

## Physiologie, métabolisme

### Étude des gènes dupliqués de la glycolyse chez *Lactococcus lactis* IL1403

Emmanuel JAMET<sup>a,b,\*</sup>, S. Dusko EHRlich<sup>a</sup>, Florence DUPERRAY<sup>b</sup>,  
Pierre RENAULT<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génétique Microbienne, INRA, Domaine de Vilvert,  
78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

<sup>b</sup> CIRDC DANONE, 12 rue de Galilée, 92350 Le Plessis-Robinson, France

**Abstract — Study of the duplicated glycolytic genes in *Lactococcus lactis* IL1403.** The conversion of sugars into lactic acid is the main metabolic pathway providing energy to lactic acid bacteria. This conversion is also involved in production of different compounds participating to the organoleptic properties of fermented products. The *L. lactis* knowledge of the genome has given the access to sequences of genes encoding the enzymes involved in the two main metabolic pathways described for the fermentation of glucose in lactic acid bacteria: (1) the homofermentative pathway through glycolysis leading to two lactate molecules per glucose consumed; (2) the heterofermentative pathway through the Pentose Phosphate pathway giving one lactate, one acetate and one CO<sub>2</sub> per molecule of glucose. The research of the genes, corresponding to proteins involved in these metabolic pathways, revealed that some enzymes are encoded by 2 distinct genes. This fact could give to the cell the possibility to produce enzymes with different biochemical properties, or to control their expression according to specific conditions. Two copies of genes potentially encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gap*) and enolase (*eno*) have been identified. Other microorganisms such as *E. coli* and *B. subtilis* also possess 2 *gap* genes sharing up to 60% homology, but having different functions. In *L. lactis*, *gap1* and *gap2* genes share around 80% identity at both the nucleotidic and protein level. The analysis of codon usage, the transcription and the effect of genes inactivation shows that *gap1* is the only gene involved in glycolysis. The transcription of this essential gene is very high during all phases of growth. Low increase of the level of transcription could be evidenced during growth in glucose, a sugar inducing the Catabolite Repression. Moreover, the presence of potential fixation site for CcpA (Cre box) upstream of initiation transcription box -35 suggests that *gap1* transcription is activated by this protein. In contrast, the *gap2* gene is dispensable and expressed at a very low level in our experimental conditions. Finally, in opposition to GapB from *B. subtilis*, the product of *L. lactis gap2* might not to be involved in the neoglucogenesis. *enoA* and *enoB* genes are coding for proteins sharing 55% identity with known enolase. In opposition to the *gap* genes, the *eno* genes does not share significant nucleotidic homologies together. However, *enoA* presents 87% identity with the enolase genes from sequenced *Streptococcus* species whereas *enoB* presents 95% identity with a plasmidic encoded gene isolated from *Streptococcus thermophilus*. These observations suggest that *enoB* was transferred from species to other. The analysis of codons bias strongly suggests that EnoA is the

---

\* Correspondance et tirés-à-part  
Tél. : (33) 1 34 65 25 26 ; fax : (33) 1 34 65 25 21 ; e-mail : jamet@biotec.jouy.inra.fr

main glycolytic enolase. The transcription of these two genes is high during the exponential growth, 2 folds higher in glucose for *enoA* and similar during glucose or galactose fermentation for *enoB*. *enoA* and *enoB* seem transcribed simultaneously during the growth. These results suggest that both genes may play a significant role in the glycolysis.

