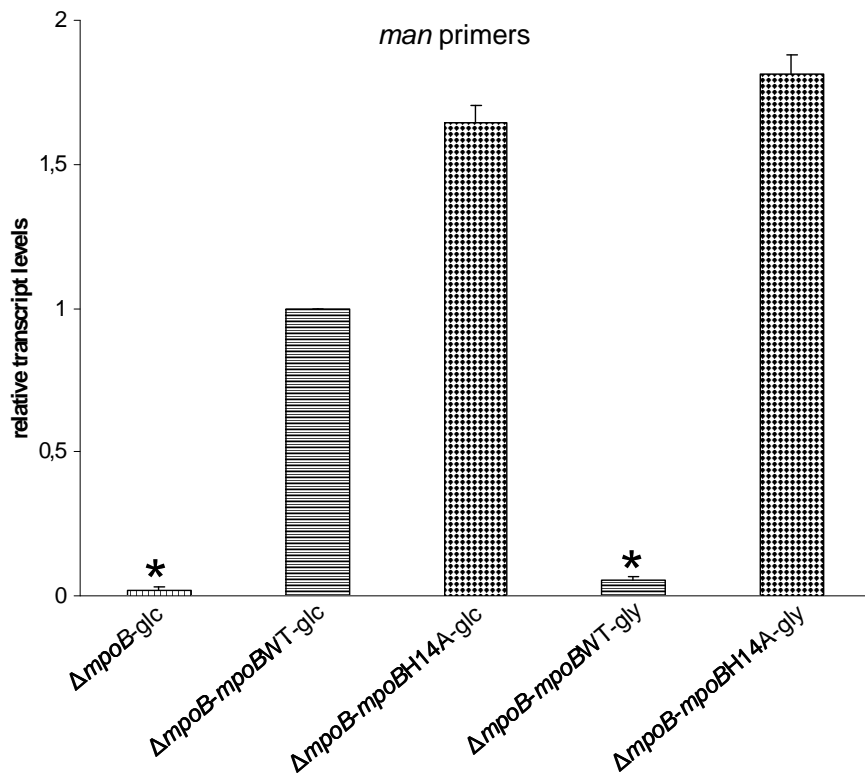


Fig.1D

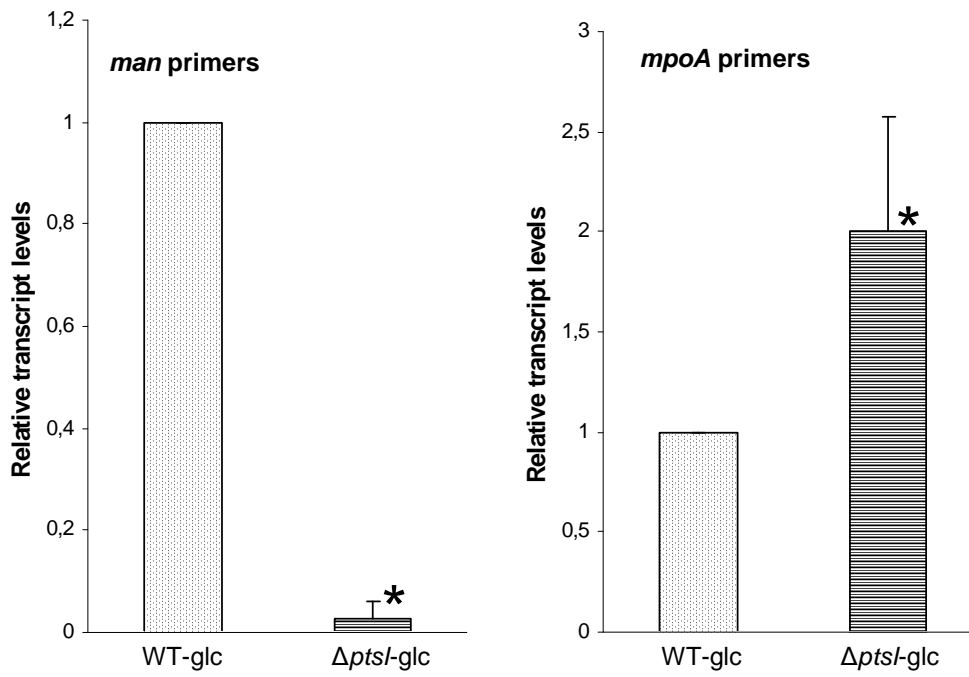


Fig. 2A

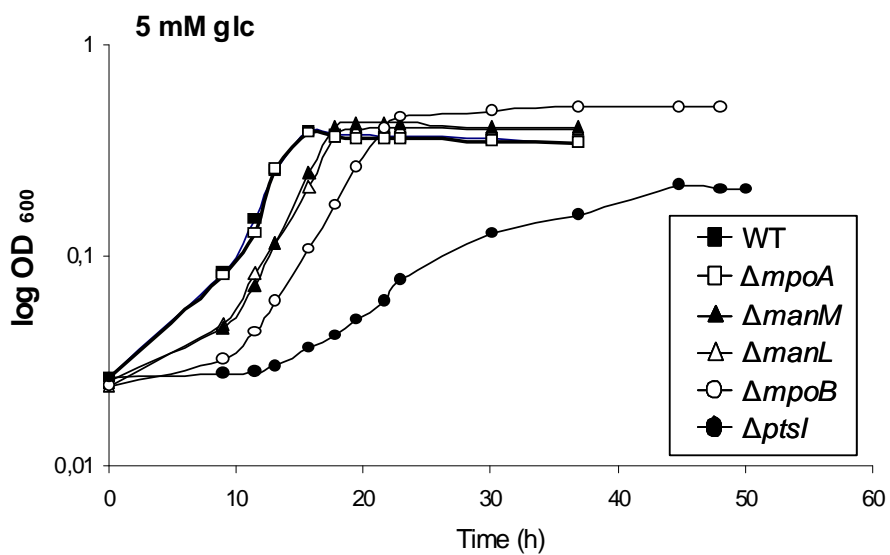


Fig. 2B

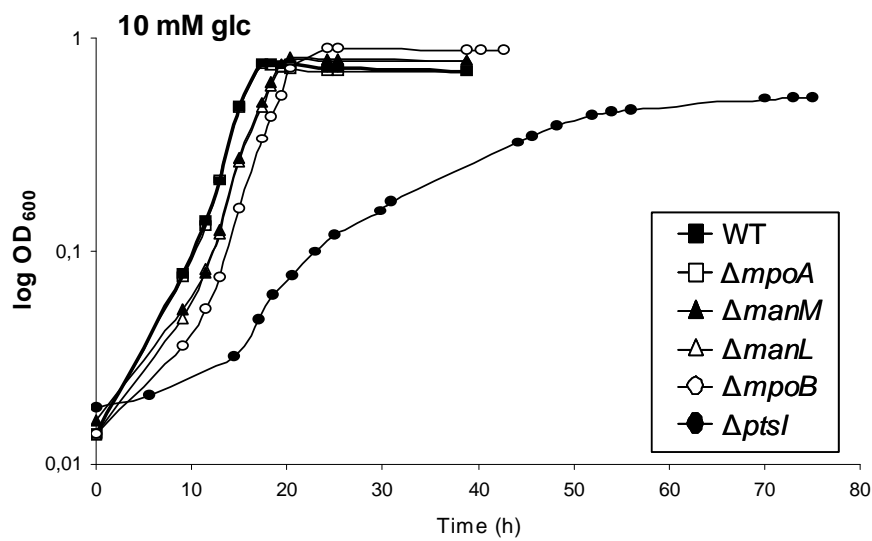


Fig. 2C

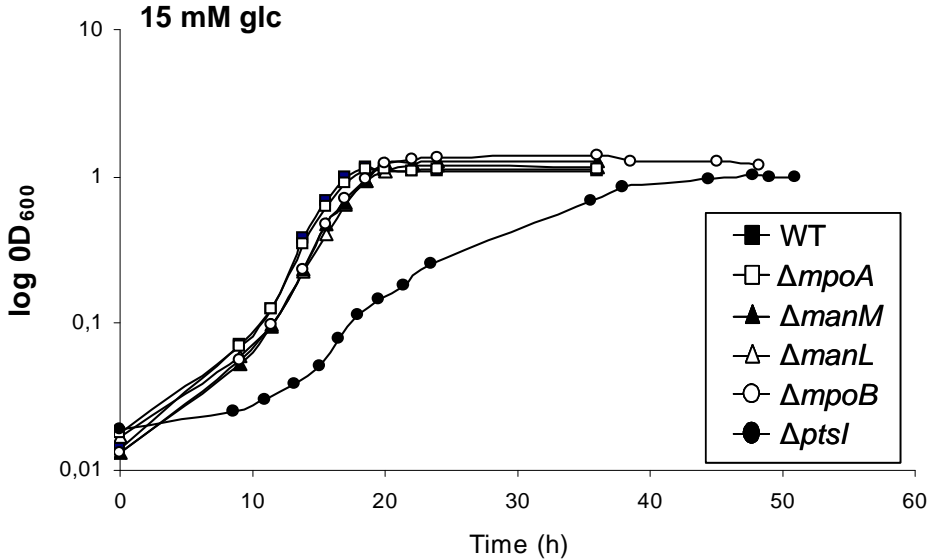


Fig. 2D

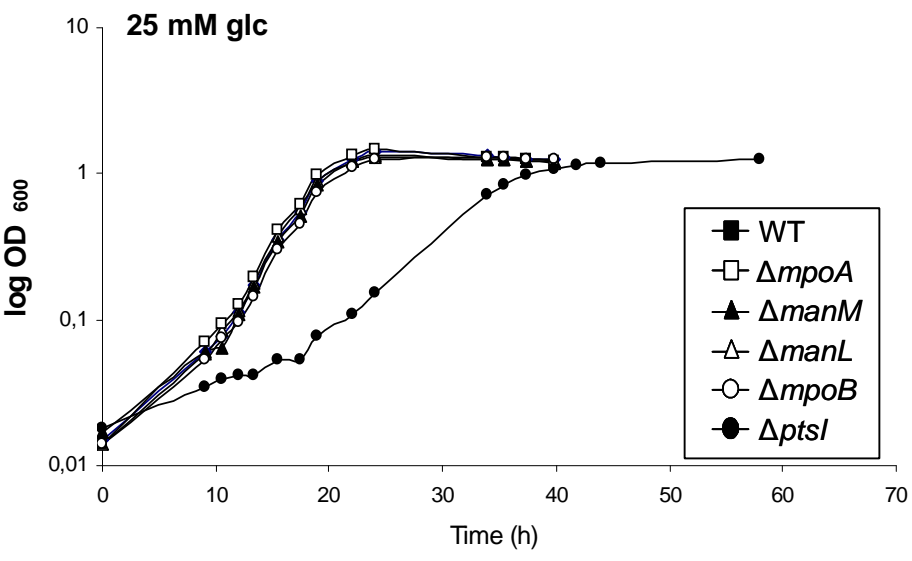


Fig.3A

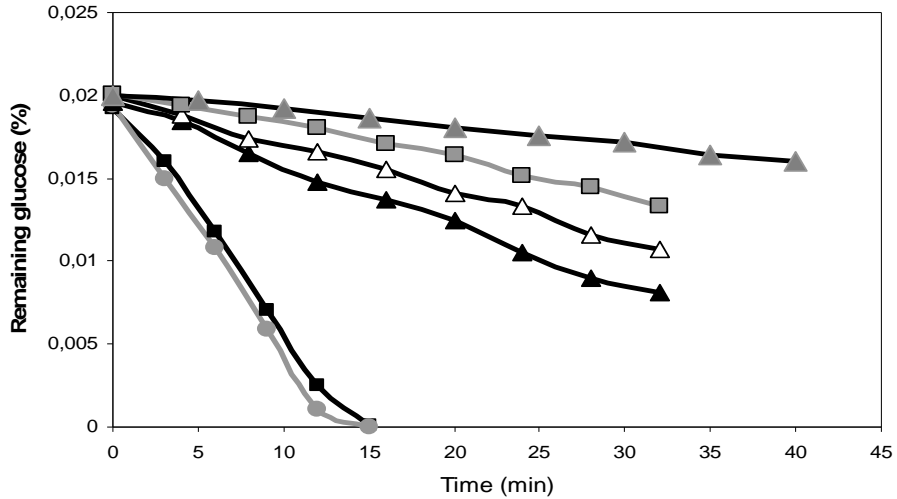


Fig.3B

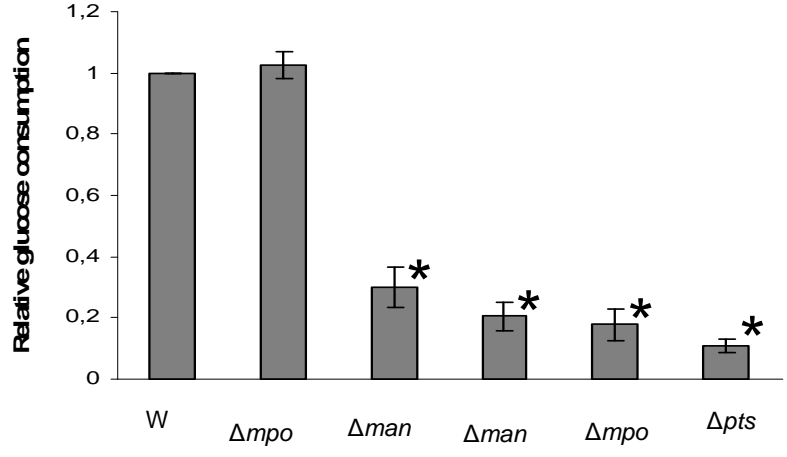


Fig.4

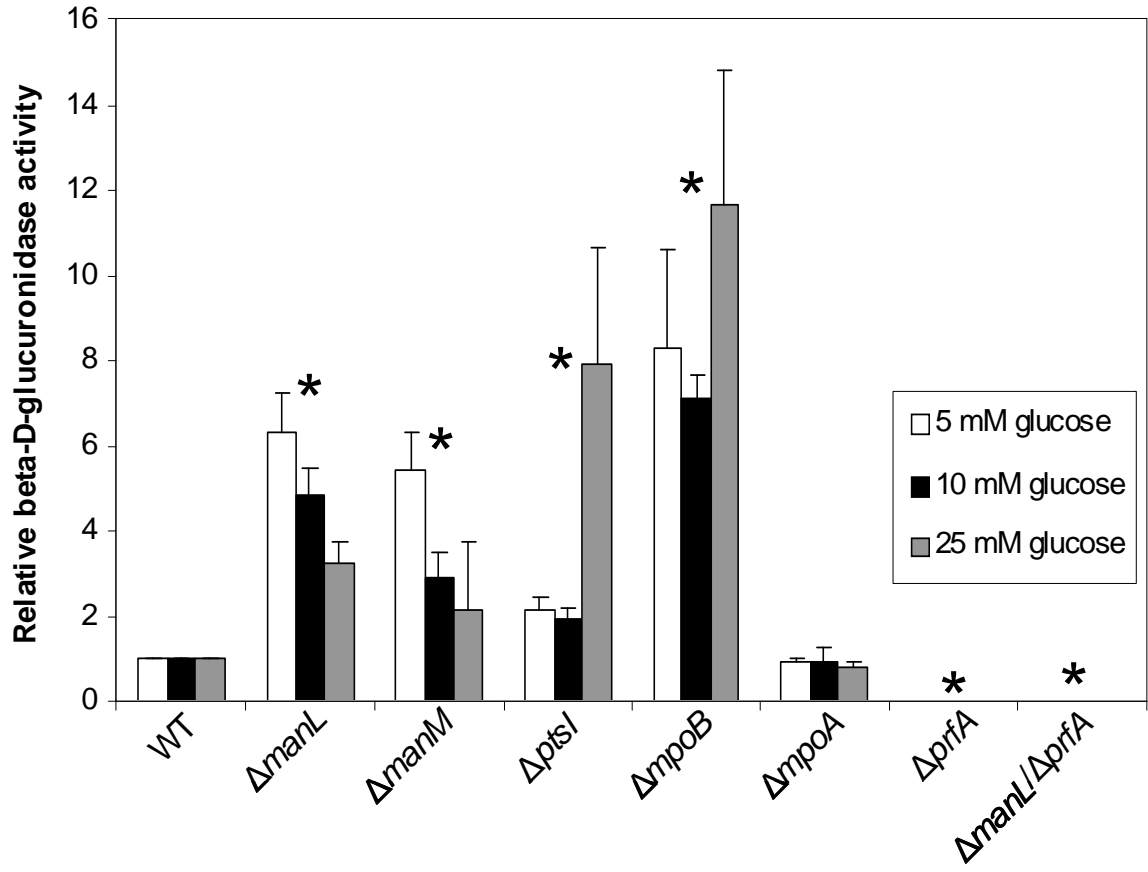


Fig.5

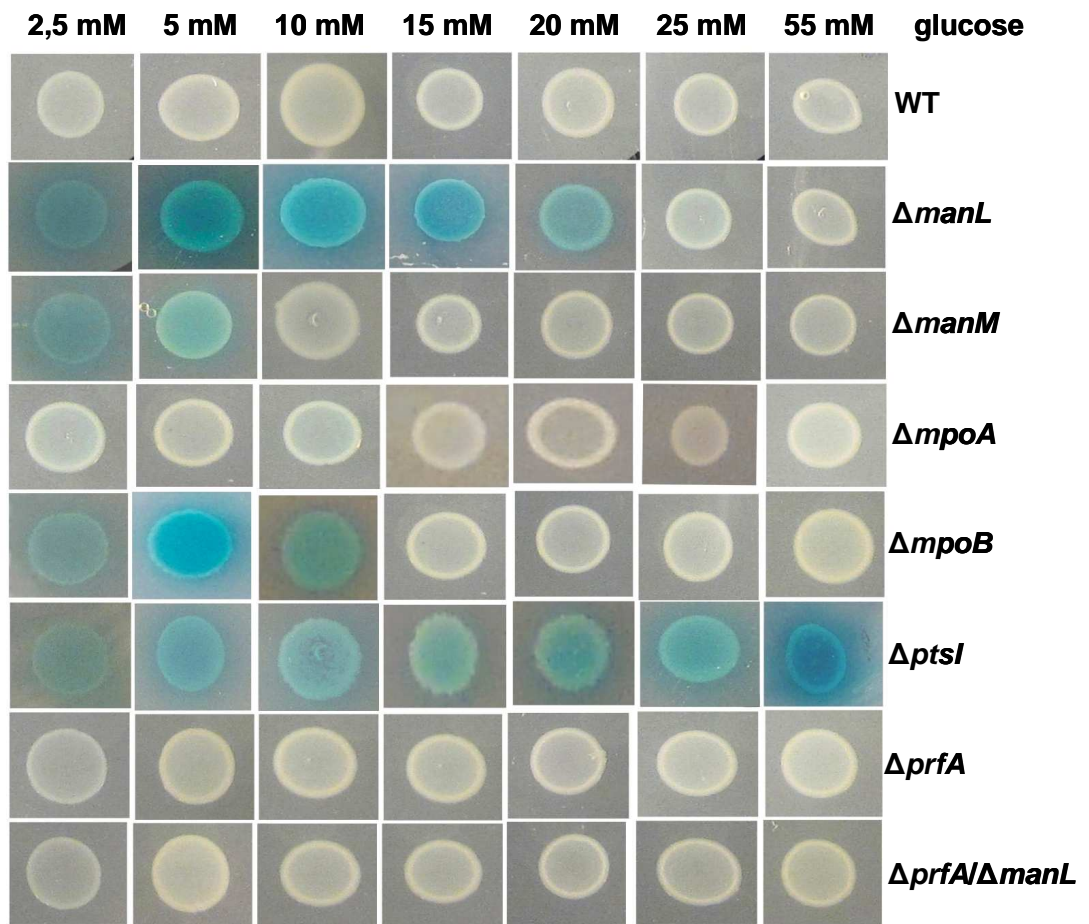


Fig. 6

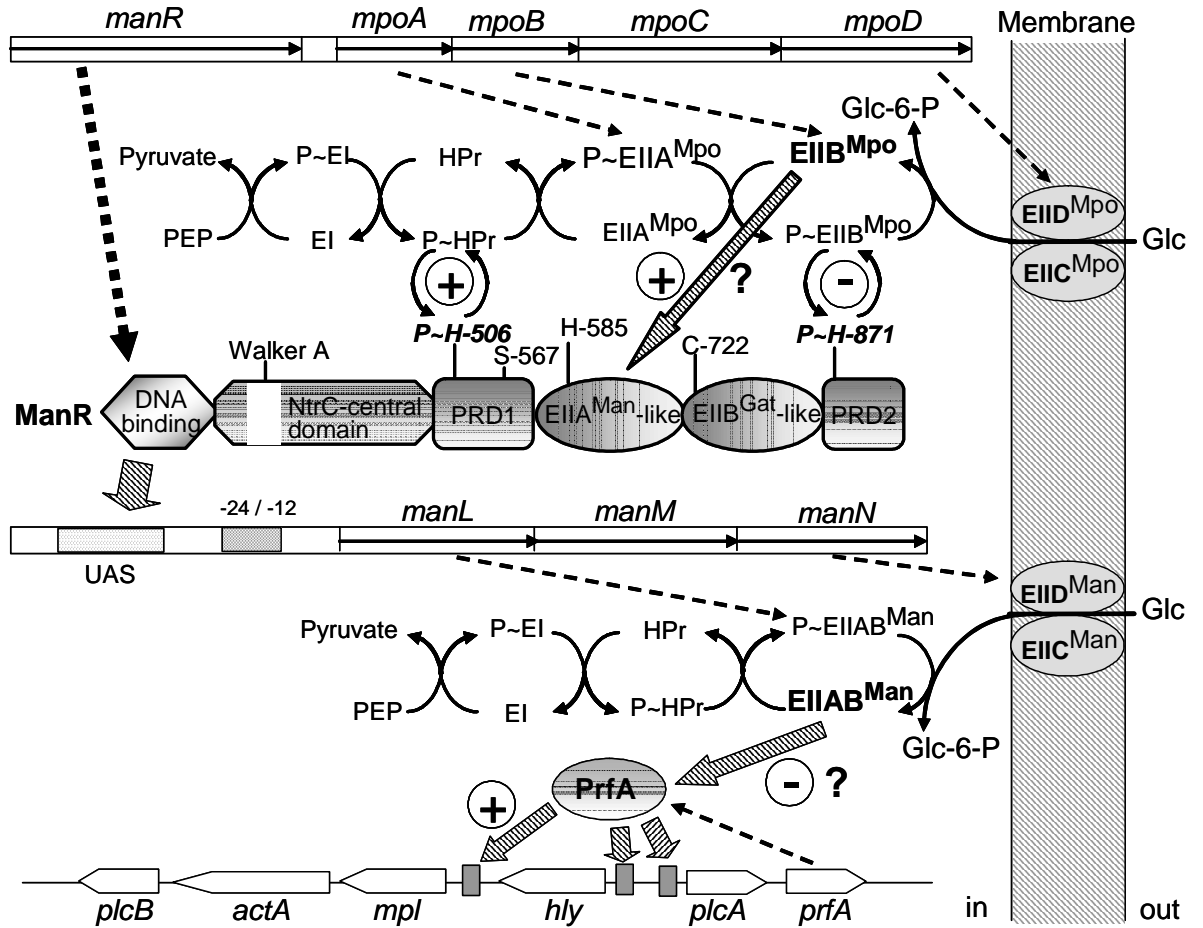
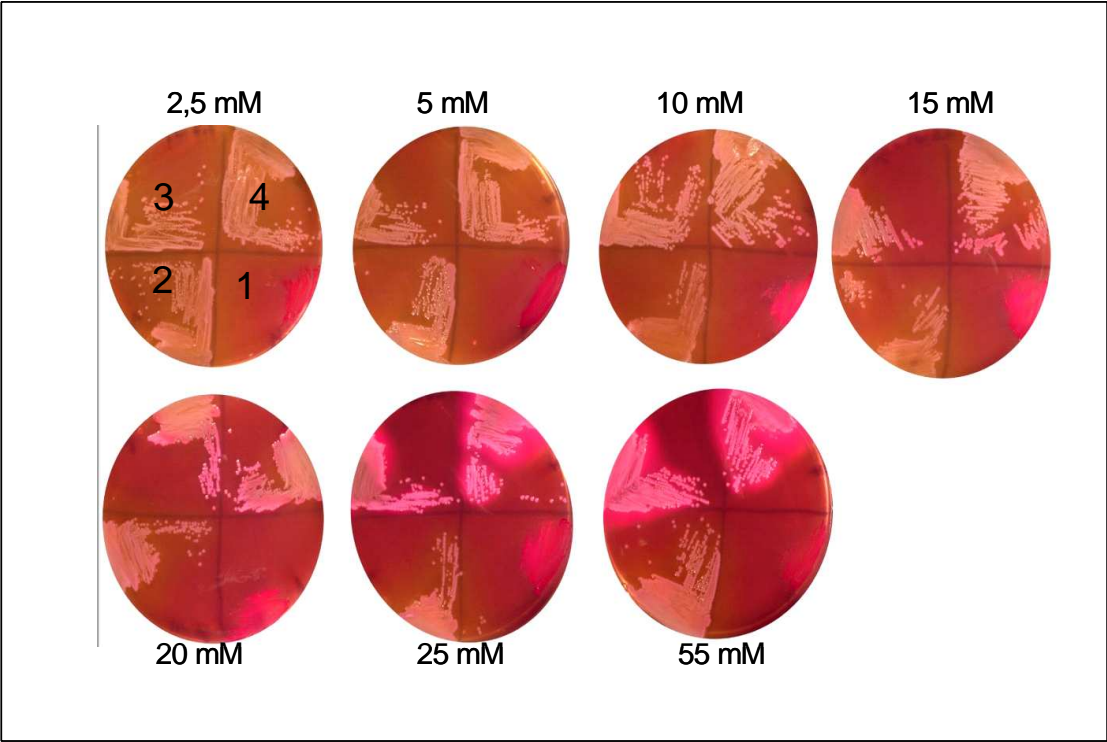


Fig.S1.



II- RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Différents résultats obtenus au cours de ma thèse mais non mentionnés dans l'article précédent sont décrits ci-dessous.

II-1- Analyse phénotypique des mutants

Les mutants ont été construits dans les souches *L. monocytogenes* EGDe et AML73 (considérées dans ce travail comme des souches sauvages (wild-type : WT)).

II-1-1- Inactivation du gène *ptsI*

L'enzyme I codée par le gène *ptsI*, est la première protéine générale du PTS et chez les firmicutes, elle sert dans la cascade de phosphorylation pour toutes les protéines du PTS (Deutscher *et al.*, 2006). L'inactivation ou la délétion du gène *ptsI* rompt les différentes fonctions attribuées au PTS. Lorsque le mutant $\Delta ptsI$ AML73 ou EGDe croit sur gélose BHI, LB ou HTM additionnée de glucose, il se présente sous forme de petites colonies par rapport à la souche sauvage *L. monocytogenes* AML73 ou EGDe.

En milieu minimum (MM) ne contenant pas de glucose, le mutant $\Delta ptsI$ montre une croissance inexistante (Figure 26). A des concentrations supérieures à 10 mM glucose, une croissance du mutant $\Delta ptsI$ avec une phase de latence de 15 h (10 mM glucose) ou 10 h (25 mM glucose) est observée (Figure 26). La croissance du mutant $\Delta ptsI$ est alors meilleure à des concentrations élevées en glucose (supérieures ou égales à 25 mM) mais avec une phase de latence toujours plus longue par rapport à la souche sauvage (Figure 27).

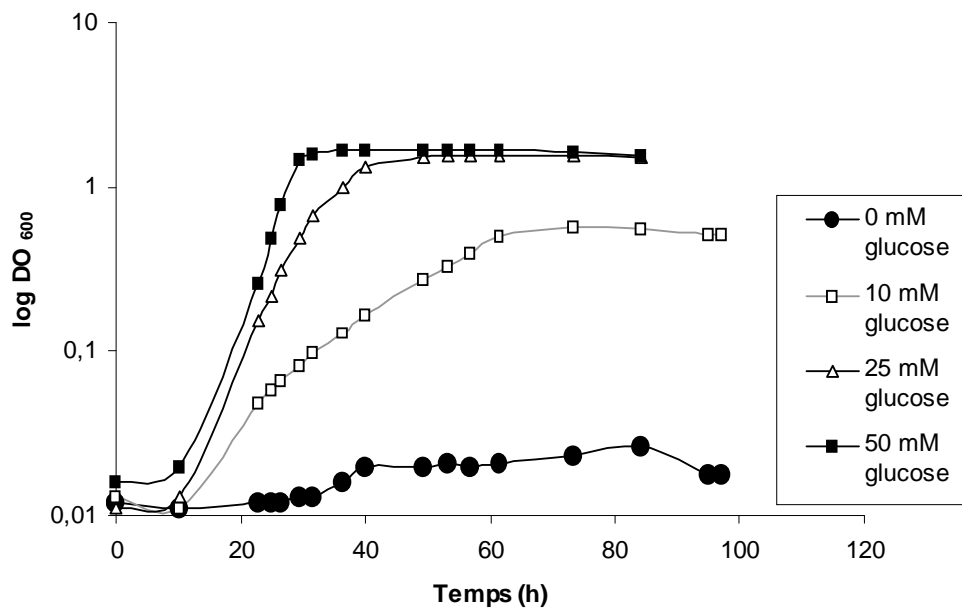


Figure 26 : Croissance du mutant $\Delta ptsI$ en MM et MM additionné de 10, 25 et 50 mM glucose.

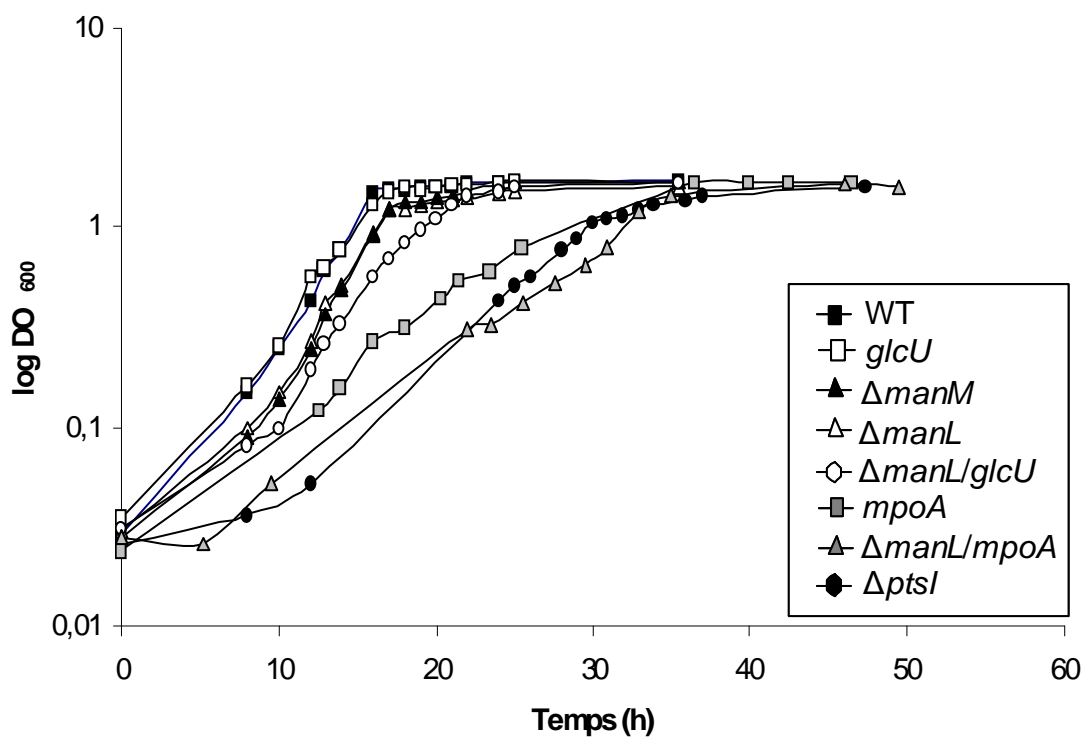


Figure 27 : Croissance de *L. monocytogenes* AML73 et des différents mutants sur MM additionné de 25 mM glucose.

II-1-2- Inactivation du PTS glucose/mannose, PTS^{Mpo}

Barabote et Saier ainsi que Stoll et Goebel ont proposé que *L. monocytogenes* possède 4 transporteurs PTS de la classe mannose dont les PTS^{Man} et PTS^{Mpo} (Barabote and Saier, 2005; Stoll *et al.*, 2008; Stoll and Goebel, 2010). Les protéines codées par les opérons *man* et *mpo* montrent 59 à 75 % de similarité de séquence. Afin de montrer l'implication de l'opéron *mpo* dans le transport de glucose, un premier mutant par insertion dans le gène *mpoA* (entraînant l'inactivation de tout l'opéron *mpo*) a d'abord été construit. Dans un second temps, d'autres mutants par délétion de gènes *mpoA* et *mpoB* ont été construits (Δ *mpoA* et Δ *mpoB*). Des tests de croissance ont été réalisés sur gélose BHI, LB ou HTM additionnée de glucose. Ces mutants *mpo* présentent un phénotype similaire à la souche sauvage sur ces géloses. Cependant, une faible croissance du mutant *mpoA* (mutant par inactivation de gène) par rapport à la souche sauvage en MM additionné de 25 mM glucose est observée (Figure 27). La vitesse de croissance du mutant *mpoA* est comparable à celle du mutant Δ *ptsI* mais le mutant *mpoA* montre un temps de latence moins long que le mutant Δ *ptsI* (Figure 27). Les résultats de croissance et de consommation de glucose obtenus pour les mutants Δ *mpoA* et Δ *mpoB*, mentionnés dans l'article précédent, montrent que le mutant Δ *mpoA* présente une utilisation de glucose comparable à la souche sauvage. Par contre, le mutant Δ *mpoB* est très affecté dans l'utilisation de glucose. Par ailleurs, une très faible croissance du double mutant Δ *manL/mpoA* par rapport à la souche sauvage en MM additionné de 25 mM glucose est observée (Figure 27). Ce double mutant croît également moins vite que le mutant Δ *manL*. Ce résultat montre que le PTS^{Mpo} transporte également le glucose. On observe cependant, une croissance du double mutant Δ *manL/mpoA* comparable au mutant Δ *ptsI* en MM additionné de 25 mM glucose (Figure 27). Ceci permet de montrer l'effet de l'inactivation des principaux PTS de transport de glucose chez *L. monocytogenes*. En outre, les mutants Δ *mpoB*, *mpoA* (mutant par inactivation de gène) et le double mutant Δ *manL/mpoA* montrent une utilisation de glucose similaire (Figure 28).

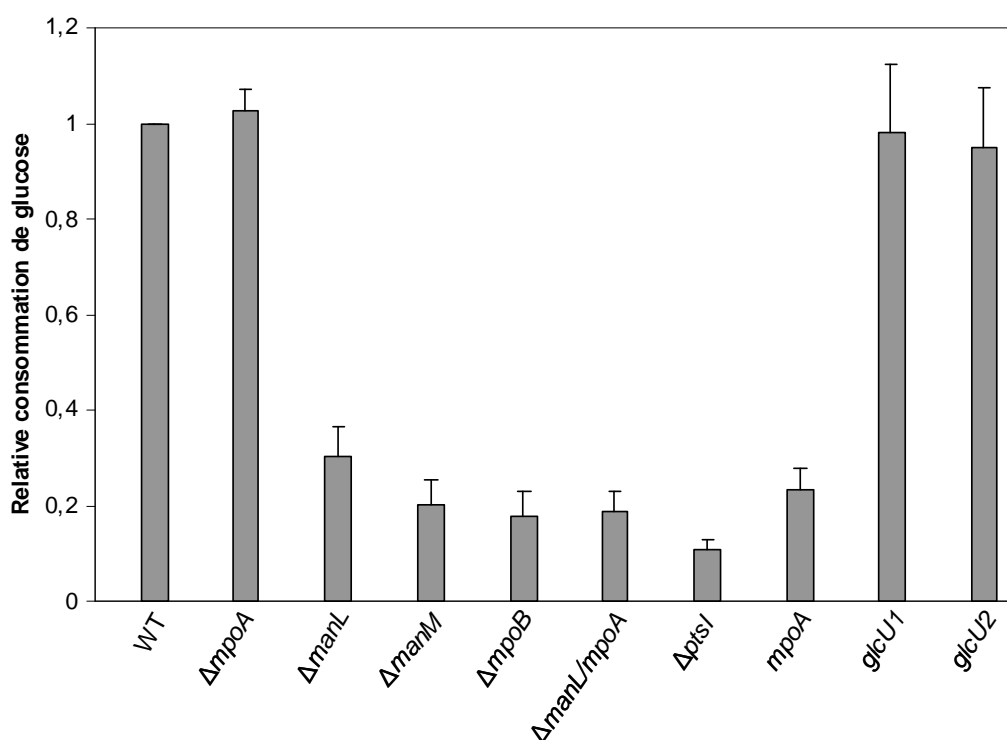


Figure 28 : Test de consommation de glucose dans la souche *L. monocytogenes* AML73 (WT) et dans les différents mutants. Résultats normalisés par rapport à la souche sauvage.

II-1-3- Identification d'un troisième transporteur non-PTS de glucose

La croissance du mutant Δ ptsI à des concentrations en glucose supérieures ou égales à 10 mM suggère que *L. monocytogenes* possède des transporteurs non-PTS de glucose. Les mutants de *L. monocytogenes* par inactivation de gènes *glcU1* et *glcU2* montrent une croissance similaire à la souche sauvage en milieu minimum (MM) additionné de 25 mM glucose (Figure 27). Une utilisation de glucose comparable à la souche sauvage est également observée dans ces mutants (Figure 28). Des complémentations hétérologues chez *E. coli* nous ont permis de montrer que les protéines GlcU1 et GlcU2 étaient fonctionnelles et permettraient le transport de glucose avec une affinité faible (20 mM glucose, voir figure S1 mentionnée dans l'article et figure 29).

Des recherches de BLAST sur Listlist nous ont permis d'identifier un troisième gène présentant des similarités avec le transporteur non-PTS de glucose GlcU, chez *S. xylosus* (Fiegler *et al.*, 1999) et *L. lactis* (Castro *et al.*, 2009). Ce troisième gène potentiel codant pour le transporteur non-PTS est le gène *lmo0424* (*glcU3*) qui code pour une protéine montrant

35% d'identité de séquence avec les protéines GlcU connues. Afin de déterminer l'implication de cette protéine dans le transport de glucose chez *L. monocytogenes*, un plasmide a été construit où le gène *glcU3* a été cloné avec son RBS dans le plasmide pSU18, ce qui permet une expression constitutive du gène *glcU3*. Le plasmide est utilisé pour transformer la souche *E. coli* LJ140 incapable d'utiliser le glucose.

L'expression du gène *glcU3* dans *E. coli* LJ140 a permis de montrer que cette souche transporte le glucose à partir de 55 mM sur gélose MacConkey additionné de glucose à différentes concentrations (Figure 29). Ces résultats suggèrent que, comme *glcU1* et *glcU2*, le gène *glcU3* code pour un transporteur fonctionnel de glucose qui permettrait la croissance du mutant $\Delta ptsI$ en milieu minimum additionné de glucose. La protéine GlcU3 semble être fonctionnelle à des concentrations de glucose plus élevées (55 mM) que GlcU1 et GlcU2 (20 mM) (Figure 29).

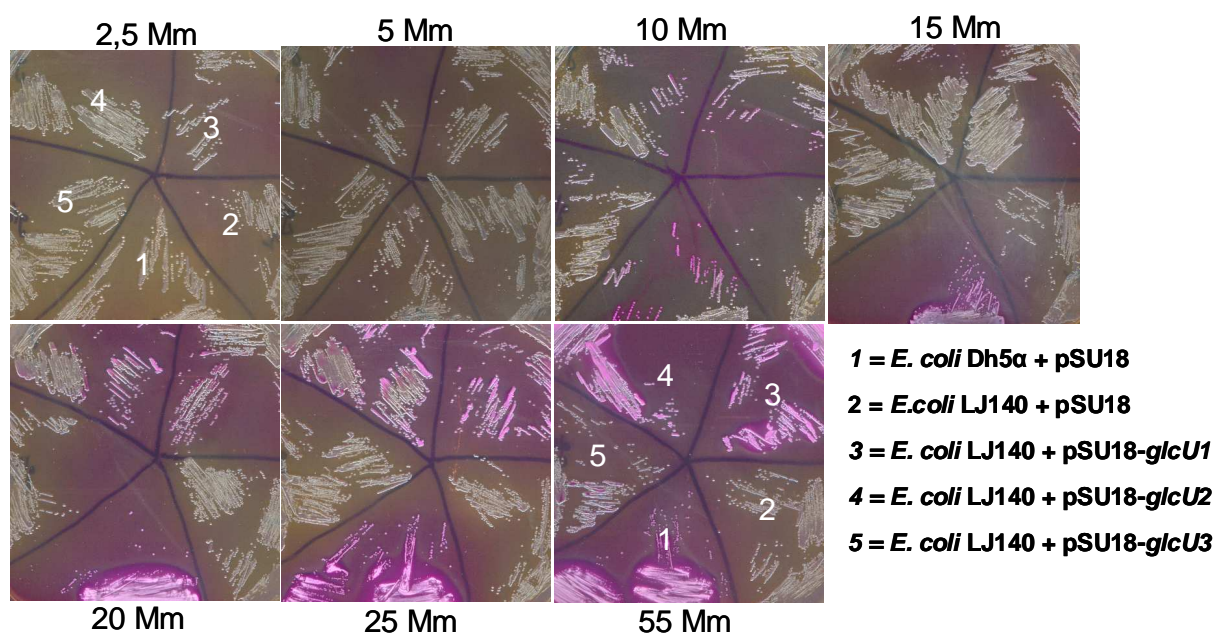


Figure 29 : Complémentation hétérologue sur gélose MacConkey additionnée de glucose à différentes concentrations dans les différents mutants réalisés à cet effet.

II-2- Modulation de l'activité de PrfA par les PTS^{Man} et PTS^{Mpo} en présence de mannose et de fructose

Des substrats carbonés PTS tels que le cellobiose, le glucose, le fructose, le mannose entraînent une diminution de l'activité de PrfA et donc une diminution du taux d'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993; Stoll *et al.*, 2008). Nous avons montré l'implication des composants PTS^{Man} et PTS^{Mpo} dans la régulation de PrfA en présence de glucose. Des dosages de l'activité β -D-glucuronidase ont été réalisés dans la souche AML73 et dans les mutants PTS (*mpo*, *man*, *ptsI*) et non-PTS (*glcU*) construits dans cette souche, qui comporte dans son génome une fusion *Phly-gus*, rapporteur de l'activité de PrfA. Nos résultats ont montré que les mutations *manL* et *manM* entraînent une activité β -D-glucuronidase élevée à de faibles concentrations en glucose (2,5 à 20 mM sur HTM ; 5 et 10 mM en MM) et moins élevée à de fortes concentrations (supérieures ou égales à 25 mM). Le mutant Δ *mpoB* montre une augmentation de l'activité β -D-glucuronidase en MM, à toutes les concentrations en glucose testées. Les mutants *glcU* (mutant par inactivation de gène *glcU* dans *L. monocytogenes*) présentent une activité β -D-glucuronidase comparable à la souche sauvage (Figure 30). Les résultats obtenus pour les cellules en phase stationnaire en MM contenant 25 mM glucose sont similaires à ceux obtenus pour les cellules en phase exponentielle (Figure 30). Ces données suggèrent que l'activité de la β -D-glucuronidase ne varie pas de manière significative en phase exponentielle et stationnaire.

L'effet de la présence de mannose ou de fructose a également été étudié. Les tests de dosage de l'activité β -D-glucuronidase ont été réalisés sur milieu HTM additionné de mannose ou de fructose (Figure 31) à des concentrations de 2,5 à 55 mM. On observe dans le mutant Δ *ptsI*, une activation de PrfA en présence de fructose à partir de 15 mM. Dans ce mutant également, une activation de PrfA est observée quelle que soit la concentration de mannose testée. Dans les mutants Δ *mpoB* et Δ *manL*, on observe une activation de PrfA à de faibles concentrations en mannose (2,5 et 5 mM). A de fortes concentrations en mannose, ces mutants montrent un phénotype similaire à la souche sauvage (Figure 31) et donc une inactivation de PrfA. En présence de fructose également, les mutants Δ *manL* et Δ *mpoB* présentent un phénotype comparable à la souche sauvage quelque soit la concentration testée (Figure 31). Les résultats obtenus en présence de mannose sont similaires à ceux obtenus en présence de glucose (décrit dans l'article précédent). Cependant, les résultats obtenus en présence de fructose diffèrent de

ceux obtenus en présence de glucose ou de mannose, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs dans la modulation de l'activité de PrfA autres que les composants des PTS^{Man} et PTS^{Mpo}.