#### ***Lactococcus lactis* / metabolism / glycolysis / regulation**

**Résumé** — La conversion des sucres en acide lactique est la principale voie métabolique fournissant l'énergie aux bactéries lactiques. Cette conversion est également impliquée dans la production de différents composés participant aux propriétés organoleptiques des produits fermentés. Deux voies métaboliques ont été décrites pour la fermentation du glucose chez les bactéries lactiques : (1) la voie homofermentaire ou glycolyse qui conduit à la formation de deux molécules de lactate par molécule de glucose ; (2) la voie hétérofermentaire par la voie des pentoses phosphates donnant un lactate, un acétate et une molécule de CO<sub>2</sub> par molécule de glucose. La recherche des gènes correspondant aux protéines nécessaires au fonctionnement de ces voies métaboliques a parfois révélé que certaines enzymes pouvaient être codées par deux gènes distincts. En théorie, cela donne la possibilité à la cellule de produire des enzymes aux propriétés biochimiques différentes ou de contrôler leur expression en fonction de conditions spécifiques. Ainsi des gènes codant de possibles glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases et émolases sont présents en deux copies chez *L. lactis*. D'autres micro-organismes comme *E. coli* ou *B. subtilis* possèdent également deux gènes *gap* homologues entre eux à environ 60 %, mais dont la fonction diffère. Chez *L. lactis*, les gènes *gap1* et *gap2* présentent environ 80 % d'identité nucléotidique et protéique. L'analyse des biais de codons, de la transcription et de l'effet de l'inactivation de ces gènes montrent que seule Gap1 est impliquée dans la glycolyse. La transcription de ce gène essentiel est très forte durant toutes les phases de la croissance. Une faible augmentation de son expression a été mise en évidence lors de croissance en glucose, sucre induisant la répression catabolique. De plus, la présence d'un site de fixation potentiel de la protéine CcpA (boîte Cre), en amont de la boîte d'initiation de la transcription -35, suggère une activation de la transcription de ce gène par cette protéine. Au contraire, le gène *gap2* est dispensable et n'est quasiment pas transcrit dans nos conditions expérimentales. Enfin, contrairement à l'enzyme GapB de *B. subtilis*, le produit du gène *gap2* de *L. lactis* ne semble pas être impliqué spécifiquement dans la néoglucogénèse. Les gènes *enoA* et *enoB* codent des protéines présentant 55 % d'identité avec l'ensemble des émolases caractérisées. Ces deux copies, contrairement aux gènes *gap*, ne possèdent qu'une très faible homologie entre elles. Cependant, *enoA* partage 87 % d'identité avec les gènes émolases des Streptocoques et *enoB* environ 95 % avec un gène codant une émolase plasmidique chez *Streptococcus thermophilus*. Ces observations suggèrent qu'*enoB* aurait été transféré d'une espèce à l'autre. L'analyse des biais de codons suggère fortement qu'EnoA soit l'émolase glycolytique principale. La transcription de ces deux gènes est forte au cours de la phase exponentielle, deux fois plus forte lors d'une fermentation en glucose comparé au galactose pour le gène *enoA* et semblable pour le gène *enoB*. *enoA* et *enoB* semblent transcrits simultanément au cours de la croissance. Ces différents résultats suggèrent que les deux gènes pourraient contribuer significativement à la glycolyse.

#### ***Lactococcus lactis* / métabolisme / glycolyse / régulation**

### **1. INTRODUCTION**

Les bactéries lactiques sont parmi les bactéries à Gram-positif les plus étudiées sur le plan génétique après *Bacillus subtilis*, en particulier à cause de leur importance

dans l'industrie agro-alimentaire. Afin de comprendre et mieux contrôler les mécanismes qui régissent les fermentations lactiques, il semble indispensable de mieux connaître d'une manière générale le métabolisme et l'organisation génétique de ces