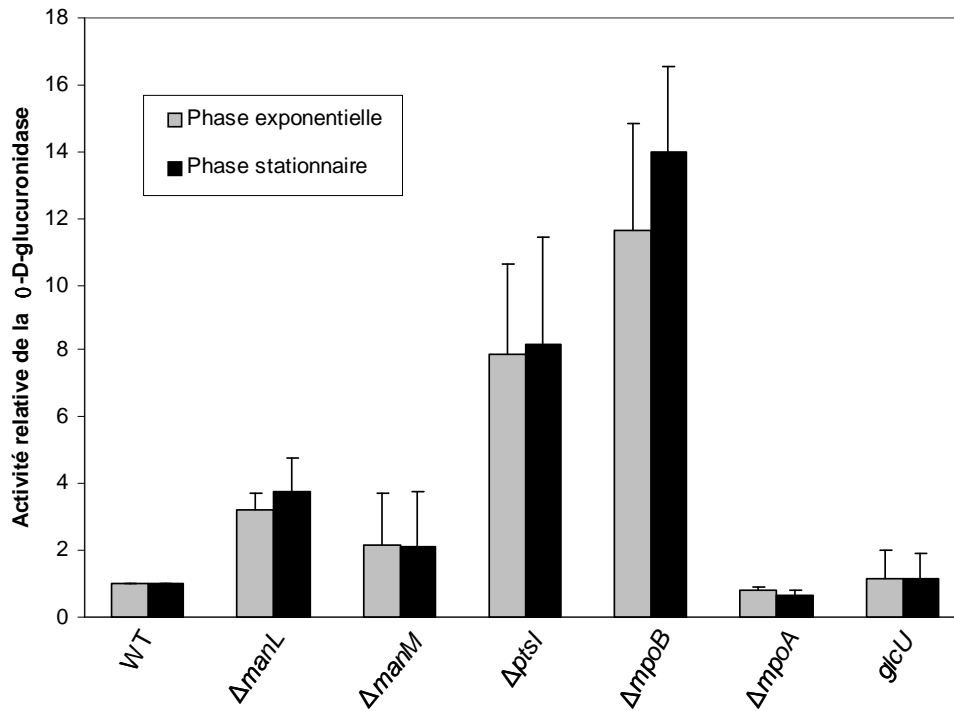


Figure 30: Test de dosage β -D-glucuronidase en MM additionné de 25 mM glucose dans la souche AML73 (WT) et dans les différents mutants. Résultats normalisés par rapport à la souche sauvage.

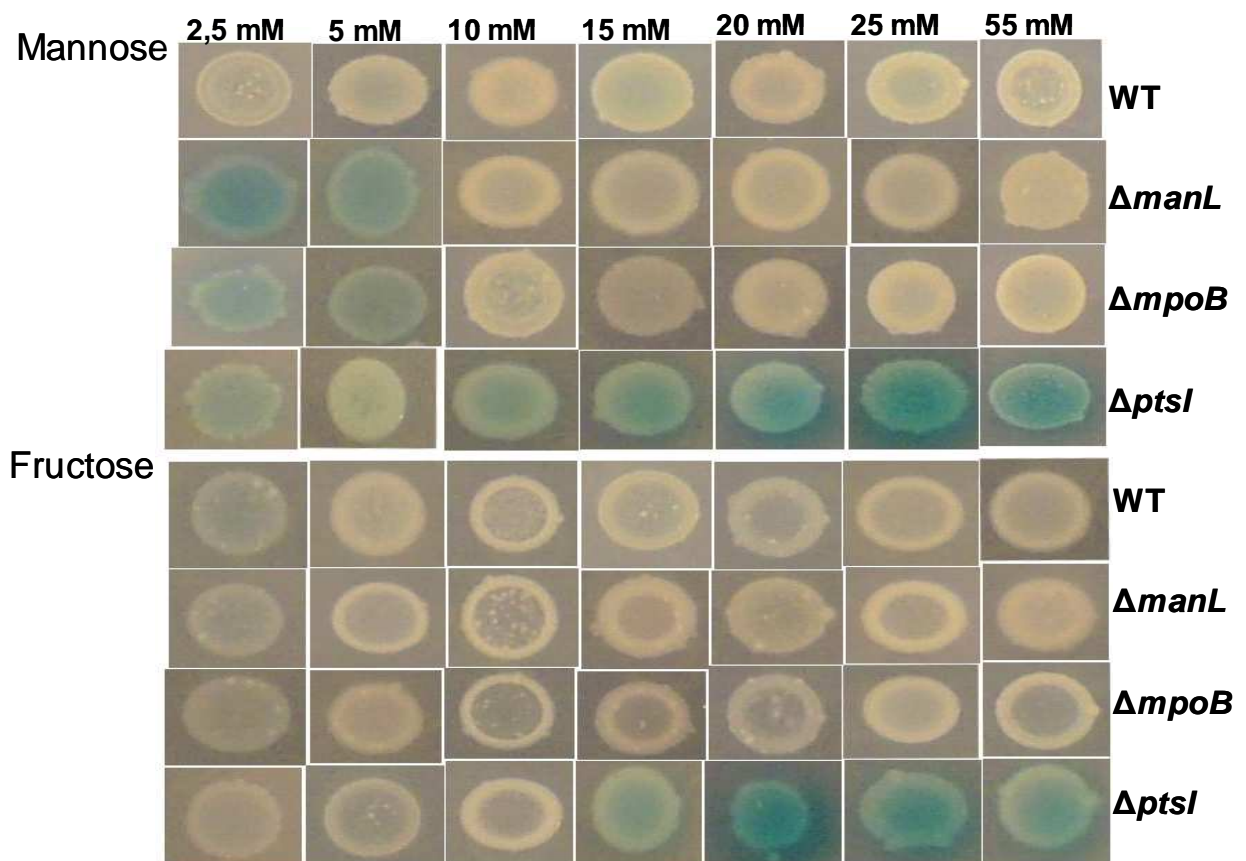


Figure 31 : Test de dosage β -D-glucuronidase sur HTM contenant du mannose ou du fructose à différentes concentrations, dans la souche AML73 (WT) et dans les mutants $\Delta manL$, $\Delta mpoB$, $\Delta ptsI$.

II-3- Effets des mutations PTS sur l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (*actA* et *hly*)

La protéine PrfA régule l'expression de nombreux gènes de virulence chez *L. monocytogenes* comme *actA*, *hly*, *plcB* situés sur l'îlot de pathogenicité ou dans d'autres régions du chromosome (*inlA*, *inlB*, *hpt*) (Freitag *et al.*, 2009; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b). Nous avons montré l'effet des mutation PTS sur l'expression de deux gènes contrôlés par PrfA (*actA* et *hly*). Les résultats obtenus pour les cellules en phase exponentielle, mentionnés dans l'article précédent montrent une augmentation de l'expression des gènes *actA* et *hly* dans les mutants $\Delta manL$, $\Delta manM$ et $\Delta mpoB$ comparée à la souche sauvage. Par contre, les niveaux

d'expression des gènes *actA* et *hly* étaient comparable à la souche sauvage dans le mutant $\Delta mpoA$, comme attendu, mais également de manière plus étonnante dans le mutant $\Delta ptsI$. Les résultats obtenus pour les cellules en phase stationnaire de croissance (Tableau 13) sont similaires à ceux obtenus pour les cellules en phase exponentielle sauf que, l'expression des gènes *actA* et *hly* dans les mutants $\Delta manL$, $\Delta manM$ et $\Delta mpoB$ en phase stationnaire est moins élevée qu'en phase exponentielle. L'augmentation la plus forte était observée dans le mutant $\Delta mpoB$, de 5 à 6 fois pour l'expression de *hly* et de 4 à 42 fois pour l'expression de *actA* (Tableau 13). Une augmentation de 3 à 5 fois l'expression du gène *hly* et 3 à 20 fois l'expression du gène *actA* est observée dans le mutant $\Delta manL$ aux concentrations en glucose testées (Tableau 13). Le mutant $\Delta manM$ montre une augmentation de 2 à 4 fois l'expression de *hly* et de 2 à 14 fois l'expression de *actA* (Tableau 13).

Tableau 13 : Expression des gènes *actA* et *hly* mesurée en qRT-PCR dans la souche AML73 (WT) et les différents mutants, en phase stationnaire de croissance. Résultats normalisés par rapport à la souche sauvage. Les écart-types sont entre parenthèses.

Genes Souches	MM + 10 mM glucose		MM + 25 mM glucose	
	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>
WT	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
$\Delta manL$	3,64 (0,96)	3,09 (0,9)	5 (1,33)	20,84 (2,75)
$\Delta manM$	2,71 (0,67)	2,62 (0,42)	4,26 (1,46)	14,05 (11, 88)
$\Delta mpoB$	5,71 (1,14)	4,69 (0,38)	6,2 (0,93)	42,98 (11,09)
$\Delta ptsI$	0,17 (0,1)	0,16 (0,1)	0,2 (0,09)	0,52 (0,3)
$\Delta mpoA$	0,49 (0,12)	0,26 (0,04)	0,34 (0,27)	0,44 (0,3)

II-4- Rôle dans la virulence

Un mutant qui ne synthétise pas de protéine PrfA ou qui possède une protéine PrfA inactive montre une absence d'expression des gènes de virulence. Ce mutant est incapable d'infecter la souris et de croître dans une cellule hôte (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Vázquez-Boland *et al.*, 2001b).

Afin d'étudier l'effet de l'augmentation de l'activité de PrfA dans les mutants $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$ sur la virulence, des tests d'invasion ont été réalisés sur les cellules Jeg-3 (cellules épithéliales de choriocarcinome placentaire humain) et Caco-2 (cellules épithéliales d'adénocarcinome de colon humain). Des tests d'infection *in vivo* dans la souris ont également été effectués.

Ce travail est réalisé en collaboration avec l'Unité des Interactions Bactéries-Cellules dirigée par le Pr Pascal Cossart de l'Institut Pasteur de Paris. Les mutants $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$ utilisés pour ces tests ont été construits dans la souche EGDe.

2 10^5 cellules Jeg-3 sont déposées dans des puits de plaque 24 puits et incubées 24 h à 37°C en présence de 5% CO₂. Les cellules sont ensuite infectées avec une multiplicité d'infection d'environ 50 bactéries par cellules et incubées pendant 1 h à 37°C. Après 1 h de contact, les cellules sont lavées afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. Après 1h et 3 h d'incubation, les cellules sont lysées en présence de PBS contenant 0,1% de triton et les bactéries sont dénombrées.

A 1 h d'infection, le mutant $\Delta manL$ montre un phénotype similaire à la souche sauvage (Figure 32). Par contre, une augmentation du nombre de bactéries est observée dans les cellules infectées par le mutant $\Delta ptsI$ par rapport à la souche sauvage (Figure 32). Ce qui suggère que le mutant $\Delta ptsI$ serait plus invasif que la souche sauvage. Après 3 h d'infection, on observe un phénotype des mutants testés comparable à la souche sauvage (Figure 32).

Comme précédemment, les cellules Caco-2 sont également infectées avec la souche sauvage et les souches $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$ avec une multiplicité d'infection de 50 bactéries par cellules. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus dans l'infection des cellules Jeg-3. Après 1 h d'infection, une augmentation du nombre de bactéries $\Delta ptsI$ dans les cellules Caco-2 par rapport à la souche sauvage est observée. Le mutant $\Delta manL$ par contre, montre un phénotype similaire à la souche sauvage. Après 3 h d'infection, on observe un phénotype des 2 mutants comparable à la souche sauvage (Figure 33).

Ces résultats suggèrent que le mutant $\Delta ptsI$ pénètre mieux dans les cellules épithéliales en culture. En effet, on retrouve environ 6 fois plus de mutant $\Delta ptsI$ à 1h d'infection comparé à la

souche sauvage. En revanche, une fois que ce mutant a pénétré dans les cellules, il se comporte comme la souche sauvage, ce qui est probablement dû à sa croissance plus lente, également observée en BHI, ou à une faible résistance aux conditions intracellulaires.

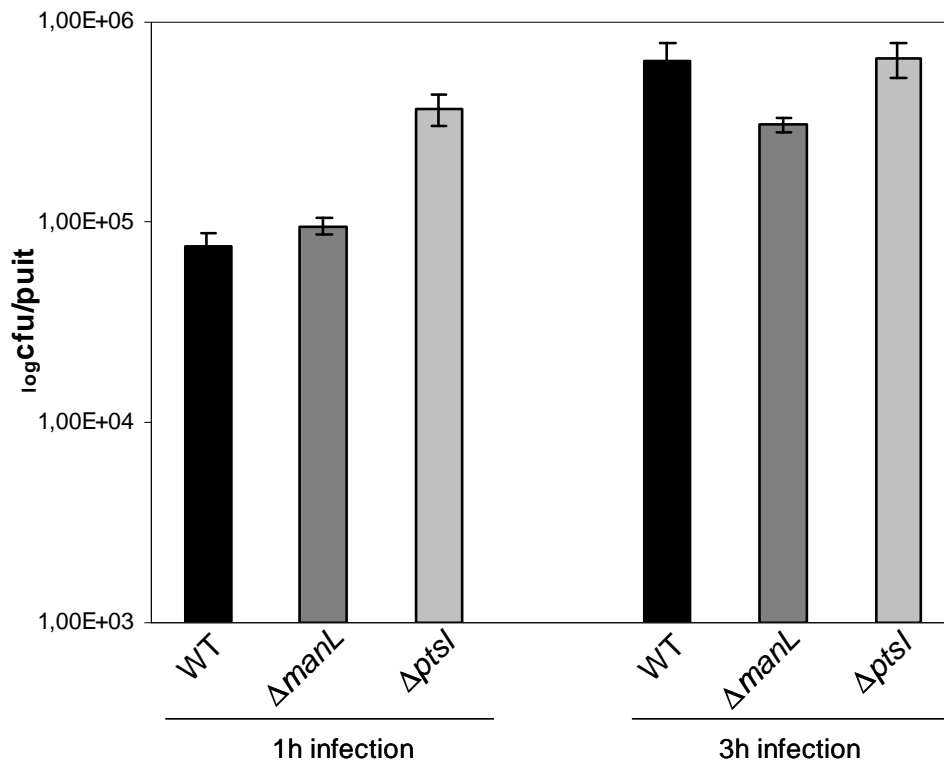


Figure 32 : Infection des cellules Jeg-3 par la souche EGDe (WT) et par les mutants $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$.

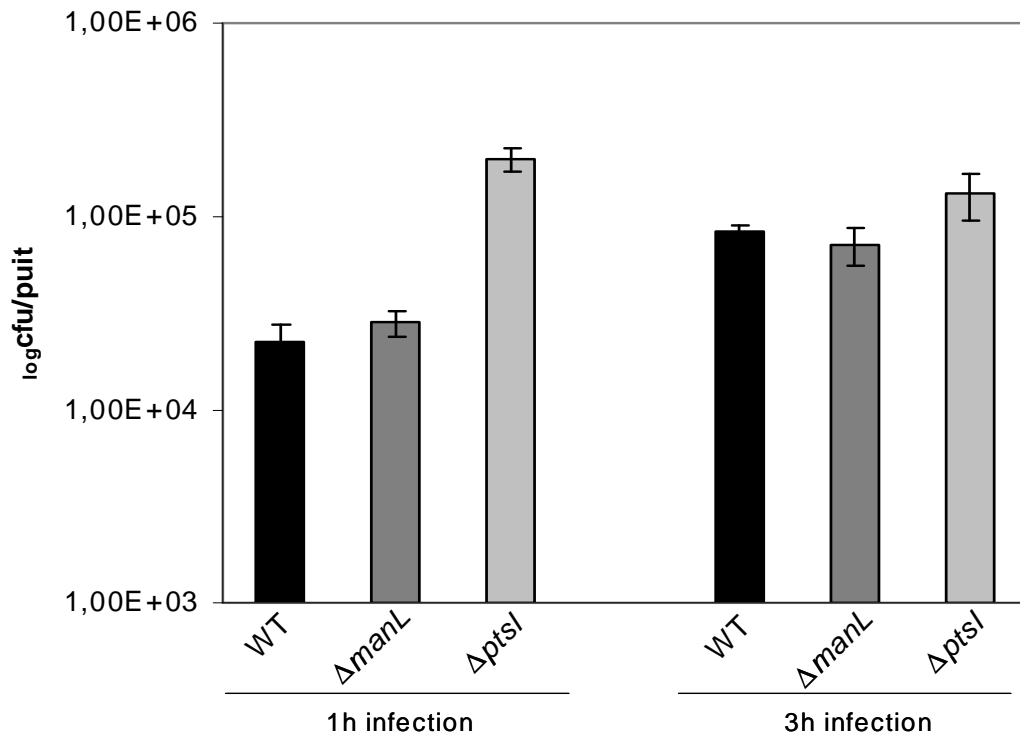


Figure 33 : Infection des cellules Caco-2 par la souche EGDe (WT) et par les mutants $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$.

Les résultats obtenus *in vitro* avec le mutant $\Delta ptsI$ après 1 h d'infection suggèrent que le mutant $\Delta ptsI$ serait plus virulent que la souche sauvage au moment des étapes précoces de l'infection probablement lors de l'entrée dans les cellules. Des expériences de qRT-PCR ont été réalisées (sur des cultures bactériennes effectuées en BHI) afin d'estimer dans les mutants $\Delta ptsI$ et $\Delta manL$, l'expression des gènes *inlA* et *inlB*, codant respectivement pour les protéines InlA et InlB responsables de l'entrée dans les cellules hôtes (Gaillard *et al.*, 1991; Ireton, 2007).

Une augmentation (5 fois) de l'expression du gène *inlA* dans le mutant $\Delta ptsI$ par rapport à la souche sauvage (Figure 34) est observée. L'expression de ce gène dans le mutant $\Delta manL$ est comparable à la souche sauvage (Figure 34). L'expression du gène *inlB* est moins élevée que celle de *inlA* et est similaire dans les trois souches testées (Figure 34).

Des tests d'infection *in vitro* dans les macrophages j774 ont également été réalisés. Les premiers résultats suggèrent que les mutations *manL* et *ptsI* ne jouent pas de rôle dans l'infection des macrophages. Des expériences seront effectuées à nouveau afin de mieux élucider l'effet des mutations PTS (*manL* et *ptsI*) dans l'infection des macrophages.

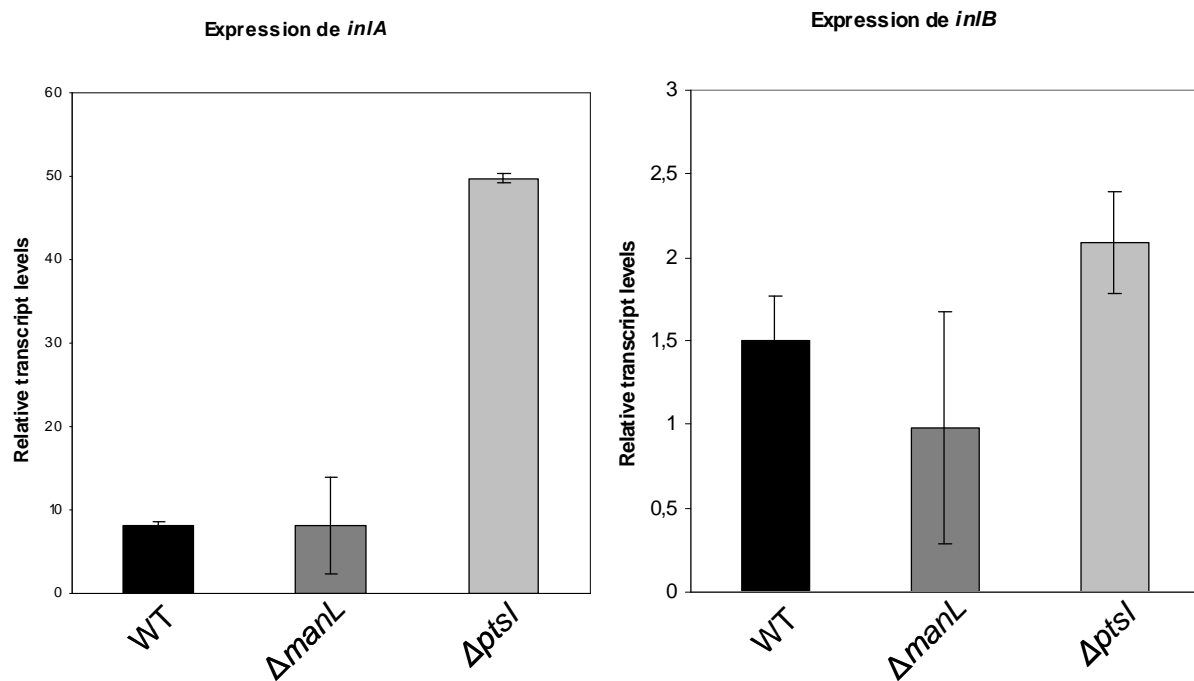


Figure 34 : Expression des gènes *inlA* et *inlB* dans la souche EGDe (WT) et dans les mutants $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$ en BHI.

Des infections *in vivo* chez la souris ont aussi été effectuées afin d'identifier l'effet des mutations PTS (*man*, *mpo*, *ptsI*). Ces tests sont réalisés dans des souris femelles de 8 semaines. Les souris sont infectées par voie intraveineuse avec 10^4 bactéries par souris. Les résultats sont interprétés après 72 h d'infection par analyse du taux de bactéries dans le sang, la rate, le foie et le cerveau. Les résultats préliminaires obtenus ne montrent pas de différence significative entre les souris infectées par les mutants et les souris infectées par la souche sauvage. Des travaux seront à nouveau réalisés par infection par voie orale ou dans d'autres modèles animaux afin d'identifier un potentiel rôle de ces mutations *in vivo*.

DISCUSSION GENERALE

La croissance de *L. monocytogenes* en présence d'hydrates de carbone rapidement métabolisables (glucose, cellobiose, fructose, mannose) exerce un effet répressif sur des opérons cataboliques et sur l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (Brehm *et al.*, 1999; Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). Les composants du PTS semblent jouer un rôle dans la régulation de PrfA et des gènes de virulence PrfA-dépendants. Cependant, les détails du mécanisme d'action du PTS n'ont pas encore été bien élucidés. L'objectif de ce travail était d'étudier les systèmes principaux de transport de glucose chez *L. monocytogenes* et leur impact dans la régulation de la virulence en vue de mieux comprendre le mécanisme d'action du PTS.

Nous avons dans un premier temps étudié les transporteurs PTS et non-PTS de glucose et leur régulation. Les transporteurs PTS qui ont fait l'objet de cette étude sont ceux de la classe mannose. Deux de ces PTS de la classe mannose seraient principalement impliqués dans le transport de glucose chez *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 2001; Stoll and Goebel, 2010). Dans un second temps, nous avons essayé de mettre en évidence l'implication des transporteurs PTS et non-PTS dans la régulation de PrfA. L'effet des mutations PTS et non-PTS a été étudié sur l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (*actA* et *hly*).

1-Transporteurs PTS^{Man} et PTS^{Mpo}

L'un des transporteurs PTS de glucose de la classe mannose chez *L. monocytogenes* est codé par l'opéron *manLMN* ; c'est le transporteur principal de glucose/mannose chez plusieurs firmicutes (Yebra *et al.*, 2006). La délétion du gène *manL* ou *manM* entraîne une croissance plus faible de la bactérie à de faibles concentrations en glucose (5, 10 mM) par rapport à la souche sauvage (Figures 2A et 2B énumérées dans l'article). A partir de 15 mM glucose, on observe une croissance des mutants $\Delta manL$ et $\Delta manM$ qui dévient quasiment comparable à la souche sauvage (Figures 2C et 2D énumérées dans l'article ; Figure 27). Les mutants *manL*, *manM* et *manN* par inactivation de gènes montrent une croissance similaire aux mutants, $\Delta manL$ et $\Delta manM$ (par délétion de gènes). On observe alors une croissance similaire des mutants *man* (mutants par inactivation et délétion de gènes). Ceci permet de montrer l'implication des composants *man* dans le transport de glucose. Des tests de consommation de glucose ont également permis de montrer que les mutants $\Delta manL$ et $\Delta manM$ sont affectés dans l'utilisation de glucose (Figures 3A et 3B énumérées dans

l'article ; Figure 28). Ces données confirment le transport de glucose par le PTS^{Man}. Les tests de croissance couplés aux tests de consommation de glucose ont permis de mettre en évidence une meilleure utilisation du glucose des mutants *man* par rapport au mutant $\Delta ptsI$ (*ptsI* code pour la protéine générale du PTS : EI) (Figures 27 et 28). Cela nous permet de déduire qu'il existe d'autres transporteurs PTS permettant le transport de glucose. Ces transporteurs pourraient être le PTS^{Mpo}, le PTS^{Glc-1} codé par le gène *lmo0027* et le PTS^{Man-4} codé par l'opéron *lmo1997/lmo2000-2002* (Dalet *et al.*, 2001; Stoll and Goebel, 2010).

Le second transporteur de glucose de la classe mannose est codé par l'opéron *mpoABCD* (Xue and Miller, 2007). L'inactivation de l'opéron *mpo* (mutant *mpoA* par inactivation de gène) entraîne une croissance plus faible de la bactérie par rapport à la souche sauvage (Figure 27). On observe cependant, une croissance du mutant $\Delta mpoA$ comparable à la souche sauvage. Par contre, à de faibles concentrations en glucose (5, 10 mM), le mutant $\Delta mpoB$ montre une croissance significativement réduite par rapport à la souche sauvage (Figures 2A et 2B énumérées dans l'article). Cette différence de croissance disparaît pratiquement à des concentrations de glucose de 15 mM ou plus (Figures 2C et 2D énumérées dans l'article). Les tests de consommation de glucose ont permis de montrer que le mutant $\Delta mpoA$ n'est pas affecté dans l'utilisation de glucose (Figure 28). En revanche, le mutant $\Delta mpoB$ présente une très faible consommation de glucose comparée à la souche sauvage (Figures 3A et 3B énumérées dans l'article). Il montre aussi, une consommation de glucose similaire au double mutant $\Delta manL/mpoA$ (Figure 3), ce qui laisse présager que dans ce mutant ($\Delta mpoB$), le PTS^{Man} pourrait également être inactif.

Les effets antagonistes des trois différents mutants *mpo* (*mpoA*, $\Delta mpoA$, $\Delta mpoB$) sur l'utilisation de glucose étaient difficiles à interpréter. La délétion du premier gène, *mpoA* (codant pour EIIA^{Mpo}) n'a pas d'effet ; en revanche son inactivation par insertion avec des effets polaires sur les gènes en aval inhibe fortement l'utilisation du glucose. Le même résultat est obtenu quand *mpoB*, le deuxième gène de l'opéron (codant pour EIIB^{Mpo}) est délété. Il a été montré que l'opéron *mpo* joue un rôle dans la régulation de l'expression de l'opéron *man* (Arous *et al.*, 2004b; Stoll and Goebel, 2010). Le régulateur principal de l'opéron *man* est ManR, un activateur de transcription de la famille LevR (Xue *et al.*, 2005; Xue and Miller, 2007), dont le gène est situé en amont de l'opéron *mpo*. L'inactivation des gènes codant les EII qui contrôlent LevR de *B. subtilis* ou *L. casei* entraîne une expression constitutive des gènes sous contrôle de LevR. Nous avons donc décidé de réaliser des travaux permettant de mettre en évidence les détails de la régulation de l'opéron *man* par les

composants EII du PTS^{Mpo} et d'étudier le rôle spécifique de l'EIIB^{Mpo} dans la régulation de ManR qui semble différent de la régulation de LevR. Afin de mieux comprendre la régulation de l'opéron *man* par l'opéron *mpo*, des tests de qRT-PCR ont été réalisés à cet effet.

2- Régulation de l'opéron *man* et *mpo*

Les protéines LevR-like sont soumises à une double régulation par les composants du PTS. La phosphorylation par l'EI et l'HPr est nécessaire pour l'activation de ManR. En effet, le mutant $\Delta ptsI$ montre une très faible expression de l'opéron *man* et une forte expression de l'opéron *mpo* (Figure 1D mentionnée dans l'article). Le site de phosphorylation par l'EI et l'HPr est probablement l'histidine-506 dans PRD1 de ManR (Figure 35 ci-dessous) car le remplacement de cette histidine par l'alanine chez ManR de *L. innocua* inhibe également l'expression de l'opéron *man* (Xue and Miller, 2007). La deuxième phosphorylation des protéines LevR-like nécessite la présence de l'EI, l'HPr, l'EIIA et l'EIIB et entraîne un effet négatif sur l'activateur de transcription. Dans le cas de ManR, le site de phosphorylation par la P~EIIB est probablement l'histidine-871 (Figure 35) parce que le remplacement de cette histidine par alanine chez ManR de *L. innocua* permet une expression constitutive de l'opéron *man* (Xue and Miller, 2007). En accord avec ce modèle, la délétion de *mpoA* qui empêche la phosphorylation du résidu His-871, entraîne également une expression constitutive de l'opéron *man* (Figure 1B mentionnée dans l'article). Comme déjà mentionné, Stoll et Goebel ont montré qu'une très faible expression de l'opéron *man* était observée dans le mutant portant une délétion de l'opéron *mpo* entier (mutant $\Delta mpoABCD$) (Stoll and Goebel, 2010). Ce qui est en accord avec nos résultats montrant une très faible expression de l'opéron *man* dans le mutant portant une insertion dans le gène *mpoA* avec des effets polaires empêchant l'expression des gènes en aval (confirmé par des expériences de qRT-PCR). Par analogie avec la régulation de LevR, la délétion ou l'inactivation de l'opéron *mpo* aurait également dû permettre une expression constitutive de l'opéron *man*. Nos résultats suggèrent que ManR aurait besoin d'un composant du PTS^{Mpo} afin d'être active, mais pas l'EIIA^{Mpo} car l'absence permet une activation constitutive de ManR et l'inactivation ou la délétion de tout l'opéron *mpo* entraîne une inhibition de ManR (car très faible expression de l'opéron *man*). Nous avons donc délété le gène *mpoB* (codant pour l'EIIB^{Mpo}), ce qui entraîne une très faible expression de l'opéron *man* similaire à la délétion de l'opéron entier (Figure 1B mentionnée dans l'article) et par conséquent une inhibition de l'activité de ManR. Ce résultat suggère que,

ManR pour être active, nécessiterait la présence de l'EIIB^{Mpo} sous forme non phosphorylée (Figure 1C mentionnée dans l'article) car dans le mutant $\Delta mpoA$ qui montre une expression constitutive de l'opéron *man*, l'EIIB^{Mpo} n'est pas phosphorylée. Cette activation pourrait être due à une interaction directe de ManR avec l'EIIB^{Mpo}. L'EIIB exercerait donc deux fonctions dans la régulation de ManR :

a- sous forme phosphorylée (en absence de mannose ou glucose), elle transfère son groupement phosphate vers l'histidine-871 et par conséquent empêche l'induction de l'opéron *man* (Figure 35).

b- sous forme non phosphorylée (en présence de mannose ou glucose), l'EIIB^{Mpo} interagit probablement avec ManR et stimule son activité (Figure 35).

Un modèle de la régulation de l'activité de ManR est proposé en figure 35. Dans ce modèle, l'induction de l'opéron *man* via l'activation de ManR requiert dans un premier temps, la présence de la forme non phosphorylée de l'EIIB^{Mpo} qui est probablement dominante en présence de glucose. L'EIIB^{Mpo} sous la forme non phosphorylée interagirait donc avec ManR. La forme non phosphorylée de l'EIIB^{Mpo} présente en majorité en présence de glucose assure ainsi que, peu de molécules de ManR soient phosphorylées sur l'histidine-871 dans PRD2 entraînant une inactivation. Enfin, l'induction de l'opéron *man* nécessiterait la phosphorylation du domaine PRD1 de ManR par la P~His-HPr. Cette phosphorylation diminue en présence d'autres sucres PTS rapidement métabolisables dans le milieu et elle sert de mécanisme de la répression catabolique CcpA-indépendante. L'induction de l'opéron *man* est réalisée seulement, lorsque ces trois conditions sont réunies, permettant l'activation de ManR:

a- interaction avec la protéine EIIB^{Mpo}

b- déphosphorylation de l'histidine-871

c- phosphorylation sur l'histidine-506

Afin de mieux mettre en évidence ce mécanisme, des tests de complémentation du mutant $\Delta mpoB$ avec différents allèles de ce gène (gène sauvage, His14Ala et His14Asp) ont été réalisés. Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'EIIB^{Mpo} sous forme non phosphorylée est nécessaire pour l'expression de l'opéron *man* et donc pour l'activation de ManR (Figure 1C mentionnée dans l'article). Nous avons également montré que l'effet du PTS^{Mpo} sur l'expression de l'opéron *man* est bien dépendant de manR (Figure 1B mentionnée dans l'article). Des tests d'interaction entre ManR et EIIB^{Mpo} seront par la suite réalisés.

Ce modèle de régulation de ManR ressemble à la régulation de MtlR de *B. subtilis*, un activateur de transcription LicR-like. Des tests génétiques ont permis de suggérer que l'EIIB^{Mtl} sous forme non phosphorylée interagirait et stimulerait MtlR pour être active. L'inactivation du gène codant pour la protéine EIIA^{Mtl} entraîne une expression constitutive de l'opéron *mtl* (code pour les transporteurs du mannitol et la mannitol-1-P déshydrogénase) (Joyet *et al.*, 2010). Par contre, la délétion simultanée des gènes codant l'EIIA^{Mtl} et l'EIIB^{Mtl} entraîne une forte diminution de l'expression de l'opéron *mtl* et donc une inactivation de MtlR. Des expériences de double hybride chez la levure « yeast two hybrid » ont permis de mettre en évidence une interaction directe entre MtlR et EIIB^{Mtl} (données non publiées).

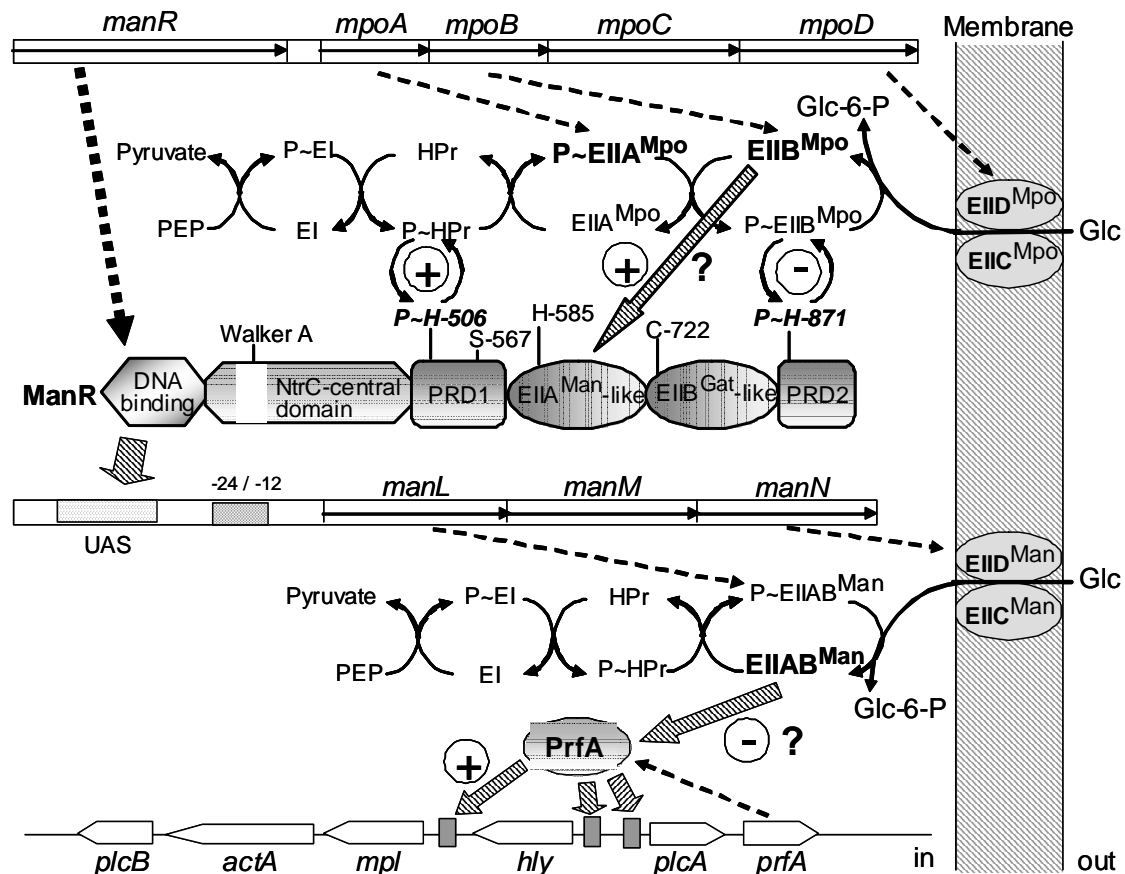


Figure 35 : Modèle proposé pour la régulation de l'expression de l'opéron *man* et l'activité de PrfA via l'activation de ManR contrôlée par le PTS^{Mpo}.

Les données de qRT-PCR ont également permis de montrer que l'opéron *man* est induit par le glucose et l'opéron *mpo* est exprimé de manière constitutive. On observe une expression de l'opéron *man* dans la souche sauvage en présence de glucose. En revanche, en présence de

glycérol, une très faible ou inexistante expression de l'opéron *man* est observé dans la souche sauvage (Figure 1A mentionnée dans l'article). Ce qui est en accord avec les travaux de Hechard et ses collaborateurs montrant une forte expression de l'opéron *man* dans la souche sauvage EGDe en présence de glucose et de mannose, une faible expression en présence de fructose et une très faible expression en présence de cellobiose (Dalet *et al.*, 2001). On observe par ailleurs, une induction de l'opéron *mpo* dans la souche sauvage indépendamment de la croissance des bactéries en présence de glucose ou de glycérol (Figure 1A mentionnée dans l'article).

Les différentes données sur la croissance et la consommation de glucose associées aux données sur la régulation, permettent d'affirmer que le PTS^{Man} est le système principal de transport de glucose et ce système est induit en présence de glucose. Le PTS^{Mpo} est exprimé de manière constitutive et son rôle principal serait de fonctionner comme senseur de glucose et de transmettre le signal en phosphorylant et/ou interagissant avec ManR afin de contrôler l'expression de l'opéron *man*. Toutefois, ce PTS^{Mpo} permettrait aussi le transport de glucose chez *L. monocytogenes* mais avec une affinité plus faible que le PTS^{Man}. Des études plus approfondies sur la régulation de ManR par les composants du PTS^{Mpo} pourront par la suite être réalisées. Des études de phosphorylation *in vitro* avec ManR sauvage et différentes formes mutées sont également envisageables afin de confirmer les sites de phosphorylation.

3- Inactivation du gène *ptsI* et les transporteurs non-PTS de glucose

Chez la plupart des firmicutes, la délétion du gène *ptsI* entraîne une rupture complète des différentes fonctions attribuées au PTS (Deutscher *et al.*, 2006). Le mutant $\Delta ptsI$ est donc incapable de transporter le glucose via le PTS. Ce mutant utilise très faiblement le glucose par rapport à la souche sauvage. Il consomme 8 à 10 fois moins vite le glucose que la souche sauvage et 2 fois moins vite que le mutant $\Delta mpoB$ (Figures 3A et 3B mentionnées dans l'article). Le mutant $\Delta ptsI$ montre une très faible croissance en MM additionné de glucose à de basses concentrations (Figure 26). A partir de 15 mM, on observe une croissance modérée mais toujours faible par rapport à la souche sauvage (Figures 2C et 2D mentionnées dans l'article). La différence d'utilisation de glucose entre les mutants $\Delta manL$, $\Delta mpoB$ et le mutant $\Delta ptsI$ (Figures 3A et 3B mentionnées dans l'article) suggère que *L. monocytogenes* possède d'autres transporteurs PTS pour le glucose dont le PTS^{Glc-1} et un autre PTS de la classe mannose, PTS^{Man-4} codée par les gènes *lmo1997/lmo2000-2002*. Ces transporteurs sont

surexprimés dans les mutants $\Delta manLMN$ et $\Delta mpoABCD$ permettant une croissance de ces mutants à partir de 10 mM glucose (Stoll and Goebel, 2010). Le glucose pourrait également être transporté via un ou plusieurs PTS cellobiose comme montré chez *L. lactis* (Castro *et al.*, 2009). La croissance du mutant $\Delta ptsI$ à partir de 10 mM glucose (bien que très faible par rapport à la souche sauvage) nous permet de déduire que *L. monocytogenes* posséderait des transporteurs non-PTS de glucose.

En effet, 3 protéines (GlcU1, GlcU2 et GlcU3) ont été identifiées chez *L. monocytogenes* par homologie de séquences aux transporteurs de glucose GlcU chez d'autres firmicutes comme *L. lactis* et *S. xyloxy* (Castro *et al.*, 2009; Fiegler *et al.*, 1999). L'inactivation des gènes *glcU1* ou *glcU2* dans *L. monocytogenes* n'a aucun effet détectable sur l'utilisation de glucose chez cette souche. Cependant, la complémentation de la souche *E. coli* LJ140 (incapable de transporter le glucose) avec les gènes *glcU1* ou *glcU2* de *L. monocytogenes* permet l'utilisation de glucose à partir de 15 mM (Figure S1 mentionné dans l'article ; Figure 29). Ceci expliquerait la croissance du mutant $\Delta ptsI$ à partir de 15 mM glucose. La complémentation avec les gènes *glcU1* ou *glcU2* permet une meilleure utilisation de glucose à partir de 25 mM similaire aux souches utilisées comme témoins positifs (*E. coli* NM522 ; *E. coli* Dh5 α) (Figure S1 mentionnée dans l'article ; Figure 29). La complémentation avec le gène *glcU3* de *L. monocytogenes* permet une utilisation de glucose à partir de 55 mM (Figure 29). Ces données nous permettent d'affirmer que les protéines GlcU1, GlcU2 et GlcU3 sont des transporteurs non-PTS de glucose chez *L. monocytogenes* qui présentent cependant, une faible affinité pour le glucose principalement, le transporteur GlcU3.

4- Effets des transporteurs PTS et non-PTS sur l'activité de PrfA

En présence de sources de carbone facilement métabolisables (glucose, cellobiose, fructose, mannose), l'expression PrfA-dépendante de nombreux gènes de virulence est diminuée (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993). Nous avons dans ce travail, mis en évidence, en présence de glucose, mannose et fructose, l'effet des mutations touchant les gènes codant pour les transporteurs PTS et non-PTS de glucose, sur l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante de certains gènes de virulence (*actA* et *hly*).

- En présence de glucose

Afin de montrer une éventuelle implication des transporteurs de glucose (PTS et non-PTS) dans la régulation de l'activité de PrfA, des dosages β -glucuronidase rapportant l'expression d'une fusion *Phly-gus* et des tests de qRT-PCR ont été réalisés à partir de cultures bactériennes effectuées en MM. L'activité β -glucuronidase a aussi été montrée sur milieu HTM additionné de glucose à différentes concentrations. Plusieurs mutations touchant des composants du PTS ont montré un effet de dé-répression sur l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence. Cela n'est plus observé lorsque le gène *prfA* est délété dans ces différents mutants (Figures 4 et 5 mentionnées dans l'article). Ce qui permet d'affirmer que l'effet de ces mutations est dépendant d'un PrfA fonctionnel. La délétion du gène *manL* ou *manM* entraîne une augmentation de l'expression de la fusion *Phly-gus* et donc une augmentation de l'activité de PrfA en MM additionné de faibles concentrations en glucose. L'effet de ces mutations est moins fort à des concentrations élevées en glucose (à partir de 25 mM glucose) (Figure 4 mentionnée dans l'article). Ces résultats sont également observés sur HTM additionné de glucose à différentes concentrations. A de faibles concentrations en glucose (2,5 à 20 mM), une activation de PrfA dans le mutant $\Delta manL$ est observée ; par contre, dans le mutant $\Delta manM$, on observe une activation de PrfA jusqu'à seulement 5 mM glucose (Figure 5 mentionnée dans l'article). A de fortes concentrations, dans ces deux mutants, l'activité de PrfA est similaire à la souche sauvage. En outre, une augmentation de l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence *actA* et *hly* a été observée dans les mutants $\Delta manL$ et $\Delta manM$ (Tableau 1 mentionné dans l'article, Tableau 13).

En somme, la délétion du gène *manM* entraîne une légère augmentation de l'activité de PrfA tandis que dans le mutant $\Delta manL$, on observe une plus forte augmentation de l'activité de PrfA. Aussi, la délétion du gène *manL* et *manM* entraîne une diminution similaire de l'utilisation de glucose dans ces mutants.