bactéries. En effet, il ressort des études effectuées jusqu'à présent que le modèle *B. subtilis* ne s'applique pas, en de nombreux points, aux bactéries lactiques, tant au niveau du contrôle des flux par les enzymes qu'au niveau du contrôle génétique. Une raison simpliste de cette différence serait que les niches écologiques des bacilles diffèrent notablement de celles des bactéries lactiques. Les premiers vivent dans le sol, et les seconds dans des milieux riches, comme le lait, les plantes ou le tractus digestif. L'une des particularités les plus marquantes du métabolisme des bactéries lactiques concerne l'utilisation de la source de carbone. Celui-ci est transformé principalement en lactate après la glycolyse au lieu d'entrer dans le cycle de Krebs (non fonctionnel chez *L. lactis*) où il permettrait une récupération d'énergie supplémentaire. Il en résulte que ces bactéries sont très dépendantes des sucres comme source d'énergie, et qu'elles acidifient le milieu très rapidement, en raison de la transformation des sucres en acides organiques. Ainsi, dans des conditions d'anaérobiose stricte, 95 % du glucose est transformé en lactate, le reste se retrouvant majoritairement dans les parois et les lipides. La conversion des sucres en acide lactique est la principale voie métabolique fournissant l'énergie aux bactéries lactiques. Cette conversion est également impliquée dans la production d'une grande quantité de molécules conférant des propriétés organoleptiques aux produits finaux.

Deux voies métaboliques ont été décrites pour la fermentation des sucres chez les bactéries lactiques. La première est la voie homofermentaire où le glucose est assimilé par la glycolyse uniquement et conduit à la formation de deux molécules de lactate par molécule de glucose. La seconde est la voie hétérofermentaire où l'assimilation se fait par la voie des pentoses phosphates en donnant un lactate, un acétate et une molécule de CO<sub>2</sub> pour une molécule de glucose.

L'analyse de la séquence complète de *Lactococcus lactis* IL1403 [1] a permis

de mettre en évidence la présence de deux copies des gènes codant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GapDH) et l'énolase. Les GapDH permettent la conversion du glycéraldéhyde 3 phosphate en triose phosphate. La présence d'un deuxième gène homologue à une GapDH a déjà été décrit chez les bactéries à Gram-négatif comme *E. coli* [4, 9, 19] et plus récemment chez les bactéries à Gram-positif comme *Bacillus subtilis* [6]. Chez ces bactéries, les deux gènes codent des enzymes aux propriétés biochimiques différentes ; GapA de *E. coli* est la GapDH glycolytique tandis que GapB possède une activité Erythrose-4-phosphate déshydrogénase (E4pDH) [19], impliquée dans une voie du métabolisme parallèle à la glycolyse. De même, GapA de *Bacillus subtilis* est la GapDH glycolytique, tandis que GapB possède une activité biochimique caractéristique d'une enzyme néoglucogénique [6].

Les énoleses permettent la conversion du phosphoenol pyruvate en pyruvate. Cette réaction représente la dernière étape de la glycolyse avant la conversion en acide lactique. Aucune bactérie et peu d'autres microorganismes, en dehors de *Saccharomyces cerevisiae* [5, 10, 14], ne semblent posséder, comme *L. lactis*, deux copies de ce gène. Nous avons entrepris dans ce travail de caractériser l'expression, la régulation et le rôle potentiel de chacun de ces gènes.

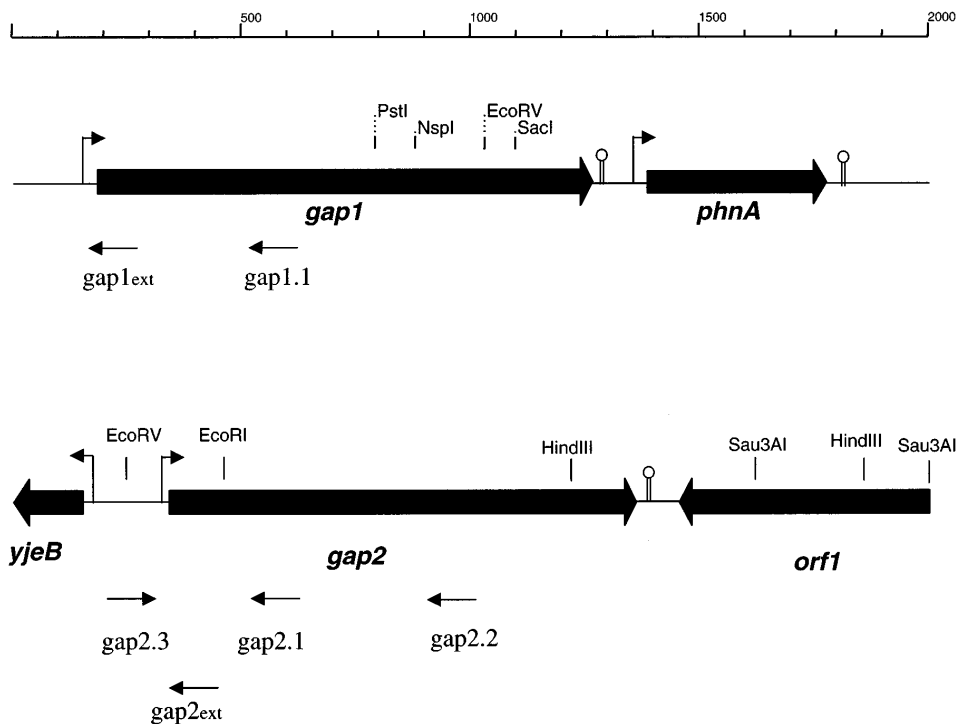
## 2. LES GÈNES CODANT UNE GLYCÉRALDÉHYDE-3-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE

### 2.1. Étude des séquences et caractérisation des signaux d'expression

En 1995, le gène nommé dans cet article *gap2* a été décrit par Cancilla [2] comme codant la GapDH glycolytique de *L. lactis*. L'analyse de la séquence de *L. lactis* IL1403, a permis de mettre en évidence une

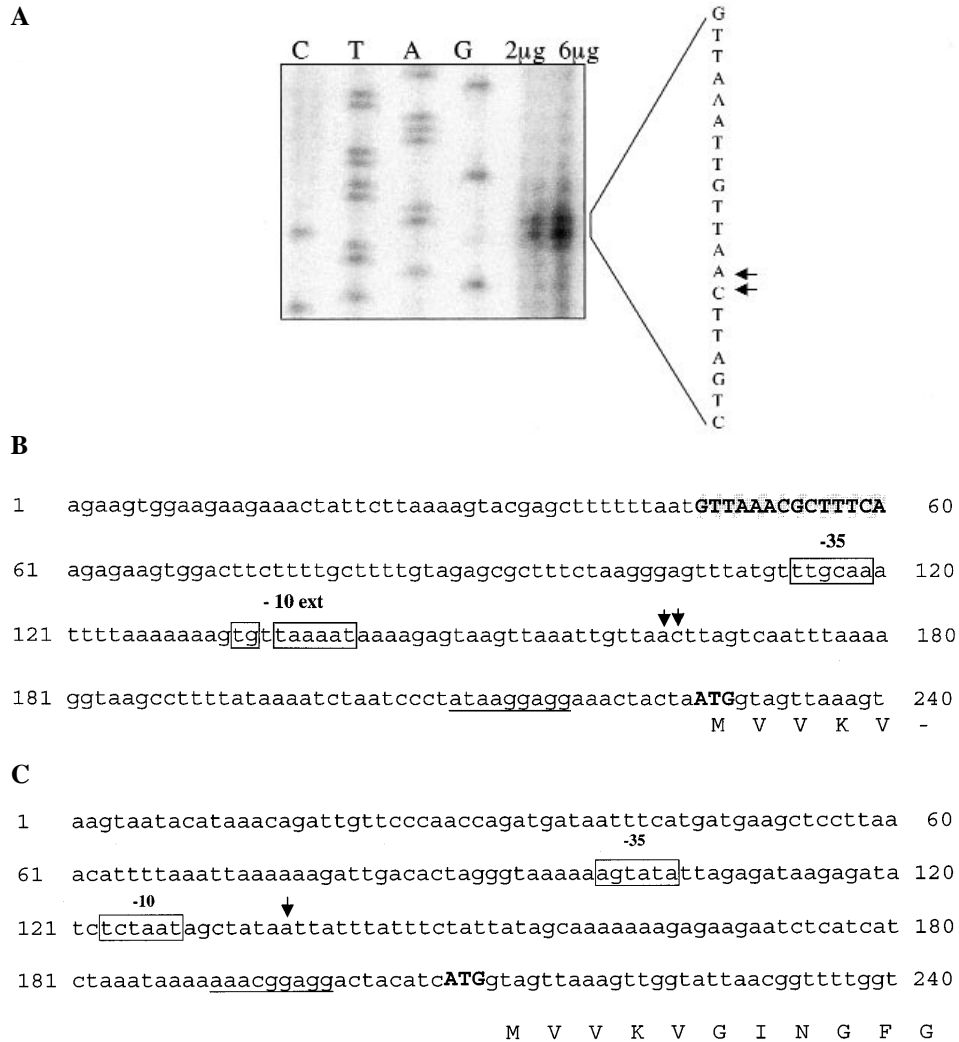
deuxième copie d'un gène codant une GapDH, *gap1*. Les gènes *gap1* et *gap2* de *Lactococcus lactis* (Fig. 1) codent deux protéines qui présentent 60 % d'homologie avec les glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases. Ces deux gènes sont transcrits chacun indépendamment et codent des protéines de 336 et 337 acides aminés.