La différence de l'activité de PrfA dans les souches $\Delta manL$ et $\Delta manM$ suggère que la protéine EIIAB^{Man} joue un rôle spécifique dans la régulation de l'expression des gènes de virulence. La forme non phosphorylée de l'EIIAB^{Man} pourrait probablement permettre l'inhibition de l'activité de PrfA en présence de glucose. Dans le mutant $\Delta manM$, un fort niveau d'expression du gène *manL* est observé lorsque la souche croit en présence de glucose (Figure 1A mentionnée dans l'article). Dans ces conditions, la protéine EIIAB^{Man} serait donc surproduite dans ce mutant et présente sous forme phosphorylée et non phosphorylée. Le ratio

EIIAB^{Man} phosphorylée/non phosphorylée dépend probablement de la concentration de glucose. A de faibles concentrations de glucose (2,5 et 5 mM), l'EIIAB^{Man} est présente en majorité sous la forme phosphorylée car dans ces conditions, le transport du glucose par les PTS^{Mpo}, PTS^{Glc-1} et PTS^{Man-4} est moins efficace (faible affinité) (Stoll and Goebel, 2010). La P~EIIAB^{Man} n'entraîne donc pas une inhibition de PrfA (Figure 35). A de plus fortes concentrations, l'utilisation du glucose par le PTS^{Mpo} devient similaire à celle du PTS^{Man}, ce qui entraîne une déphosphorylation partielle de toutes les protéines du PTS (Hogema *et al.*, 1998). Par conséquent, la protéine EIIAB^{Man} est majoritairement présente sous la forme non phosphorylée dans le mutant $\Delta manM$ entraînant ainsi une inhibition de PrfA à partir de 10 mM glucose.

Par ailleurs, la délétion du gène *mpoA* et l'inactivation des gènes *glcU* n'ont pas d'effet, ni sur l'utilisation du glucose, ni sur l'activité de PrfA. La plus forte augmentation de l'activité de PrfA et l'expression des gènes de virulence *actA* et *hly* est observée dans le mutant $\Delta mpoB$ (Figure 4 et Tableau 1 mentionnés dans l'article ; Figure 30). L'augmentation de l'activité de PrfA dans ce mutant résulterait de la très faible synthèse de la protéine EIIAB^{Man} (Figure 1B mentionnée dans l'article). Ce qui est le contraire dans le mutant $\Delta mpoA$ qui montre une expression constitutive du gène *manL* codant cette protéine. L'inhibition de PrfA dans les mutants $\Delta manL$ et $\Delta mpoB$ à des concentrations élevées en glucose (à partir de 25 et 15 mM respectivement) (Figure 5 énumérée dans l'article) sur HTM est probablement due à la présence du PTS^{Man-4} (PTS de la classe mannose codée par les gènes *lmo1997/lmo2000-2002*). Comme mentionné précédemment, à partir de 10 mM glucose, une augmentation de l'expression du PTS^{Man-4} est observée dans les mutants *man* et *mpo* (Stoll and Goebel, 2010). La forme non phosphorylée des composants EIIA et/ou EIIB de ce PTS^{Man-4} pourrait entraîner une inhibition de PrfA similaire à la protéine EIIAB^{Man}. Les composants EIIA et EIIB du PTS^{Man-4} montrent 47 à 58% de similarité avec les composants correspondants des PTS^{Man} et PTS^{Mpo}.

La délétion du gène *ptsI* entraîne une très faible expression de l'opéron *man* et le mutant $\Delta ptsI$ est incapable de transporter les sucres via le PTS. Dans ce mutant, une augmentation de l'activité β -D-glucuronidase est observée sur HTM à toutes les concentrations de glucose testées (2,5 mM à 55 mM) (Figure 5 énumérée dans l'article). Une augmentation de l'activité β -D-glucuronidase est également observée sur MM additionné de 25 mM glucose (Figure 4 mentionnée dans l'article ; Figure 30). L'activité β -D-glucuronidase dans ce mutant est plus élevée à de fortes concentrations de glucose, probablement due à la meilleure croissance du

mutant $\Delta ptsI$ à ces concentrations. Le mutant $\Delta ptsI$ montre une très faible expression du gène *manL* codant la protéine EIIAB^{Man} (Figure 1C mentionnée dans l'article) qui entraînerait une inhibition de PrfA. Nous déduisons de ces résultats que dans le mutant $\Delta ptsI$, les composants du PTS supposés entraîner une inhibition de PrfA sont faiblement synthétisés. La délétion du gène *ptsI* n'a cependant montré aucun effet sur l'expression des gènes *hly* et *actA* mesurée en qRT-PCR réalisée à partir de cultures de cellules en MM additionné de glucose. Des résultats préliminaires de qRT-PCR réalisé à partir de cultures de cellules en BHI ont montré une augmentation de l'expression de *hly* dans ce mutant. Mertins et ses collaborateurs ont préalablement montré que la délétion du gène *ptsH* (codant pour la protéine HPr : protéine générale du PTS) qui montre également une rupture totale des fonctions du PTS et probablement une très faible expression de l'opéron *man*, entraîne une augmentation de l'activité de PrfA (Mertins *et al.*, 2007). Ces données rejoignent nos résultats de cultures de cellules en BHI.

Les résultats de dosages de l'activité β -D-glucuronidase obtenus à partir de cultures de cellules en phase exponentielle de croissance sont identiques à ceux obtenus à partir de cultures de cellules en phase stationnaire (Figure 30). L'activité de la protéine PrfA n'est donc pas affectée par la phase de croissance des souches. Cependant, l'expression des gènes *actA* et *hly* mesurée en qRT-PCR est plus faible en phase stationnaire (Tableau 13) qu'en phase exponentielle (Tableau 1 énuméré dans l'article). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les ARNm seraient rapidement plus dégradés pendant la phase stationnaire de croissance que pendant la phase exponentielle.

- En présence de mannose et de fructose

L'effet des mutations PTS sur l'activité de PrfA a également été étudié sur HTM additionné de mannose et de fructose à différentes concentrations. Les résultats obtenus en présence de mannose sont similaires à ceux obtenus en présence de glucose (Figure 31). Les mutants contenant peu ou pas de EIIAB^{Man} montrent une augmentation de l'activité de PrfA en présence de mannose. L'opéron *man* est induit en présence de glucose et également en présence de mannose (Stoll and Goebel, 2010). L'inactivation de PrfA observée en présence de mannose dans la souche sauvage et dans le mutant $\Delta mpoA$ serait due à la présence de la protéine EIIAB^{Man} sous la forme non phosphorylée. Cette protéine est absente dans le mutant $\Delta manL$ et très faiblement produite dans les mutants, $\Delta mpoB$ et $\Delta ptsI$, d'où l'activation de PrfA dans ces mutants.

En présence de fructose, on n'observe aucune augmentation de l'activité de PrfA dans les mutants $\Delta manL$ et $\Delta mpoB$ comparé à la souche sauvage (Figure 31). Ce qui est le contraire des résultats observés en présence de glucose et de mannose. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que :

- d'une part, le PTS^{Man}-4 pourrait être induit dans les mutants *man* et *mpo* en présence de fructose. Le fructose est un sucre transporté par le PTS de la classe fructose et aussi par le PTS de la classe mannose (Barabote and Saier, 2005). Les composants du PTS^{Man}-4 pourraient alors inhiber PrfA en présence de fructose dans ces mutants.

- d'autre part, en présence de fructose ou d'autres sources de carbone transportés par le PTS, un intermédiaire de la glycolyse pourrait former un complexe avec la protéine EII spécifique du sucre, entraînant ainsi une inhibition de PrfA. L'hypothèse qu'un intermédiaire de la glycolyse et des EII spécifiques des sucres seraient impliqués dans la régulation de PrfA, n'est toutefois pas écartée. Ce qui permet d'affirmer que l'effet des mutations PTS observé ne dépendrait pas que de la protéine EIIAB^{Man} mais serait plus général.

En outre, la délétion du gène *ptsI* entraîne une activation de PrfA en présence du fructose à partir de 15 mM. Une meilleure croissance du mutant $\Delta ptsI$ est observée à des concentrations élevées de sucres. Dans le mutant $\Delta ptsI$, on observe une inexistante ou une expression résiduelle des transporteurs PTS ayant un effet sur PrfA (comme EIIAB^{Man}). Ce qui entraînerait une activation de PrfA dans le mutant $\Delta ptsI$ pendant la croissance sur fructose.

En somme, les mutations permettant la synthèse de peu ou pas de protéine EIIAB^{Man} entraînent une activation de PrfA. Ce qui est en accord avec les travaux de Larsen et ses collaborateurs montrant que l'inactivation du gène *resD* entraîne une forte diminution de l'expression de *manL* (codant la protéine EIIAB^{Man}) et une augmentation de l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence (*hly* et *plcB*) en présence de sucres PTS (Larsen *et al.*, 2006). La protéine EIIAB^{Man} aurait un rôle majeur dans la régulation de PrfA en réponse aux sucres PTS.

Nous avons par la suite proposé un modèle résumant la régulation de l'opéron *man* et de PrfA (Figure 35) dans lequel le PTS^{Mpo} jouerait le rôle de senseur de glucose et contrôlerait l'expression de l'opéron *man* en réponse à la présence ou non de glucose. En présence de glucose, l'EIIAB^{Man} est majoritairement sous forme non phosphorylée et interagirait directement avec PrfA pour l'inhiber ou indirectement via un co-facteur encore non identifié.

5- Rôle des mutations PTS dans la virulence

Nous avons par la suite, essayé d'identifier les effets des mutations PTS (*man* et *ptsI*) *in vitro* (infection des cellules épithéliales Caco-2 et Jeg-3) et *in vivo* dans la souris. La mutation *manL* n'entraîne pas d'effet dans l'infection des cellules épithéliales Caco-2 et Jeg-3 (Figures 32 et 33). Le mutant $\Delta manL$ montre une bonne croissance en BHI (milieu riche utilisé pour la préculture). La croissance de ce mutant dans le milieu BHI permettrait l'induction d'autres PTS comme le PTS^{Man}-4 (Stoll and Goebel, 2010) qui pourraient entraîner l'inhibition de PrfA. En revanche, le mutant $\Delta ptsI$ est plus invasif dans les cellules épithéliales Jeg-3 et Caco-2 après 1 h d'infection (Figures 32 et 33). Par contre, aucune différence entre le mutant $\Delta ptsI$ et la souche sauvage n'est observée après 3 h d'infection (Figures 32 et 33). Après 1 h d'infection, la multiplication bactérienne s'effectue probablement pendant l'entrée dans les cellules. Le mutant $\Delta ptsI$ est incapable de transporter un sucre via le PTS et montre également une activation de PrfA. L'augmentation de la virulence par rapport à la souche sauvage dans les cellules testées pourrait s'expliquer par l'absence de composants PTS ou d'un intermédiaire de la glycolyse entraînant normalement l'inactivation de PrfA en présence d'un sucre rapidement métabolisable. L'activation de PrfA entraîne une induction de l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence comme *inlA* et *inlB*. Du fait de la multiplication du mutant $\Delta ptsI$ dans les cellules après 1 h d'infection, nous avons cherché à étudier par des tests de qRT-PCR, l'expression des gènes *inlA* et *inlB* qui sont responsables de l'entrée de *L. monocytogenes* dans les cellules (Gaillard *et al.*, 1991; Ireton, 2007). L'expression du gène *inlA* est beaucoup plus élevée dans le mutant $\Delta ptsI$ que dans la souche sauvage (Figure 34). Ce qui explique la forte multiplication du mutant $\Delta ptsI$ dans les cellules Jeg-3 et Caco-2 après 1 h d'infection. En revanche, l'expression du gène *inlB* est similaire à la souche sauvage. Le mutant $\Delta ptsI$ ne montrant plus d'infection après 3 h, pourrait s'expliquer par le fait que, ce mutant étant incapable de croître en présence de sucre PTS, se présente sous forme de petites colonies très fragiles et cependant moins résistant aux conditions intracellulaires.

Par ailleurs, les résultats préliminaires des infections *in vivo* dans la souris ne permettent pas pour le moment d'émettre des affirmations sur l'effet des mutations PTS dans la régulation de la virulence *in vivo*. Des études plus approfondies seront réalisées à cet effet.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

CONCLUSION

De nombreuses études sur la régulation de PrfA et l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants ont été réalisées chez *L. monocytogenes*. En présence de certains sucres rapidement métabolisables tels que le glucose, le fructose, le mannose et le cellobiose, l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence est diminuée. Certaines données suggèrent une régulation de PrfA par les composants du PTS (Freitag *et al.*, 2009; Herro *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2008). L'objectif de cette recherche était d'étudier les systèmes de transport de glucose chez *L. monocytogenes* et leurs effets sur l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence.

La première partie de mon travail a consisté à étudier les transporteurs PTS et non-PTS de glucose et leur régulation. Nous avons en effet montré que la délétion des gènes *manL* et *manM* (opéron *man*) ou l'inactivation de cet opéron, également la délétion du gène *mpoB* ou l'inactivation de *mpoA* par insertion entraîne une diminution de l'utilisation de glucose. Ces données suggèrent que les protéines EIIB^{Man}, EIIC^{Man} et EIIB^{Mpo} jouent un rôle important dans l'utilisation de glucose chez *L. monocytogenes*. Cependant, la délétion du gène *mpoA* n'entraîne pas d'effet dans l'utilisation de glucose. Ces résultats nous suggèrent que le PTS^{Man} est le système principal de transport de glucose chez *L. monocytogenes*. Le PTS^{Mpo} permet également le transport de glucose chez cette bactérie mais avec une plus faible affinité. En outre, la croissance du mutant $\Delta ptsI$ bien que faible en présence de glucose, nous a permis d'émettre l'hypothèse que *L. monocytogenes* possède des transporteurs non-PTS. Alors, 3 gènes codant des protéines GlcU putatives (GlcU1, GlcU2 et GlcU3) ont été identifiés chez *L. monocytogenes* par similarités de séquences avec les transporteurs GlcU d'autres firmicutes. La complémentation hétérologue de la souche *E. coli* LJ140 (incapable de transporter le glucose) avec chacun des trois gènes *glcU* de *L. monocytogenes* a permis de montrer que ces protéines GlcU1, GlcU2 et GlcU3 sont des protéines capables de transporter le glucose chez *L. monocytogenes* mais avec une très faible affinité.

Par ailleurs, l'étude de l'expression des opérons *man* et *mpo* codant respectivement les PTS^{Man} et PTS^{Mpo} a permis de montrer que l'opéron *man* est inductible par le glucose et l'opéron *mpo* est exprimé de façon constitutive. Cependant, la délétion du gène *mpoA* conduit à une expression constitutive de l'opéron *man* contrairement à la délétion du gène *mpoB* ou *ptsI*, qui entraîne une forte diminution de l'expression de l'opéron *man*. Ces résultats

suggèrent que la protéine EIIB^{Mpo} et l'EI sont impliquées dans l'induction de l'opéron *man* via l'activation de ManR qui est le régulateur de l'opéron *man* (Vu-Khac and Miller, 2009). L'activation de ManR nécessiterait donc la présence de la protéine EIIB^{Mpo} sous la forme non phosphorylée et également la phosphorylation de ManR par la protéine EI phosphorylée (P~EI). Enfin, la P~EIIB^{Mpo} phosphoryle ManR sur une histidine dans le domaine PRD2 mais cette phosphorylation inhibe l'activité de ManR. Il y a alors trois conditions qui sont nécessaires pour l'activation de ManR et par conséquent pour l'induction de l'opéron *man*. Le PTS^{Mpo} fonctionnerait donc comme un senseur de glucose qui en présence de glucose stimule l'expression de l'opéron *man* en régulant l'activité de ManR.

Des études ont préalablement montré l'effet des sucres PTS (cellobiose, glucose, fructose ...) sur la régulation de l'activité de PrfA (Milenbachs *et al.*, 1997; Park and Kroll, 1993; Stoll *et al.*, 2008). La seconde partie de mon travail a concernée l'étude de l'effet des systèmes de transport de glucose dans la régulation de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence.

Nous avons en effet montré que l'inactivation des gènes codant pour les protéines GlcU de transport de glucose et la délétion du gène *mpoA* (codant pour la protéine EIIB^{Mpo}) n'ont pas d'effet sur l'activité de PrfA dans les différentes conditions testées. Cependant, les mutations *ptsI*, *manL* et *mpoB* montrent un effet sur l'activité de PrfA (activation de PrfA) en présence de glucose et de mannose et également sur l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence. Ce qui nous permet d'affirmer que, dans les mutants synthétisant peu de EIIB^{Man} ($\Delta ptsI$ et $\Delta mpoB$) ou n'en synthétisant pas ($\Delta manL$), l'activité de PrfA est augmentée en présence de glucose et de mannose. Cependant l'activité de PrfA reste inhibée en présence de fructose dans les mutants $\Delta manL$ et $\Delta mpoB$ alors que PrfA reste active dans le mutant $\Delta ptsI$. Ces données suggèrent que l'activité de PrfA n'est pas uniquement contrôlée par la protéine EIIB^{Man} mais probablement par d'autres facteurs (par exemple : un intermédiaire de la glycolyse).

Nous avons aussi, montré que l'effet des mutations PTS observé sur l'activité de PrfA et l'expression PrfA-dépendante des gènes de virulence nécessite la présence de PrfA car la délétion du gène *prfA* dans la souche sauvage et dans les mutants $\Delta manL$, $\Delta mpoB$ et $\Delta ptsI$ (qui montrent une activité de PrfA plus élevée) entraîne une disparition complète de l'effet des mutations PTS observé.

En outre, les infections de cellules épithéliales en culture avec les souches, *L. monocytogenes* EGDe, $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$ ont permis de montrer que la mutation *manL* n'a apparemment pas

d'effet dans l'infection contrairement à la mutation *ptsI* qui montre un effet. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de la mutation *ptsI* dans l'infection *in vitro* plus particulièrement dans l'entrée dans les cellules. La forte production de la protéine InlA dans le mutant $\Delta ptsI$ pourrait être responsable de cet effet. Par ailleurs, les résultats d'infection *in vivo* réalisée chez la souris ne permettent pas pour l'instant d'identifier un potentiel rôle des mutations PTS ($\Delta manL$, $\Delta mpoB$, $\Delta ptsI$).

PERSPECTIVES

Suite aux résultats obtenus au cours de ce travail, de nombreux travaux pourraient être envisagés afin de mieux comprendre les différents aspects de la régulation du PTS^{Man} par le PTS^{Mpo} et également de la régulation de l'activité de PrfA par le PTS.

- ❖ Les mutations PTS (*manL*, *mpoB*, *ptsI*) seraient impliquées dans l'activation de PrfA via le glucose. La question posée est de savoir, si cette activation de PrfA est due à une interaction directe ou indirecte des protéines PTS concernées avec la protéine PrfA. Il serait donc intéressant d'étudier les interactions entre PrfA et les protéines du PTS tout d'abord par la technique de cross-linking *in vivo* (Herzberg *et al.*, 2007). Cette technique permet d'identifier des protéines qui vont se lier à PrfA dans la bactérie. L'avantage de cette technique, c'est de pouvoir identifier des complexes si PrfA interagit avec des protéines. Ensuite, d'autres approches biochimiques qui permettraient de mettre en évidence une interaction possible entre la protéine EIIAB^{Man} ou d'autres composants du PTS et la protéine PrfA, pourraient être réalisées. Ce travail a déjà débuté. L'étape de construction de mutants est terminée et des tests biochimiques seront réalisés par la suite pour mettre en évidence des possibles interactions entre les protéines du PTS et PrfA.
- ❖ La protéine EIIAB^{Man} jouerait un rôle dans la régulation de PrfA. La question posée est de savoir lequel des domaines EIIA ou EIIB (ou les deux) est nécessaire dans la modulation de l'activité de PrfA. Des tests de complémentation du mutant $\Delta manL$ avec les gènes codant respectivement la protéine sauvage EIIAB^{Man}, seulement le domaine EIIA ou le domaine EIIB pourraient être réalisés. Ce travail a également débuté.
- ❖ Un intermédiaire de la glycolyse pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité de PrfA. Différentes études pourraient être envisagées à cet effet. Il serait donc intéressant de construire des mutants dans lesquels des enzymes de certaines étapes de la voie glycolytique seraient inactives. Le métabolisme de sources de carbone va se faire dans ces mutants via le cycle pentose phosphate. Ensuite, il faudra tester l'effet de ces mutations sur l'activité de PrfA. Les mutants qui seront dans l'incapacité de

produire l'intermédiaire glycolytique réprimant l'expression des gènes de virulence montreront une plus forte activité de la protéine PrfA.

- ❖ L'interaction entre la protéine EIIB^{Mpo} avec ManR semble nécessaire pour permettre son activation. Nos expériences génétiques ont montré que, c'est la forme non phosphorylée de l'EIIB^{Mpo} qui pourrait se lier à ManR. Des expériences de double hybride pourraient être réalisées afin de mettre en évidence l'interaction entre EIIB^{Mpo} et ManR.
- ❖ Le mutant $\Delta ptsI$ montre des effets pendant l'infection *in vitro* (Jeg-3, Caco-2) probablement au niveau de l'entrée dans les cellules hôtes. Des expériences plus approfondies pourraient être réalisées afin de montrer que l'effet observé est dû à la délétion de la protéine EI et non à la faible capacité du mutant à utiliser des sources de carbone présents dans le milieu.
- ❖ Les résultats préliminaires des infections *in vivo* n'ont pas permis de montrer un effet des mutations PTS (*manL*, *mpoB*, *ptsI*) dans l'infection par *L. monocytogenes*. Des études approfondies pourraient être envisagées à cet effet. Des expériences pourraient être réalisées soit:
 - en changeant de modèle animal car le rôle potentiel de l'EI observé *in vitro* se situerait au niveau de l'entrée dans les cellules. Le récepteur cellulaire de la protéine InlA est la E-cadhérine humaine, de la gerbille et du cobaye. Il serait donc intéressant soit d'utiliser ces animaux, soit une souris transgénique qui synthétise la forme humanisée de la E-cadhérine.
 - réaliser des infections *in vivo* par voie orale car la voie intraveineuse ne permet pas de montrer l'étape d'infection intestinale.
- ❖ Des travaux plus approfondis pourraient aussi être réalisés afin d'identifier le rôle exact des mutations PTS (*manL*, *mpoA*, *mpoB*, *ptsI*) dans la formation de biofilm par *L. monocytogenes*. D'autres conditions de cultures des souches pourraient être envisagées. Ce travail a également débuté et est décrit en annexes.

ANNEXES

ANNEXES 1

Contribution au sujet : Rôle du PTS dans la formation de biofilm chez *L. monocytogenes*

Cette étude est réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Romain Briandet de l'UMR 1319, Micalis-B2HM Bioadhésion Biofilm et Hygiène des Matériaux de Massy.