Le point de démarrage de la transcription du gène *gap1* a été déterminé par extension d'amorce afin de localiser le promoteur (Fig. 2A). Les boîtes d'initiation de la transcription -10 et -35 présentées figure 2B, en amont du + 1 de transcription, sont relativement éloignées de ce dernier, ce qui suggère, soit une maturation moléculaire du



**Figure 1.** Organisation des deux gènes *gap* de *L. lactis*. Les phases ouvertes de lecture (ORF) sont représentées par une flèche pleine noire, les promoteurs par des flèches simples et les terminateurs par des tiges/boucles. Les amorces utilisées pour amplifier les fragments nécessaires à la construction des différents vecteurs, aux Northern blot, ainsi qu'aux extensions d'amorce sont représentées en dessous des gènes. Gap1.1 : GGC TAT GCT GGC TTT GGC AAT TAT GG, gap1ext : TAG GGA TTA GAT TTT ATA AAA GGC, gap2ext : TTT TTA TTT AGA TGA TGA GAA TTT CTC, gap2.1 : CGA CGT AAT GCC AAA CGT CCA ATA CG, gap2.2 : CAA GCA CTG TAA CAA GTT CAG, gap2.3 : GAA GGC GAA ACT TTG AGA CG.

**Figure 1.** Organization of *gap* genes in *L. lactis*. The open reading frame (ORF) are shown by large black arrows, promoters by simple arrows and terminators by stems/loops. Primers used for PCR amplification of cloning fragments, Northern blot and primer extensions are under genes. Gap1.1: GGC TAT GCT GGC TTT GGC AAT TAT GG, gap1ext: TAG GGA TTA GAT TTT ATA AAA GGC, gap2ext: TTT TTA TTT AGA TGA TGA GAA TTT CTC, gap2.1: CGA CGT AAT GCC AAA CGT CCA ATA CG, gap2.2: CAA GCA CTG TAA CAA GTT CAG, gap2.3: GAA GGC GAA ACT TTG AGA CG.



**Figure 2.** (A) Extension d’amorce sur le transcrit du gène *gap1*. Les 4 premiers puits correspondent aux produits de la séquence G, A, T, C de la région promotrice du gène. Les deux puits suivants correspondent aux produits des extensions d’amorces réalisées à partir de 2 µg et 6 µg d’ARN totaux d’une culture de *L. lactis* IL1403 en MCD glucose prélevée à une  $DO_{600nm}$  de 0,4. (B, C) Cartographie de la région promotrice du gène *gap1* (B) et *gap2* (C). Les boîtes consensuelles d’initiation de la transcription -10 étendue et -35 sont encadrées, les flèches indiquent les origines de transcription déterminées par l’extension d’amorce, le site de fixation du ribosome est souligné, le codon ATG d’initiation de la traduction est en majuscule et en caractère gras, et la boîte Cre potentielle est grisée.

**Figure 2.** (A) *gap1* primer extension. Lines 1 to 4 are G, A, T, C reaction sequence of promoter. The next 2 lines are primer extensions obtained from 2 µg or 6 µg of total RNA extract from *L. lactis* IL1403 grown in CDM glucose at  $OD_{600nm}$  0.4. (B, C) *gap1* (B) and *gap2* (C) promoter map. Consensus extended -10 and -35 boxes are boxed. Arrows indicate transcription starts defined by primer extensions. Ribosome binding sites (RBS) are underlined, ATG translation start codons are in upper case heavy letters and the putative Cre box is paint with grey.

messager, soit que le promoteur ne possède pas les motifs consensus habituels de *Lactococcus lactis*. La cartographie du promoteur de *gap2* a également été effectuée, et ne confirme pas la position des signaux d'initiation de la transcription caractérisés en 1995 pour la souche LM230 (Fig. 2C) [2]. Les signaux d'initiation de la transcription -10 et -35 sont également peu conservés par rapport aux motifs consensus. Des sites de fixation du ribosome (RBS), ATAAG-GAGG et AAACGAGG, très consensuels, sont présents et devraient permettre la traduction efficace des deux gènes. Cinquante-trois paires de bases en amont de la boîte -35 du promoteur de *gap1*, se trouve une boîte potentielle de régulation nommée boîte Cre (Fig. 2B). Chez *B. subtilis*, cette boîte est le site de fixation de la protéine régulatrice CcpA qui conduit à la répression ou à l'activation des gènes qu'elle contrôle. Cette régulation intervient lorsque la bactérie consomme un sucre introduit dans la cellule par un système PTS [3, 11, 13, 15, 16, 20] comme le glucose. Ce mécanisme de régulation a été décrit chez de nombreuses bactéries à Gram-positif. Ainsi chez *L. lactis*, l'opéron *las* [12] composé des gènes codant la phosphofructokinase, la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase est activé par CcpA en présence de glucose tandis que les opérons *lac* [7, 21] et *gal* [12] sont réprimés dans ces conditions. Dans les opérons *lac* et *gal*, le site Cre se situe en aval du promoteur du gène, tandis que pour l'opéron *las* et le gène *ackA* de *B. subtilis* [8], activés tous les deux par CcpA, la boîte Cre se situe en amont du promoteur. La potentielle boîte Cre du gène *gap1* de *L. lactis*, se trouve également en amont du -35, ce qui suggère qu'elle puisse être impliquée dans l'activation transcriptionnelle du gène par CcpA.

Les produits des gènes *gap1* et *gap2* de *Lactococcus lactis* IL 1403 présentent 95 % identité entre eux. La construction d'un arbre phylogénétique (Fig. 3) des différentes GapDH disponibles dans les banques montre que ces protéines sont plus proches entre

elles que ne le sont *gapA* de *gapB* de *E. coli* ou de *B. subtilis*. Ce résultat suggère une duplication récente de ce gène au sein du chromosome. L'analyse du biais de codons de *gap1* et *gap2* révèle cependant une différence marquée. En particulier, seul *gap1* possède un biais d'utilisation des codons comparable à celui des gènes fortement exprimés dont les gènes glycolytiques font partie. À l'inverse et contrairement à ce qui a été préalablement décrit [2], *gap2* ne présente pas de biais de codons significatif.

## 2.2. Expression des gènes *gap*

Lors d'une croissance bactérienne en présence soit de glucose, soit de galactose, les ARNs totaux ont été extraits à des temps correspondant respectivement au début ( $DO_{600nm} = 0,2$ ) et fin ( $DO_{600nm} = 0,8$ ) de phase exponentielle, puis analysés par Northern blot. Des sondes oligonucléotidiques de 26 pb et possédant une température de fusion similaire (70 °C) nommées *gap1.1* et *gap1.2* (Fig. 1), ont été utilisées pour visualiser chacun des transcrits.