Un biofilm naturel par définition, est une communauté plus ou moins complexe et symbiotique de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, marquée par la formation d'une matrice extracellulaire adhésive et protectrice. La matrice extracellulaire est souvent composée de polymères biologiques qui permettent l'attachement entre les bactéries et à la surface. Cette matrice est de natures diverses selon le biofilm et peut être composée de protéines, de polysaccharides et/ou de l'ADN. Elle contribue de manière significative à l'organisation de la communauté du biofilm (Branda *et al.*, 2005). Les biofilms sont hautement organisés en communautés et leur formation est composée de trois étapes : l'attachement initial, la formation de micro-colonies et l'expansion des colonies (Costerton *et al.*, 1999). Différents composants seraient impliqués dans la formation et la maturation de biofilm tels que des molécules de signalisation extracellulaires (auto-inducer du quorum sensing), des systèmes putatives des ABC transporteurs (Sakuragi and Kolter, 2007; Zhu *et al.*, 2008) et probablement des composants du système PTS (Houot and Watnick, 2008; Houot *et al.*, 2010).

L. monocytogenes est capable de persister pendant de longues périodes dans les aliments qu'elle colonise et cela s'explique par sa capacité à former des biofilms. Les biofilms de *L. monocytogenes* sont difficiles à être complètement éradiqués car ils sont très résistants aux détergents, bactéricides et antibiotiques. Ce qui pose un problème majeur aux industries agroalimentaires (Zhu *et al.*, 2008). La structure du biofilm de *L. monocytogenes* est influencée par les conditions environnementales de croissance (Rieu *et al.*, 2008). En condition statique, *L. monocytogenes* se présente sous forme de courtes tiges ; une faible épaisseur et un volume élevé du biofilm sont observés. En condition dynamique cependant, la bactérie se présente sous forme de réseaux de chaînettes ; une épaisseur élevée et un volume de biofilm également élevé sont observés (Rieu *et al.*, 2008).

Par ailleurs, *L. monocytogenes* est une bactérie dont la motilité est médiée via les flagelles qu'elle possède. La motilité de la bactérie par les flagelles est un élément critique à l'attachement de la bactérie à une surface et dans la formation de biofilm. Des mutants ne synthétisant pas de protéines flagellaires sont affectés dans la formation de biofilm (Lemon *et al.*, 2007; Renier *et al.*, 2010; Todhanakasem and Young, 2008). *L. monocytogenes* peut exister sous différentes formes selon l'environnement dans lequel elle se trouve (Lemon *et al.*, 2010). Elle peut exister soit :

- sous forme de pathogène intracellulaire
- sous forme de bactérie flagellaire extracellulaire
- sous forme de bactérie extracellulaire dans les biofilms

Le régulateur des gènes de virulence, PrfA, serait essentiel pour le changement de forme de la bactérie (c'est-à-dire passer soit de la forme de bactérie extracellulaire à pathogène intracellulaire). PrfA serait donc un régulateur global des différentes formes d'existence de la bactérie permettant ainsi une interconnexion entre ces différentes formes (Lemon *et al.*, 2010). Des études ont montré que PrfA serait impliquée dans la formation de biofilm car les mutants ne synthétisant pas de protéine PrfA sont affectés dans la formation de biofilm (Lemon *et al.*, 2010). La régulation de PrfA et des gènes de virulence PrfA-dépendants serait contrôlée par le PTS. En présence de sucres PTS rapidement métabolisables tels que le cellobiose, le glucose, le fructose, le mannose, on observe une diminution de l'activité de PrfA.

En outre, des études ont montré l'implication du PTS dans la formation de biofilm chez des bactéries. Des protéines générales et spécifiques du PTS seraient impliquées dans la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* en milieu minimum (MM) additionné de glucose ou en LB. Les mutants ne synthétisant pas de protéine EI présente un volume de biofilm élevé tandis que les mutants ne synthétisant pas de protéine EII^{Glc} sont très affectés dans la formation de biofilm (Houot and Watnick, 2008; Houot *et al.*, 2010). Les protéines PTS^{Ntr} cependant, entraînerait une diminution de la formation de biofilm (Houot *et al.*, 2010).

Burne et ses collaborateurs ont montré l'implication de la protéine EIIAB^{Man} dans la formation de biofilm chez *Streptococcus mutans*. Un mutant ne synthétisant pas de EIIAB^{Man} est fortement affecté dans la formation de biofilm (Abranches *et al.*, 2006).

Chez *Streptococcus gordonii*, un des PTS de transport de fructose serait impliqué dans la formation de biofilm. En effet des mutants ne synthétisant pas de fructose-1-phosphate kinase (codée par le gène *fruK*) et/ou de EIIABC spécifique du fructose (codée par le gène *fruI*) sont

affectés dans la formation de biofilm (Loo *et al.*, 2003). Chez cette bactérie également, des protéines du métabolisme de β -glucosides (codés par les locus *esc* et *bfb*) seraient impliquées dans la régulation de la formation de biofilm (Kiliç *et al.*, 2004).

Le but de cette collaboration est d'essayer d'identifier un rôle potentiel du PTS principalement des mutations PTS (*man*, *mpo*, *ptsI*) dans la formation de biofilm chez *L. monocytogenes*. La partie construction de mutants a été réalisée au cours de mes travaux de thèse. Les mutants ont été construits dans la souche de *L. monocytogenes* EGDe (souche sauvage, WT).

La partie biofilm est entièrement réalisée par l'équipe de Mr Briandet. Les expériences ont été réalisées en condition statique (labteks) et dynamique (flow cells) en BHI à 37°C. Les résultats sont interprétés après 24 h de culture et normalisés par rapport au WT.

Les résultats préliminaires obtenus permettent de montrer que les mutants $\Delta manL$ et $\Delta ptsI$ présentent un biovolume moins élevé que le WT (Figure 36) et une structure non homogène (Figure 37). Les mutants $\Delta mpoB$ et $\Delta mpoA$ présentent par contre, un phénotype similaire au WT (Figures 36 et 37). Ces données suggèrent une probable implication de la protéine EIIAB^{Man} et de l'EI dans la formation de biofilm. Le mutant $\Delta manL$ ne synthétise pas la protéine EIIAB^{Man}. Les mutants $\Delta ptsI$ et $\Delta mpoB$ synthétisent très peu de protéine EIIAB^{Man}. Cependant, le mutant $\Delta mpoB$ présente un biovolume similaire au WT. Ces données suggèrent que la diminution du biovolume et de l'épaisseur du biofilm dans le mutant $\Delta manL$ n'est pas due au transport de glucose (à noter que le milieu BHI utilisé contient du glucose : 5 mM) car le mutant $\Delta mpoB$ qui consomme le glucose moins vite que le mutant $\Delta manL$, montre un biovolume et une épaisseur de biofilm similaires au WT. La diminution du biovolume observée dans le mutant $\Delta manL$ serait probablement due à l'absence de la protéine EIIAB^{Man} qui entraînerait une augmentation de la formation de biofilm dans le WT.

Des études plus approfondies seront réalisées afin de mieux déterminer l'implication du PTS dans la formation de biofilm. La formation de biofilm sera aussi étudiée avec le mutant $\Delta manL$ complété avec différents allèles de *manL* (*manL* sauvage, gène codant seulement le domaine EIIA^{Man} ou le domaine EIIB^{Man}).

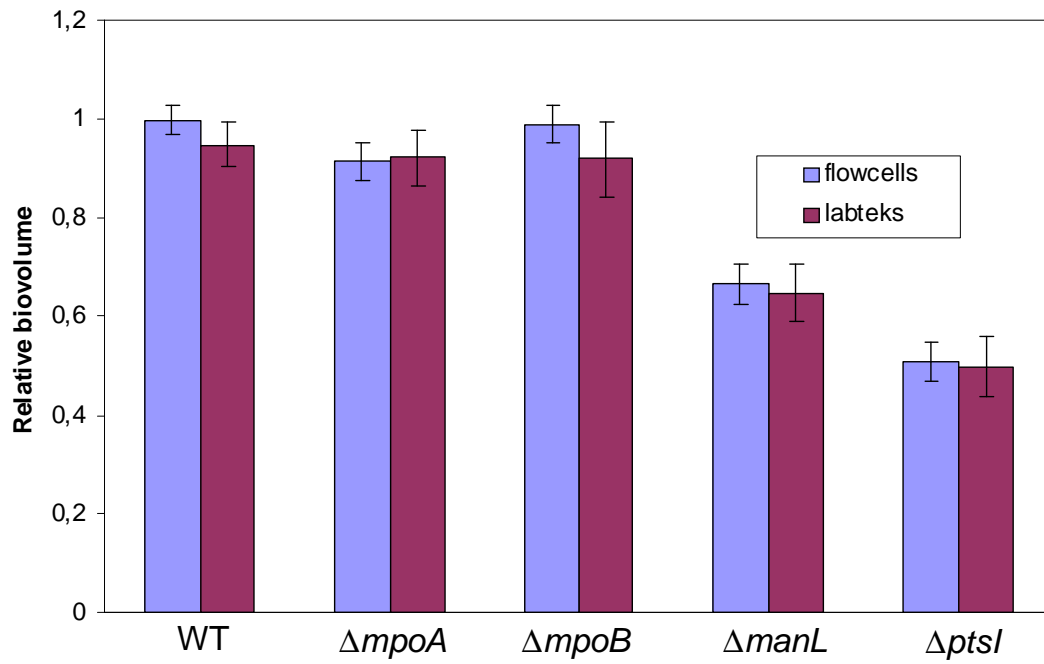


Figure 36: Biovolume en fonction des souches et du mode de croissance des biofilms.

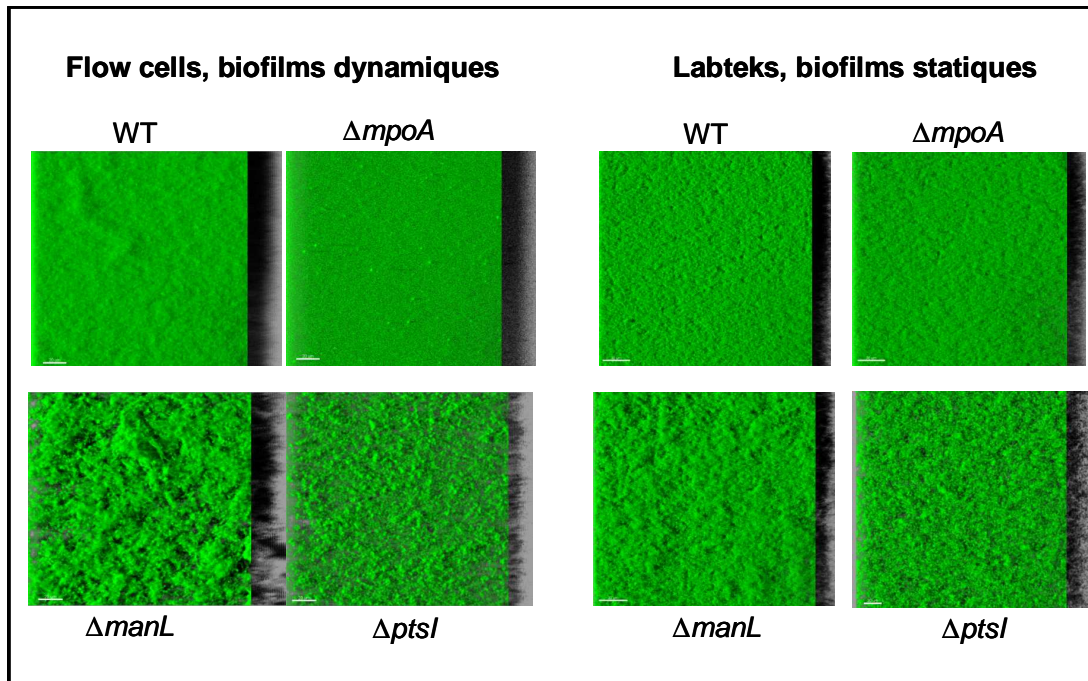


Figure 37 : Développement des souches (WT, $\Delta mpoA$, $\Delta manL$, $\Delta ptsI$) en biofilm.

ANNEXES 2

Initiation au sujet : Implication du système Dha (dihydroxyacétone) dans l'immunité de *L. monocytogenes* EGDe et *L. innocua* BUG 499 à la pédiocine.

La dihydroxyacétone peut être utilisée par *E. coli* comme seule source de carbone exogène. Elle serait transportée dans la cellule via la perméase GlpF par diffusion facilitée. Le système permettant la phosphorylation de ce substrat carboné chez *E. coli* est le système Dha (Figure 38) qui est également retrouvé chez de nombreuses bactéries telles que *L. innocua* et *L. monocytogenes* (Barabote and Saier, 2005; Deutscher *et al.*, 2006). Il fait intervenir les enzymes générales du PTS (EI, HPr) et l'EIIA^{Dha} et peut être considéré comme un PTS qui participe seulement à la phosphorylation de son substrat et non au transport (Figure 38). Ce système est composé de différents gènes qui seraient organisés en opéron (Figure 39) chez *Listeria*. A la fin de cet opéron, se trouve le gène *pedB* qui permettrait l'immunité de *L. monocytogenes* et *L. innocua* à la pédiocine qui est une bactériocine produite principalement par les espèces de *Pediococcus*. Un schéma illustrant l'opéron *dha* chez *L. monocytogenes* est représenté dans la figure 39 et cet opéron est identique à celui présent chez *L. innocua*.

Un autre aspect de la virulence de *L. monocytogenes* est la sensibilité de certaines souches de *Listeria* à la pédiocine. Des études ont préalablement supposé que la protéine EIIAB^{Man} était impliquée dans la sensibilité de la bactérie aux bactériocines de la classe IIa tel que la pédiocine (Gravesen *et al.*, 2000). Des études plus récentes ont cependant montré que la délétion du gène *manM* qui code pour l'EIIC^{Man}, entraîne une résistance à la pédiocine (Kjos *et al.*, 2010). Un lien potentiel pourrait alors exister entre le PTS^{Dha} qui contient une EIIA de la classe mannose et la résistance à la pédiocine.

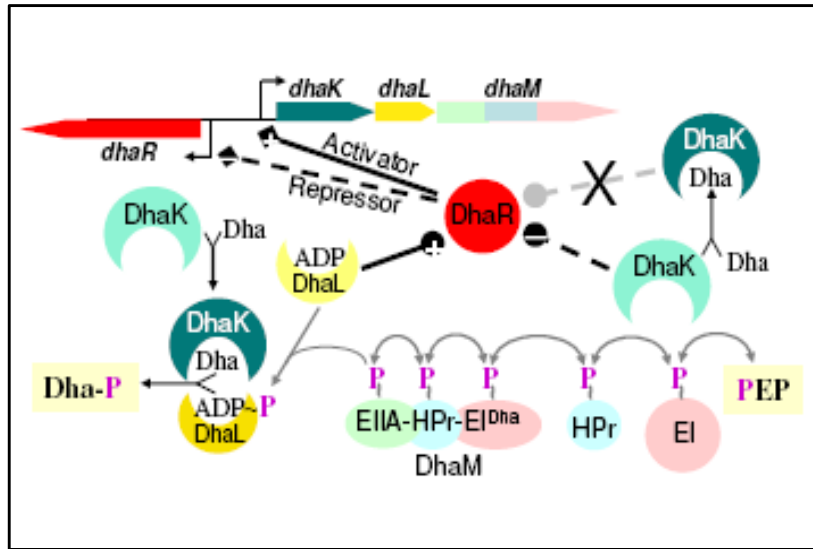


Figure 38 : Cascade de phosphorylation du PTS permettant la phosphorylation de la dihydroxyacétone (Dha) chez *E. coli* (D'après Deutscher *et al.*, 2006).

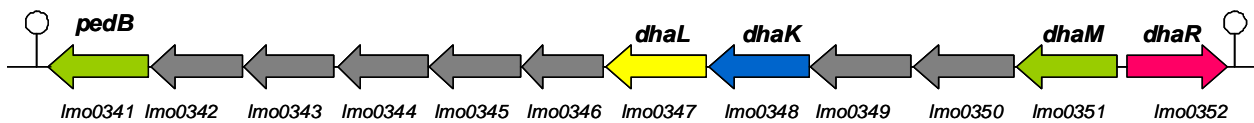


Figure 39 : Représentation schématique de l'opéron *dha* chez *L. monocytogenes* (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>)

Chez *E. coli*, la cascade de phosphorylation du PTS à partir du PEP, qui catalyse la phosphorylation de la dihydroxyacétone est médiée par 5 protéines distinctes (EI, HPr, DhaM, DhaL, et DhaK) (Figure 38). DhaM est composée de 3 domaines PTS : une EI tronquée, une HPr et une EIIA^{Man} (Figure 38) (Deutscher *et al.*, 2006; Gutknecht *et al.*, 2001). La P~EIIA^{Man} de DhaM va transférer son phosphate à une molécule d'ADP fixée à DhaL qui va ensuite phosphoryler une molécule de Dha fixée à DhaK. L'expression de l'opéron *dha* est régulée par un activateur transcriptionnel DeoR-like, nommé DhaR qui réprime sa propre expression. L'activité de DhaR est contrôlée par des interactions avec DhaK et DhaL. En absence de dihydroxyacétone, la DhaK se fixe sur DhaR entraînant une inhibition de DhaR (Figure 38). En présence de Dha, deux cas de figures peuvent se présenter (Figure 38) :

- Dha est rapidement phosphorylée par DhaL qui a fixé une molécule d'ADP. Le complexe DhaL/ADP se fixe sur DhaR et stimule ses fonctions d'activateur transcriptionnel.
- DhaK fixe la dihydroxyacétone et ce complexe n'interagit plus avec DhaR, qui reste donc actif.

L'opéron *dha* de *L. monocytogenes* renferme également le gène *lmo0352* codant pour un régulateur appelé DhaR (Figure 39). Nous avons donc suggéré que DhaR de *L. monocytogenes* régulerait l'immunité de cette bactérie à la pédiocine et l'expression de DhaR serait contrôlée par la disponibilité en dihydroxyacétone (comme mentionné précédemment). Ainsi en absence de dihydroxyacétone, on a une inhibition de DhaR et par conséquent, pas d'expression du gène *pedB*, ce qui se traduit par une sensibilité de *L. monocytogenes* à la pédiocine. En présence de dihydroxyacétone, on a une activation de DhaR et donc une expression de *pedB* qui se traduit par une résistance de la bactérie à la pédiocine.

Dans le but de montrer l'implication de DhaR dans l'immunité de *L. monocytogenes* et *L. innocua* à la pédiocine, un travail a été initié au début de ma thèse dont l'objectif était de mieux comprendre le métabolisme de la dihydroxyacétone et de savoir le lien qui existe entre le métabolisme de la dihydroxyacétone et la résistance à la pédiocine.

Différents travaux ont été entamés, construction de mutant *dhaR* dans la souche *L. innocua* BUG 499, tests de croissance, tests de résistance à la pédiocine. Des travaux ont par la suite été réalisés par Céline Monniot dans le cadre d'un stage en Master 2 Professionnel et par Eliane Milohanic (Chargé de recherche).

Un article résumant les différents travaux réalisés est en cours.

“Phosphoenolpyruvate-requiring dihydroxyacétone phosphorylation in *Listeria innocua* and bactériocin immunity.

Céline Monniot, Francine Aké, Josef Deutscher and Eliane Milohanic

« Soumission prévue à Microbiology »

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abranches, J., Candella, M.M., Wen, Z.T., Baker, H.V., and Burne, R.A. (2006) Different roles of EIIAB^{Man} and EII^{Glc} in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **188**: 3748-3756.
- Alpert, C.A., Frank, R., Stüber, K., Deutscher, J., and Hengstenberg, W. (1985) Phosphoenolpyruvate-dependent protein kinase enzyme I of *Streptococcus faecalis*: purification and properties of the enzyme and characterization of its active center. *Biochemistry* **24**: 959-964.
- Amster-Choder, O., Houman, F., and Wright, A. (1989) Protein phosphorylation regulates transcription of the beta-glucoside utilization operon in *E. coli*. *Cell.* **58**: 847-855.
- Antunes, A., Martin-Verstraete, I., and Dupuy, B. (2011) CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Mol Microbiol.* **79**: 882-899.
- Arnaud, M., Débarbouillé, M., Rapoport, G., Saier Jr, M.H., and Reizer, J. (1996) *In vitro* reconstitution of transcriptional antitermination by the SacT and SacY proteins of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* **271**: 18966-18972.
- Arnaud, M., Chastanet, A., . , and Débarbouillé, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 6887-6891.
- Arous, S., Buchrieser, C., Folio, P., Glaser, P., Namane, A., Hébraud, M., and Héchard, Y. (2004a) Global analysis of gene expression in an *rpoN* mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **150**: 1581-1590.
- Arous, S., Dalet, K., and Héchard, Y. (2004b) Involvement of the *mpo* operon in resistance to class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* **238**: 37-41.
- Audette, G.F., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Deutscher, J., Hayakawa, K., Quail, J.W., and Delbaere, L.T. (2000) The 1.9 Å resolution structure of phospho-serine 46 HPr from *Enterococcus faecalis*. *J Mol Biol.* **303**: 545-553.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., and Salmaso, S. (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med.* **342**: 1236-1241.
- Aymerich, S., and Steinmetz, M. (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.
- Bachem, S., Faires, N., and Stülke, J. (1997) Characterization of the presumptive phosphorylation sites of the *Bacillus subtilis* glucose permease by site-directed mutagenesis: implication in glucose transport and catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett.* **156**: 233-238.
- Barabote, R.D., and Saier, M.H.J. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev.* **69**: 608-634.

- Barbuddhe, S.B., and Chakraborty, T. (2009) *Listeria* as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen. *Curr Top Microbiol Immunol.* **337**: 173-195.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998) A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol.* **180**: 6316-6324.
- Beijer, L., and Rutberg, L. (1992) Utilisation of glycerol and glycerol 3-phosphate is differently affected by the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* **79**: 217-220.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., and Cossart, P. (2007) Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* **9**: 1156-1166.
- Boël, G., Mijakovic, I., Mazé, A., Poncet, S., Taha, M.K., Larribe, M., Darbon, E., Khemiri, A., Galinier, A., and Deutscher, J. (2003) Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **5**: 206-215.
- Bordo, D., van Monfort, R.L., Pijning, T., Kalk, K.H., Reizer, J., Saier Jr, M.H., and Dijkstra, B.W. (1998) The three-dimensional structure of the nitrogen regulatory protein IIA^{Ntr} from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **279**: 245-255.
- Botsford, J.L., and Harman, J.G. (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev.* **56**: 100-122.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**: 20-26.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., and Cossart, P. (1997) InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol.* **25**: 285-294.
- Brehm, K., Ripio, M.T., Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. (1999) The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J Bacteriol.* **181**: 5024-5032.
- Brückner, R., and Titgemeyer, F. (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett.* **209**: 141-148.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P., and Consortium., L. (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **35**: 207-213.
- Buchrieser, C. (2007) Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes Infect.* **9**: 1147-1155.

- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., and P., C. (2004) Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol.* **51**: 1601-1614.
- Cabanes, D., Sousa, S., Cebriá, A., Lecuit, M., García-del Portillo, F., and Cossart, P. (2005) Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *EMBO J.* **24**: 2827-2838.
- Camilli, A., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1993) Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol.* **8**: 143-157.
- Castro, R., Neves, A.R., Fonseca, L.L., Pool, W.A., Kok, J., Kuipers, O.P., and Santos, H. (2009) Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Mol Microbiol.* **71**: 795-806.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann E, H.M., Goebel, W., Nichterlein, T., and Notermans, S. (1992) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol.* **174**: 568-574.
- Chakraborty, T., Hain, T., and Domann, E. (2000) Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria species*. *Int J Med Microbiol.* **290**: 167-174.
- Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J., and Claiborne, A. (1997a) Cloning and sequencing of two enterococcal *glpK* genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue. *J Biol Chem.* **272**: 14166-14174.
- Charrier, V., Deutscher, J., Galinier, A., and Martin-Verstraete, I. (1997b) Protein phosphorylation chain of a *Bacillus subtilis* fructose-specific phosphotransferase system and its participation in regulation of the expression of the *lev* operon. *Biochemistry.* **36**: 1163-1172.
- Chauvin, F., Brand, L., and Roseman, S. (1994) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the *Escherichia coli* enzyme I monomer/dimer transition kinetics by fluorescence anisotropy. *J Biol Chem.* **269**: 20270-20274.
- Chauvin, F., Brand, L., and Roseman, S. (1996a) Enzyme I: the first protein and potential regulator of the bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Res Microbiol.* **147**: 471-479.
- Chauvin, F., Fomenkov, A., Johnson, C.R., and Roseman, S. (1996b) The N-terminal domain of *Escherichia coli* enzyme I of the phosphoenolpyruvate/glycolate phosphotransferase system: molecular cloning and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 7028-7031.

- Chen, Y., Fairbrother, W.J., and Wright, P.E. (1993) Three-dimensional structures of the central regulatory proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and enzyme IIA^{glc}. *J Cell Biochem.* **51**: 75-82.
- Chiba, S., Nagai, T., Hayashi, T., Baba, Y., Nagai, S., and Koyasu, S. (2011) Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches *in vivo*. *Microbiol Immunol.* **55**: 123-129.
- Chico-Calero, I., Suárez, M., González-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., Vázquez-Boland, J.A., and al. (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 431-436.
- Christensen, D.P., and Hutkins, R.W. (1994) Glucose uptake by *Listeria monocytogenes* Scott A and inhibition by pediocin JD. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 3870-3873.
- Christensen, D.P., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (1998) Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* scott A *ptsH* and *ptsI* genes, coding for HPr and enzyme I, respectively, of the phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 3147-3152.
- Christensen, D.P., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (1999) Mutational analysis of the role of HPr in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 2112-2115.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Søggaard-Andersen, L., and Kallipolitis, B.H. (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol.* **186**: 3355-3362.
- Cochu, A., Vadeboncoeur, C., Moineau, S., and Frenette, M. (2003) Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 5423-5432.
- Coffey, A., van den Burg, B., Veltman, R., and Abee, T. (2000) Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol.* **88**: 132-141.
- Cossart, P., Vicente, M., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., and Berche, P. (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun.* **57**: 3629-3636.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**: 1318-1332.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G., and Hill, C. (2001) A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol Microbiol.* **40**: 465-475.
- Cotter, P.D., Draper, L.A., Lawton, E.M., Daly, K.M., Groeger, D.S., Casey, P.G., Ross, R.P., and Hill, C. (2008) Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* **4**: e1000144.

- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., and Héchard, Y. (2001) A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology*. **147**: 3263-3269.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., and Griffin, P.M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med*. **336**: 100-105.
- Darbon, E., Servant, P., Poncet, S., and Deutscher, J. (2002) Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* *glpFK* expression. *Mol Microbiol*. **43**: 1039-1052.
- Datta, A.R., and Kothary, M.H. (1993) Effects of glucose, growth temperature, and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. **59**: 3495-3497.
- de Boer, M., Broekhuizen, C.P., and Postma, P.W. (1986) Regulation of glycerol kinase by enzyme III^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol*. **167**: 393-395.
- De Reuse, H., Roy, A., and Danchin, A. (1985) Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence of the *ptsH* gene. *Gene* **35**: 199-207.
- De Reuse, H., and Danchin, A. (1988) The *ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. *J Bacteriol*. **170**: 3827-3837.
- Dean, M., and Allikmets, R. (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev*. **5**: 779-785.
- Death, A., and Ferenci, T. (1993) The importance of the binding-protein-dependent Mgl system to the transport of glucose in *Escherichia coli* growing on low sugar concentrations. *Res Microbiol*. **144**: 529-537.
- Death, A., and Ferenci, T. (1994) Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J Bacteriol*. **176**: 5101-5107.
- Delrue, R.M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2004) *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett*. **231**: 1-12.
- Deutscher, J., and Saier Jr, M.H. (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**: 6790-6794.
- Deutscher, J., Pevec, B., Beyreuther, K., Kiltz, H.H., and Hengstenberg, W. (1986) Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid

- sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry*. **25**: 6543-6551.
- Deutscher, J., and Sauerwald, H. (1986) Stimulation of dihydroxyacetone and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. *J Bacteriol*. **166**: 829-836.
- Deutscher, J., Sossna, G., and Gonzy-Treboul, G. (1989) Regulatory functions of the phosphocarrier protein HPr of the phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. **5**: 167-174.
- Deutscher, J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier Jr, M.H., and Steinmetz, M. (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **176**: 3336-3344.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. **70**: 939-1031.
- Deutscher, J. (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. **11**: 87-93.
- Dimarco, A.A., and Romano, A.H. (1985) D -Glucose Transport System of *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol*. **49**: 151-157.
- Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Babinet, C., Cossart, P., and Lecuit, M. (2008) Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. **455**: 1114-1118.
- Djordjevic, G.M., Tchieu, J.H., and Saier Jr, M.H. (2001) Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **183**: 3224-3236.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., and Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J*. **11**: 1981-1990.
- Domínguez-Bernal, G., Müller-Altrock, S., González-Zorn, B., Scotti, M., Herrmann, P., Monzó, H.J., Lacharme, L., Kreft, J., and Vázquez-Boland, J.A. (2006) A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol Microbiol*. **59**: 415-432.

- Dörschug, M., Frank, R., Kalbitzer, H.R., Hengstenberg, W., and Deutscher, J. (1984) Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation site in enzyme III^{glc} of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Eur J Biochem.* **144**: 113-119.
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. (2004) FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol.* **53**: 639-649.
- Drevets, D.A. (1999) Dissemination of *Listeria monocytogenes* by Infected Phagocytes. *Infect Immun.* **67**: 3512-3517.
- Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., and Labadie, J. (2002) Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1491-1498.
- Dupuy, B., and Sonenshein, A.L. (1998) Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol Microbiol.* **27**: 107-120.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P., and European Listeria Genome Consortium (2002) *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol.* **45**: 1095-1106.
- Eberstadt, M., Grdadolnik, S.G., Gemmecker, G., Kessler, H., Buhr, A., and Erni, B. (1996) Solution structure of the IIB domain of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **35**: 11286-11292.
- Eiting, M., Hagelüken, G., Schubert, W.D., and Heinz, D.W. (2005) The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. *Mol Microbiol.* **56**: 433-436.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol.* **21**: 823-837.
- Ermolaeva, S., Novella, S., Vega, Y., Ripio, M.T., Scortti, M., and Vázquez-Boland, J.A. (2004) Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol Microbiol.* **52**: 601-611.
- Erni, B., Zanolari, B., Graff, P., and Kocher, H.P. (1989) Mannose permease of *Escherichia coli*. Domain structure and function of the phosphorylating subunit. *J Biol Chem.* **264**: 18733-18741.
- Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W. (2008) Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol.* **69**: 1008-1017.
- Fairbrother, W.J., Gippert, G.P., Reizer, J., Saier Jr, M.H., and Wright, P.E. (1992) Low resolution solution structure of the *Bacillus subtilis* glucose permease IIA domain

- derived from heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* **296**: 148-152.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Review Erratum in: Microbiol Rev.* **55**: 476-511.
- Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I., and Brückner, R. (1999) Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *J Bacteriol.* **181**: 4929-4936.
- Figurski, D.H., Meyer, R.J., and Helinski, D.R. (1979) Suppression of ColE1 replication properties by the Inc P-1 plasmid RK2 in hybrid plasmids constructed *in vitro*. *J Mol Biol.* **133**: 295-318.
- Flanary, P.L., Allen, R.D., Dons, L., and Kathariou, S. (1999) Insertional inactivation of the *Listeria monocytogenes cheYA* operon abolishes response to oxygen gradients and reduces the number of flagella. *Can J Microbiol.* **45**: 646-652.
- Fomenkov, A., Valiakhmetov, A., Brand, L., and Roseman, S. (1998) *In vivo* and *in vitro* complementation of the N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system by the cloned C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 8491-8495.
- Freitag, N.E., Rong, L., and Portnoy, D.A. (1993) Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun.* **61**: 2537-2544.
- Freitag, N.E., and Portnoy, D.A. (1994) Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential *in vitro* but are redundant *in vivo*. *Mol Microbiol.* **12**: 845-853.
- Freitag, N.E., Port, G.C., and Miner, M.D. (2009) *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol.* **7**: 623-628.
- Fujita, Y., Miwa, Y., Galinier, A., and Deutscher, J. (1995) Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt* cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol Microbiol.* **17**: 953-960.
- Gahan, C.G., and Hill, C. (2000) The use of listeriolysin to identify *in vivo* induced genes in the Gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology.* **36**: 498-507.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P. (1987) *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun.* **55**: 2822-2829.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell.* **65**: 1127-1141.

- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., and Berche, P. (2000) The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **35**: 1286-1294.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J., and Martin-Verstraete, I. (1997) The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 8439-8444.
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M.C., Deutscher, J., and Haiech, J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 1823-1828.
- Gassner, M., Stehlik, D., Schrecker, O., Hengstenberg, W., Maurer, W., and Rüterjans, H. (1977) The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. ¹H and ³¹P-nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr. *Eur J Biochem.* **75**: 287-296.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **68**: 999-1003.
- Geerse, R.H., Ruig, C.R., Schuitema, A.R., and Postma, P.W. (1986) Relationship between pseudo-HPr and the PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **203**: 435-444.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **55**: 1641-1646.
- Gilbreth, S.E., Benson, A.K., and Hutkins, R.W. (2004) Catabolite repression and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Curr Microbiol.* **49**: 95-98.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., García-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Nedjari, H.N.E., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Gonzy-Tréboul, G., and Steinmetz, M. (1987) Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: cloning of the region containing the *ptsH* and *ptsI* genes and evidence for a *crr*-like gene. *J Bacteriol.* **169**: 2287-2290.
- Gonzy-Tréboul, G., Zagorec, M., Rain-Guion, M.C., and Steinmetz, M. (1989) Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide

- sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. *Mol Microbiol.* **3**: 103-112.
- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W.A., and Saier, M.H.J. (2004) Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **186**: 3516-3524.
- Gosset, G. (2005) Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact.* **4**: 14.
- Gottesman, S., Wickner, S., and Maurizi, M.R. (1997) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**: 815-823.
- Gough, J.A., and Murray, N.E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol.* **166**: 1-19.
- Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahor, i.M.A., Villiers, V., Colland, F., Dramsi, S., Dussurget, O., and Cossart, P. (2010) The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I{kappa}B kinase subunit IKK{alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 17333-17338.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H., Wiedmann, M., Swaminathan, B., and Sauders, B.D. (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**: 1280-1288.
- Gravesen, A., Warthoe, P., Knochel, S., and Thirstrup, K. (2000) Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative beta-glucoside-specific PTS system. *Microbiology.* **146**: 1381-1389.
- Green, J., Scott, C., and Guest, J.R. (2001) Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv Microb Physiol.* **44**: 1-34.
- Greenberg, D.B., Stülke, J., and Saier Jr, M.H. (2002) Domain analysis of transcriptional regulators bearing PTS regulatory domains. *Res Microbiol.* **153**: 519-526.
- Gutknecht, R., Beutler, R., Garcia-Alles, L.F., Baumann, U., and Erni, B. (2001) The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryl donor. *EMBO J.* **20**: 2480-2486.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol.* **4**: 423-434.
- Hanawa, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Hirano, H., Kamiya, S., and Yamamoto, T. (1999) The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages. *Cell Stress Chaperones.* **4**: 118-128.
- Harman, J.G. (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta.* **1547**: 1-17.

- Heller, K.B., Lin, E.C., and Wilson, T.H. (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **144**: 274-278.
- Henderson, P.J.F. (1991) Sugar transport proteins. *Current Opinion in Structural Biology.* **1**: 590-601.
- Henkin, T.M., Grundy, F.J., Nicholson, W.L., and Chambliss, G.H. (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Mol Microbiol.* **5**: 575-584.
- Henstra, S.A., Tolner, B., ten Hoeve Duurkens, R.H., Konings, W.N., and Robillard, G.T. (1996) Cloning, expression, and isolation of the mannitol transport protein from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol.* **178**: 5586-5591.
- Henstra, S.A., Tuinhof, M., Duurkens, R.H., and Robillard, G.T. (1999) The *Bacillus stearothermophilus* mannitol regulator, MtlR, of the phosphotransferase system. A DNA-binding protein, regulated by HPr and IICB^{mtl}-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* **274**: 4754-4763.
- Henstra, S.A., Duurkens, R.H., and Robillard, G.T. (2000) Multiple phosphorylation events regulate the activity of the mannitol transcriptional regulator MtlR of the *Bacillus stearothermophilus* phosphoenolpyruvate-dependent mannitol phosphotransferase system. *J Biol Chem.* **275**: 7037-7044.
- Herro, R., Poncet, S., Cossart, P., Buchrieser, C., Gouin, E., Glaser, P., and Deutscher, J. (2005) How seryl-phosphorylated HPr inhibits PrfA, a transcription activator of *Listeria monocytogenes* virulence genes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **9**: 224-234.
- Herzberg, C., Weidinger, L.A., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J., and Commichau, F.M. (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics.* **7**: 4032-4035.
- Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., and Postma, P.W. (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Mol Microbiol.* **30**: 487-498.
- Houot, L., and Watnick, P.I. (2008) A novel role for enzyme I of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. *J Bacteriol.* **190**: 311-320.
- Houot, L., Chang, S., Pickering, B.S., Absalon, C., and Watnick, P.I. (2010) The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J Bacteriol.* **192**: 3055-3067.
- Hu, K.Y., and Saier Jr, M.H. (2002) Phylogeny of phosphoryl transfer proteins of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar-transporting phosphotransferase system. *Res Microbiol.* **153**: 405-415.

- Ireton, K. (2007) Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cell Microbiol.* **9**: 1365-1375.
- Isberg, R.R. (1991) Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science.* **252**: 934-938.
- Jacquet, C., Brouille, F., Saint-Clément, C., Catimel, B., and Rocourt, J. (1999) La listériose humaine en France en 1998. *Bull. Epidemiol. hebdom.* **37**: 153-154.
- Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E.F., Brückner, R., and Titgemeyer, F. (2008) Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 891-907.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell.* **110**: 551-561.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stühler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W. (2006) Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *Bacteriol.* **188**: 556-568.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schär, J., Umesha, K.R., Luo, Q., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2008) Glycerol Metabolism and PrfA Activity in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology.* **190**: 5412-5430.
- Joyet, P., Derkaoui, M., Poncet, S., and Deutscher, J. (2010) Control of *Bacillus subtilis* *mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR. *Mol Microbiol.* **76**: 1279-1294.
- Khelef, N., Lecuit, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006) Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol.* **8**: 457-470.
- Kiliç, A.O., Tao, L., Zhang, Y., Lei, Y., Khammanivong, A., and Herzberg, M.C. (2004) Involvement of *Streptococcus gordonii* beta-glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and *in vivo* gene expression. *J Bacteriol.* **186**: 4246-4253.
- Kjos, M., Salehian, Z., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2010) An extracellular loop of the mannose phosphotransferase system component IIC is responsible for specific targeting by class IIa bacteriocins. *J Bacteriol.* **192**: 5906-5913.
- Klarsfeld, A.D., Goossens, P.L., and Cossart, P. (1994) Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol.* **13**: 585-597.
- Knezevic, I., Bachem, S., Sickmann, A., Meyer, H.E., Stülke, J., and Hengstenberg, W. (2000) Regulation of the glucose-specific phosphotransferase system (PTS) of *Staphylococcus carnosus* by the antiterminator protein GlcT. *Microbiology.* **146**: 2333-2342.

- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell*. **68**: 521-531.
- Kok, M., Bron, G., Erni, B., and Mukhija, S. (2003) Effect of enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system (PTS) on virulence in a murine model. *Microbiology*. **149**: 2645-2652.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem*. **62**: 749-795.
- Konings, W.N. (2006) Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **90**: 35-342.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., and Hengstenberg, W. (1999) The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol*. **31**: 59-66.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun*. **57**: 55-61.
- Kundig, W., Ghosh, S., and Roseman, S. (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.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., and al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. **390**: 249-256.
- Larsen, M.H., Kallipolitis, B.H., Christiansen, J.K., Olsen, J.E., and Ingmer, H. (2006) The response regulator ResD modulates virulence gene expression in response to carbohydrates in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. **61**: 1622-1635.
- Lebrun, M., Mengaud, J., Ohayon, H., Nato, F., and Cossart, P. (1996) Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol Microbiol*. **21**: 579-592.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., and Allerberger, F. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **60**: 2210-2214.
- Lecuit, M., and Cossart, P. (2001) *Listeria monocytogenes*. *Mol. Med. Microbiol. Academic Press, London.*: 1437-1461.

- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., and Cossart, P. (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*. **292**: 1722-1750.
- Lecuit, M., Nelson, D.M., Smith, S.D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M.C., Gordon, J.I., and Cossart, P. (2004) Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 6152-6157.
- Lee, C.R., Cho, S.H., Kim, H.J., Kim, M., Peterkofsky, A., and Seok, Y.J. (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA(Ntr) -dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol*. **78**: 1468-1483
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., and Chakraborty, T. (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**: 8336-8340.
- Leimeister-Wächter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol*. **174**: 947-952.
- Lemon, K.P., Higgins, D.E., and Kolter, R. (2007) Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol*. **189**: 4418-4424.
- Lemon, K.P., Freitag, N.E., and Kolter, R. (2010) The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*. **192**: 3969-3976.
- Liang, W., Pascual-Montano, A., Silva, A.J., and Benitez, J.A. (2007) The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*. **153**: 2964-2975.
- Lim, S., Yun, J., Yoon, H., Park, C., Kim, B., Jeon, B., Kim, D., and Ryu, S. (2007) Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hile* repression. *Nucleic Acids Res*. **35**: 1822-1832.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *infect Immun*. **63**: 3896-3903.
- Loo, C.Y., Mitrakul, K., Voss, I.B., Hughes, C.V., and Ganeshkumar, N. (2003) Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J Bacteriol*. **185**: 6241-6254.
- Lortie, L.A., Pelletier, M., Vadeboncoeur, C., and Frenette, M. (2000) The gene encoding IIAB_L^{Man} in *Streptococcus salivarius* is part of a tetracistronic operon encoding a phosphoenolpyruvate: mannose/glucose phosphotransferase system. *Microbiology*. **146**: 677-685.

- Lun, S., and Willson, P.J. (2005) Putative mannose-specific phosphotransferase system component IID represses expression of suilysin in serotype 2 *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol.* **105**: 169-180.
- Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J.S., and Lengeler, J.W. (1995) Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 11583-11587.
- Martin-Verstraete, I., Débarbouillé, M., Klier, A., and Rapoport, G. (1990) Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon. *J Mol Biol.* **214**: 657-671.
- Martin-Verstraete, I., Débarbouillé, M., Klier, A., and Rapoport, G. (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., Charrier, V., Stülke, J., Galinier, A., Erni, B., Rapoport, G., and Deutscher, J. (1998) Antagonistic effects of dual PTS-catalysed phosphorylation on the *Bacillus subtilis* transcriptional activator LevR. *Mol Microbiol.* **28**: 293-303.
- Martinez, E., Bartolomé, B., and de la Cruz, F. (1988) pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and *lacZ* alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene* **68**: 159-162.
- Massillon, D., Bollen, M., De Wulf, H., Overloop, K., Vanstapel, F., Van Hecke, P., and Stalmans, W. (1995) Demonstration of a glycogen/glucose 1-phosphate cycle in hepatocytes from fasted rats. Selective inactivation of phosphorylase by 2-deoxy-2-fluoro-alpha-D-glucopyranosyl fluoride. *J Biol Chem.* **270**: 19351-19356.
- Mazé, A., Boël, G., Poncet, S., Mijakovic, I., Le Breton, Y., Benachour, A., Monedero, V., Deutscher, J., and Hartke, A. (2004) The *Lactobacillus casei* ptsHI47T mutation causes overexpression of a LevR-regulated but RpoN-independent operon encoding a mannose class phosphotransferase system. *J Bacteriol.* **186**: 4543-4555.
- McClure, P.J., Kelly, T.M., and Roberts, T.A. (1991) The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* **14**: 77-91.
- Meadow, N.D., Fox, D.K., and Roseman, S. (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glycose phosphotransferase system. *Annu Rev Biochem.* **59**: 497-542.
- Meins, M., Jenö, P., Müller, D., Richter, W.J., Rosenbusch, J.P., and Erni, B. (1993) Cysteine phosphorylation of the glucose transporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **268**: 11604-11609.
- Mengaud, J., Chenevert, J., Geoffroy, C., Gaillard, J.L., and Cossart, P. (1987) Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun.* **55**: 3225-3227.

- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M., and Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*. **84**: 923-932.
- Mertins, S., Joseph, B., Goetz, M., Ecke, R., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W., and Müller-Altrock, S. (2007) Interference of components of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system with the central virulence gene regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*. **189**: 473-490.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M., and Youngman, P. (1997) Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. **23**: 1075-1085.
- Milenbachs Lukowiak, A., Mueller, K.J., Freitag, N.E., and Youngman, P. (2004) Dereglulation of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression by two distinct and semi-independent pathways. *Microbiology*. **150**: 321-333.
- Miller, R.A., and Britigan, B.E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev*. **10**: 1-18.
- Milohanic, E., Jonquières, R., Cossart, P., Berche, P., and Gaillard, J.L. (2001) The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol*. **39**: 1212-1224.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J.Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. (2003) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol*. **47**: 1613-1625.
- Misset, O., Brouwer, M., and Robillard, G.T. (1980) *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Evidence that the dimer is the active form of enzyme I. *Biochemistry*. **19**: 883-890.
- Mitchell, W.J., Reizer, J., Herring, C., Hoischen, C., and Saier Jr, M.H. (1993) Identification of a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system (fructose-1-phosphate forming) in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*. **175**: 2758-2761.
- Monedero, V., Kuipers, O.P., Jamet, E., and Deutscher, J. (2001) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*. **183**: 3391-3398.
- Monedero, V., Yebra, M.J., Poncet, S., and Deutscher, J. (2008) Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. *Res Microbiol*. **159**: 94-102.
- Murray, E.G.D., Webb, R.E., and Swann, M.B.R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. bacteriol*. **29**: 407-439.

- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., and Berche, P. (1999) ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **31**: 185-196.
- Nakada, D., and Magasanik, B. (1962) Catabolite repression and the induction of beta-galactosidase. *Biochim Biophys Acta.* **61**: 835-837.
- Nelson, S.O., Wright, J.K., and Postma, P.W. (1983) The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **2**: 715-720.
- Nicholson, W.L., and Chambliss, G.H. (1985) Isolation and characterization of a cis-acting mutation conferring catabolite repression resistance to alpha-amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **161**: 875-881.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier Jr, M.H. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 1-34.
- Park, S.F., and Kroll, R.G. (1993) Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **8**: 653-661.
- Parker, C., and Hutkins, R.W. (1997) *Listeria monocytogenes* Scott A transports glucose by high-affinity and low-affinity glucose transport systems. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 543-546.
- Parr, T.R.J., and Saier Jr, M.H. (1992) The bacterial phosphotransferase system as a potential vehicle for the entry of novel antibiotics. *Res Microbiol.* **143**: 443-447.
- Paulsen, I.T., Beness, A.M., and Saier Jr, M.H. (1997) Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology.* **143**: 685-699.
- Paulsen, I.T., Chauvaux, S., Choi, P., and Saier Jr, M.H. (1998) Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J Bacteriol.* **180**: 498-504.
- Pelton, J.G., Torchia, D.A., Meadow, N.D., Wong, C.Y., and Roseman, S. (1991) Secondary structure of the phosphocarrier protein III^{Glc}, a signal-transducing protein from *Escherichia coli*, determined by heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 3479-3483.
- Pentecost, M., Kumaran, J., Ghosh, P., and Amieva, M.R. (2010) *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. *PLoS Pathog.* **6**: e1000900.
- Personnic, N., Bruck, S., Nahori, M.A., Toledo-Arana, A., Nikitas, G., Lecuit, M., Dussurget, O., Cossart, P., and Bierne, H. (2010) The stress-induced virulence protein InlH

- controls interleukin-6 production during murine listeriosis. *Infect Immun.* **78**: 1979-1989.
- Pflüger-Grau, K., and Görke, B. (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol.* **18**: 205-214.
- Pimentel-Schmitt, E.F., Jahreis, K., Eddy, M.P., Amon, J., Burkovski, A., and Titgemeyer, F. (2009) Identification of a glucose permease from *Mycobacterium smegmatis* mc2 155. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **16**: 169-175.
- Pine, L., Malcolm, G.B., Brooks, J.B., and Daneshvar, M. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol.* **35**: 245-254.
- Pirie, J.H.H. (1927) A new disease of veld rodents: Tiger River disease. *S African Inst Med Res.* **3**: 163-186.
- Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P. (2006) Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol.* **208**: 215-223.
- Pocalyko, D.J., Carroll, L.J., Martin, B.M., Babbitt, P.C., and Dunaway-Mariano, D. (1990) Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry.* **29**: 10757-10765.
- Poncet, S., Milohanic, E., Mazé, A., Nait Abdallah, J., Aké, F., Larribe, M., Deghmane, A.E., Taha, M.K., Dozot, M., De Bolle, X., Letesson, J.J., and Deutscher, J. (2009) Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol.* **16**: 88-102.
- Portnoy, D.A., Auerbuch, V., and Glomski, I.J. (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol.* **158**: 409-414.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* **57**: 543-594.
- Poussin, M.A., and Goldfine, H. (2010) Evidence for the involvement of ActA in maturation of the *Listeria monocytogenes* phagosome. *Cell Res.* **20**: 109-112.
- Prasad, L., Waygood, E.B., Lee, J.S., and Delbaere, L.T. (1998) The 2.5 Å resolution structure of the jel42 Fab fragment/HPr complex. *J Mol Biol.* **280**: 829-845.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 3046-3048.
- Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P., and Martin-Verstraete, I. (1999) Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **181**: 6889-6897.

- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F., and Gaillard, J. (2001) Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol.* **3**: 331-340.
- Rabus, R., Reizer, J., Paulsen, I., and Saier Jr, M.H. (1999) Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *J Biol Chem.* **274**: 26185-26191.
- Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-Altrock, S., Goebel, W., Gray-Owen, S.D., and Ireton, K. (2009) The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nat Cell Biol.* **11**: 1212-1218.
- Rajagopal, P., Waygood, E.B., and Klevit, R.E. (1994) Structural consequences of histidine phosphorylation: NMR characterization of the phosphohistidine form of histidine-containing protein from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **33**: 15271-15282.
- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W., and Héchar, Y. (2004) Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology.* **150**: 2663-2668.
- Rather, P.N., and Moran, C.P.J. (1988) Compartment-specific transcription in *Bacillus subtilis*: identification of the promoter for *gdh*. *J Bacteriol.* **170**: 5086-5092.
- Rauch, M., Q., L., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2005) SigB-dependent in vitro transcription of *prfA* and some newly identified genes of *Listeria monocytogenes* whose expression is affected by PrfA *in vivo*. *J Bacteriol.* **187**: 800-804.
- Reis, O., Sousa, S., Camejo, A., Villiers, V., Guin, E., Cossart, P., and Cabanes, D. (2010) LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence. *J Infect Dis.* **202**: 551-562.
- Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M.H.J., and Stülke, J. (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **145**: 3419-3429.
- Renier, S., Hébraud, M., and Desvaux, M. (2010) Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ Microbiol.* **10**: 1462-2920.
- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. (1997) Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun.* **65**: 1515-1518.
- Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., and Piveteau, P. (2008) *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 4491-4497.

- Ripio, M.T., Domínguez-Bernal, G., Suárez, M., Brehm, K., Berche, P., and Vázquez-Boland, J.A. (1996) Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol.* **147**: 371-384.
- Ripio, M.T., Brehm, K., Lara, M., Suárez, M., and Vázquez-Boland, J.A. (1997a) Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol.* **179**: 7174-7180.
- Ripio, M.T., Domínguez-Bernal, G., Lara, M., Suárez, M., and Vázquez-Boland, J.A. (1997b) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* **179**: 1533-1540.
- Ripio, M.T., Vázquez-Boland, J.A., Vega, Y., Nair, S., and Berche, P. (1998) Evidence for expressional crosstalk between the central virulence regulator PrfA and the stress response mediator ClpC in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* **158**: 45-50.
- Robillard, G.T., and Broos, J. (1999) Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta.* **1422**: 73-104.
- Rocourt, J., and Bille, J. (1997) Foodborne listeriosis. *World Health Stat Q. Rev.* **50**: 67-73.
- Rouquette, C., de Chastellier, C., and Nair S, B., P. (1998) The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol Microbiol.* **27**: 1235-1245.
- Russell, J.B. (1990) Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 3304-3307.
- Sabet, C., Toledo-Arana, A., Personnic, N., Lecuit, M., Dubrac, S., Poupel, O., Gouin, E., Nahori, M.A., Cossart, P., and Bierne, H. (2008) The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed *in vivo* and behaves as an adhesin. *Infect Immun.* **76**: 1368-1378.
- Saier Jr, M.H., and Roseman, S. (1976) Sugar transport. Inducer exclusion and regulation of the melibiose, maltose, glycerol, and lactose transport systems by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J Biol Chem.* **251**: 6606-6615.
- Sakuragi, Y., and Kolter, R. (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **189**: 5383-5386.
- Schumacher, M.A., Allen, G.S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., and Brennan, R.G. (2004) Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell.* **118**: 731-741.
- Scotti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D., and Vázquez-Boland, J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* **9**: 1196-1207.

- Seeliger, H.P. (1955) Listeriose.8. Barth. Beitrage Zur Hygiene und Epidemiologie.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*. **103**: 501-510.
- Shetron-Rama, L.M., Mueller, K., Bravo, J.M., Bouwer, H.G., Way, S.S., and Freitag, N.E. (2003) Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level in vitro expression of host cytosol-induced gene products. *Mol Microbiol*. **48**: 1537-1551.
- Shin, B.S., Choi, S.K., and Park, S.H. (1999) Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene. *J Biochem*. **126**: 333-339.
- Sokolovic, Z., Fuchs, A., and W., G. (1990) Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. **58**: 3582-3587.
- Stelling, C.R., Orsi, R.H., and Wiedmann, M. (2010) Complementation of *Listeria monocytogenes* null mutants with selected *Listeria seeligeri* virulence genes suggests functional adaptation of Hly and PrfA and considerable diversification of *prfA* regulation in *L. seeligeri*. *Appl Environ Microbiol*. **76**: 5124-5139.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev*. **53**: 450-490.
- Stoll, R., Mertins, S., Joseph, B., Müller-Altrock, S., and Goebel, W. (2008) Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media. *Microbiology*. **154**: 3858-3876.
- Stoll, R., and Goebel, W. (2010) The major PEP-phosphotransferase systems (PTSS) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. *Microbiology*. **156**: 1069-1083.
- Studholme, D.J., and Dixon, R. (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol*. **185**: 1757-1767.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Charrier, V., Klier, A., Deutscher, J., and Rapoport, G. (1995) The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol*. **177**: 6928-6936.
- Stülke, J., and Hillen, W. (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. **2**: 195-201.
- Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M.F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S.D., and Hulett, F.M. (1996) Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **178**: 1374-1385.
- Sun, Y.H., Bakshi, S., Chalmers, R., and Tang, C.M. (2000) Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med*. **6**: 1269-1273.

- Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J.S., and Saier Jr, M.H. (2001) The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**: 329-346.
- Tobisch, S., Glaser, P., Krüger, S., and Hecker, M. (1997) Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **179**: 496-506.
- Tobisch, S., Stülke, J., and Hecker, M. (1999) Regulation of the *lic* operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol.* **181**: 4995-5003.
- Todhanakasem, T., and Young, G.M. (2008) Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol.* **190**: 6030-6034.
- Tortosa, P., Aymerich, S., Lindner, C., Saier Jr, M.H., Reizer, J., and Le Coq, D. (1997) Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Biol Chem.* **272**: 17230-17237.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., and Courvalin, P. (1990) A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4296.
- Tsai, H.N., and Hodgson, D.A. (2003) Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 6943-6945.
- Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (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.
- Vázquez-Boland, J.A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., and Goebel, W. (2001a) Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect.* **3**: 571-584.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001b) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 584-640.
- Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.T., Böckmann, R., González-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J.A. (1998) Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J Bacteriol.* **180**: 6655-6660.
- Vega, Y., Rauch, M., Banfield, M.J., Ermolaeva, S., Scotti, M., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J.A. (2004) New *Listeria monocytogenes* *prfA** mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol.* **52**: 1553-1565.

- Veiga, E., and Cossart, P. (2005) *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol.* **7**: 894-900.
- Vergne, I., Constant, P., and Lanéelle, G. (1998) Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry. *Anal Biochem.* **255**: 127-132.
- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Pérez-Martínez, G., and Deutscher, J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol Microbiol.* **36**: 570-584.
- Vu-Khac, H., and Miller, K.W. (2009) Regulation of mannose phosphotransferase system permease and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* by the EII_t^{Man} transporter. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 6671-6678.
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O.P., van Sinderen, D., and Kok, J. (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *J Bacteriol.* **189**: 3256-3270.
- Weickert, M.J., and Adhya, S. (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem.* **267**: 15869-15874.
- Weisser, P., Krämer, R., Sahm, H., and Sprenger, G.A. (1995) Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J Bacteriol.* **177**: 351-354.
- Wendisch, V.F., Bott, M., and Eikmanns, B.J. (2006) Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol.* **9**: 268-274.
- Williams, J.R., Thayyullathil, C., and Freitag, N.E. (2000) Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J Bacteriol.* **182**: 837-841.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478.
- Wu, L.F., Tomich, J.M., and Saier Jr, M.H. (1990) Structure and evolution of a multidomain multiphosphoryl transfer protein. Nucleotide sequence of the *fruB(HI)* gene in *Rhodobacter capsulatus* and comparisons with homologous genes from other organisms. *J Mol Biol.* **213**: 687-703.
- Wuenscher, M.D., Köhler, S., Bubert, A., Gerike, U., and Goebel, W. (1993) The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol.* **175**: 3491-3501.

- Xue, J., Hunter, I., Steinmetz, T., Peters, A., Ray, B., and Miller, K.W. (2005) Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 1283-1290.
- Xue, J., and Miller, K.W. (2007) Regulation of the *mpt* operon in *Listeria innocua* by the ManR protein. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 5648-5652.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**: 103-119.
- Yebra, M.J., Monedero, V., Zúñiga, M., Deutscher, J., and Pérez-Martínez, G. (2006) Molecular analysis of the glucose-specific phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system from *Lactobacillus casei* and its links with the control of sugar metabolism. *Microbiology.* **152**: 95-104.
- Zhu, X., Long, F., Chen, Y., Knøchel, S., She, Q., and Shi, X. (2008) A putative ABC transporter is involved in negative regulation of biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 7675-7683.
- Zúñiga, M., Comas, I., Linaje, R., Monedero, V., Yebra, M.J., Esteban, C.D., Deutscher, J., Pérez-Martínez, G., and González-Candelas, F. (2005) Horizontal gene transfer in the molecular evolution of mannose PTS transporters. *Mol Biol Evol.* **22**: 1673-1685.

ABSTRACT

L. monocytogenes is a ubiquitous foodborne pathogenic Gram-positive bacterium, which can multiply in host cells and infect humans causing septicemia, spontaneous abortion and méningoencephalitis. This bacterium transports glucose via phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems (PTS) and non-PTS permeases. Two major glucose-transporting PTSs belong to the mannose class. One is encoded by the *manLMN* (*man*) operon and the second by the *mpoABCD* (*mpo*) operon. One goal was to study the transport of glucose by the proteins encoded by these operons and to identify non-PTS glucose transporters. Growth studies in MM supplemented with glucose and glucose consumption assays with several mutants revealed that deletion of *manL* (encodes EIIB^{Man}) or *manM* (encodes EIIC^{Man}) significantly slowed glucose utilization (3- to 4-fold) compared to the WT AML73 or EGDe strain. Deletion of *mpoA* (encodes EIIA^{Mpo}) had no significant effect on glucose utilization (same phenotype as the WT) whereas deletion of *mpoB* (encodes EIIB^{Mpo}) significantly slowed glucose utilization (4- to -5 fold). By using qRT-PCR, we show that expression of the *man* operon is induced by glucose, whereas the *mpo* operon is expressed constitutively. Nevertheless, deletion of *mpoA* causes constitutive *man* operon expression whereas deletion of *mpoB* inhibits it. The PTS^{Mpo} therefore functions as a constantly synthesized glucose sensor regulating *man* operon expression. Deletion of *ptsI* (encodes the general PTS component EI) also inhibits *man* expression and the $\Delta ptsI$ mutant was most strongly impeded in glucose utilization. The residual glucose uptake probably owes to three GlcU-like non-PTS transporters. The successful heterologous complementation of the *E. coli* LJ140 strain, which is unable to transport glucose, suggests that the *L. monocytogenes* GlcU proteins, GlcU1, GlcU2 and GlcU3 (identified by sequences homology to GlcU proteins in other firmicutes) are indeed capable of transporting glucose.

A potential role of PTS and non-PTS components in PrfA regulation was studied in the *L. monocytogenes* AML73 strain (contains a *Phly-gus* fusion) and in the $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta mpoB$, $\Delta mpoA$, $\Delta ptsI$, *glcU* mutants derived from it. For that purpose, I carried out β -D-glucuronidase activity tests with bacteria grown either in liquid or on solid medium and qRT-PCR experiments (expression of *actA* and *hly* genes). Interestingly, deletion of *ptsI*, *manL*, *manM* and *mpoB* caused elevated PrfA activity (2- to -14 fold) and elevated expression of virulence gene expression (*actA* and *hly*) in the $\Delta manL$, $\Delta manM$ and $\Delta mpoB$ mutants was observed. Nevertheless, *glcU* inactivation and *mpoA* deletion had no effect on PrfA activity. The elevated PrfA activity disappeared when the *prfA* gene was also deleted in the $\Delta manL$, $\Delta manM$ and $\Delta mpoB$ mutants, confirming that the stimulatory effect of the various mutations on virulence gene expression is PrfA-dependent. All mutants exhibiting elevated virulence gene expression contain no or only little unphosphorylated EIIB^{Man}, which we therefore suspect to play a major role in glucose-mediated PrfA inhibition. The effect of the PTS mutations was also tested in *in vitro* host cells infection assays (Caco-2, Jeg-3 cells) and in an *in vivo* mouse model. Deletion of *ptsI* led to elevated infection of the host cells which probably owes to the elevated synthesis of the InlA protein.

RESUME

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram+, ubiquiste, pathogène intracellulaire d'origine alimentaire, responsable chez l'homme, de nombreuses infections telles que les infections foeto-maternelles, des méningo-encéphalites et des septicémies. La bactérie utilise préférentiellement le glucose qui est transporté via le système phosphoenolpyruvate:sucre phosphotransferase (PTS) et des perméases non-PTS. Les deux principaux transporteurs de glucose chez *L. monocytogenes* seraient des PTS de la classe mannose. Le premier est codé par l'opéron *manLMN* (*man*) et le deuxième, par l'opéron *mpoABCD* (*mpo*). Nous avons, dans un premier temps, mis en évidence le transport de glucose par ces PTS chez *L. monocytogenes* et aussi identifier d'autres transporteurs non-PTS de glucose. Des tests de croissance en milieu minimum (MM) additionné de glucose et des tests de consommation de glucose ont permis de montrer que les mutants $\Delta manL$ (*manL* code pour l'EIIAB^{Man}) et $\Delta manM$ (*manM* code pour l'EIIC^{Man}) utilisent moins vite le glucose que la souche sauvage AML73 ou EGDe (3 à 4 fois moins vite). Le mutant $\Delta mpoA$ (*mpoA* code pour l'EIIA^{Mpo}) montre un phénotype similaire à la souche sauvage tandis que le mutant $\Delta mpoB$ (*mpoB* code pour l'EIIB^{Mpo}) utilise 4 à 5 fois moins vite le glucose que la souche sauvage. Des tests de qRT-PCR ont par ailleurs permis de montrer que la délétion du gène *mpoA* permet une expression constitutive de l'opéron *man* tandis que la délétion du gène *mpoB* entraîne une inhibition de l'expression de cet opéron. Nous avons aussi montré que l'opéron *man* est induit par le glucose et l'opéron *mpo* est exprimé constitutivement. Le PTS^{Man} est le principal système de transport de glucose chez *L. monocytogenes* et le PTS^{Mpo} pourrait fonctionner comme un senseur de glucose qui en présence de ce sucre stimule l'expression de l'opéron *man* en régulant l'activité de ManR.

Le mutant $\Delta ptsI$ (*ptsI* code pour la protéine générale EI du PTS) utilise 8 à 10 fois moins vite le glucose que la souche sauvage et présente une très faible expression de l'opéron *man*. L'utilisation du glucose (bien que faible) par le mutant $\Delta ptsI$ permet d'affirmer qu'il existerait des transporteurs non-PTS qui permettraient à ce mutant d'utiliser le glucose. Des tests de complémentation hétérologue dans la souche *E. coli* LJ140 (incapable de transporter le glucose) ont permis de montrer que les trois protéines GlcU (GlcU1, GlcU2 et GlcU3, identifiées par homologie de séquences aux GlcU d'autres firmicutes) permettent le transport de glucose chez *L. monocytogenes* mais avec une très faible affinité.

Un rôle potentiel du PTS et des transporteurs non-PTS dans la régulation de PrfA a également été mis en évidence par des tests de dosage β -D-glucuronidase à partir de cultures bactériennes réalisées en milieux liquides ou sur géloses et aussi par des tests de qRT-PCR (pour l'expression des gènes *actA* et *hly*). Ces tests ont été réalisés à partir de la souche *L. monocytogenes* AML73 (portant la fusion *Phly-gus*) et des mutants $\Delta manL$, $\Delta manM$, $\Delta mpoB$, $\Delta mpoA$, $\Delta ptsI$ et *glcU* (construits dans cette souche). Les mutations *manL*, *manM*, *mpoB*, *ptsI* entraînent une augmentation de l'activité de PrfA (de 2 à 14 fois) et une augmentation de l'expression des gènes de virulence PrfA-dépendants (*hly* et *actA*) est également observée dans les mutants $\Delta manL$, $\Delta manM$ et $\Delta mpoB$. Les mutations *glcU* et *mpoA* ne montrent aucun effet sur l'activité de PrfA. Les mutants montrant une forte activité de PrfA contiennent peu ou pas de protéine EIIAB^{Man} qui est supposée jouer un rôle dans la régulation de l'activité de PrfA par le glucose.

L'effet des mutations PTS observé sur l'expression des gènes de virulence dépend de PrfA car cet effet disparaît quand le gène *prfA* est délété dans les mutants $\Delta manL$, $\Delta manM$ et $\Delta mpoB$. Les mutations montrant un effet sur l'activité de PrfA ont également été étudiées *in vitro* par des infections des cellules épithéliales (Caco-2 et Jeg-3) avec les différents mutants et également *in vivo* dans la souris. La délétion du gène *ptsI* montre un effet dans l'infection plus particulièrement dans l'entrée des bactéries dans les cellules.