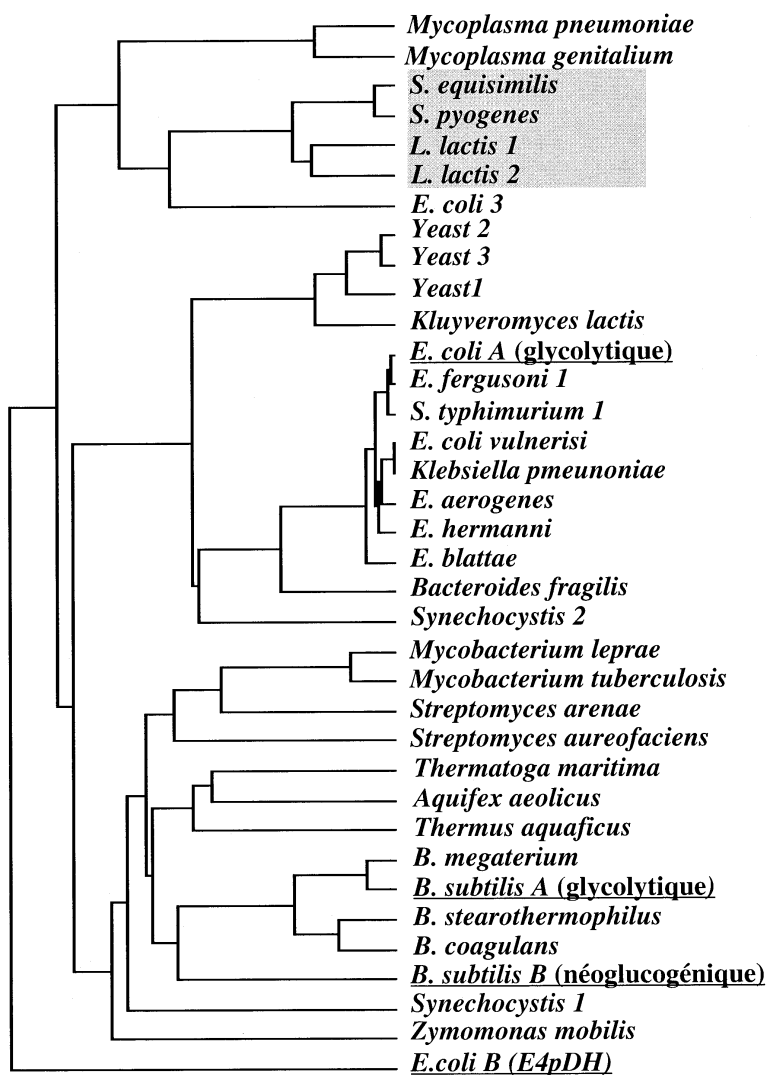
Seul *gap1* est très fortement transcrit au cours de la croissance bactérienne (Fig. 4). Par ailleurs, le niveau de transcription est pratiquement identique en début et en fin de phase exponentielle. Une augmentation du niveau de transcription du gène d'un facteur deux a été mise en évidence entre une croissance en glucose et une croissance en galactose, sucre non dépendant du système PTS. Ce résultat suggère que la potentielle boîte Cre de régulation transcriptionnelle, conduit à l'activation du gène en présence de glucose par l'intermédiaire de la protéine CcpA. L'étude de la transcription de ce gène dans un mutant *ccpA* de *Lactococcus lactis* IL1403 nous permettra de vérifier cette hypothèse.

Le gène *gap2* est au contraire très faiblement exprimé quelle que soit la phase de croissance étudiée et la source de carbone testée (glucose et galactose). Nous avons alors mené une approche différente pour

l'analyse de l'expression du gène, en réalisant une fusion transcriptionnelle du promoteur de *gap2* au gène de la luciférase bactérienne de *Vibrio Harveyi* (Fig. 5). Il est ainsi possible de mesurer l'activité du promoteur de *gap2* dans un grand nombre de

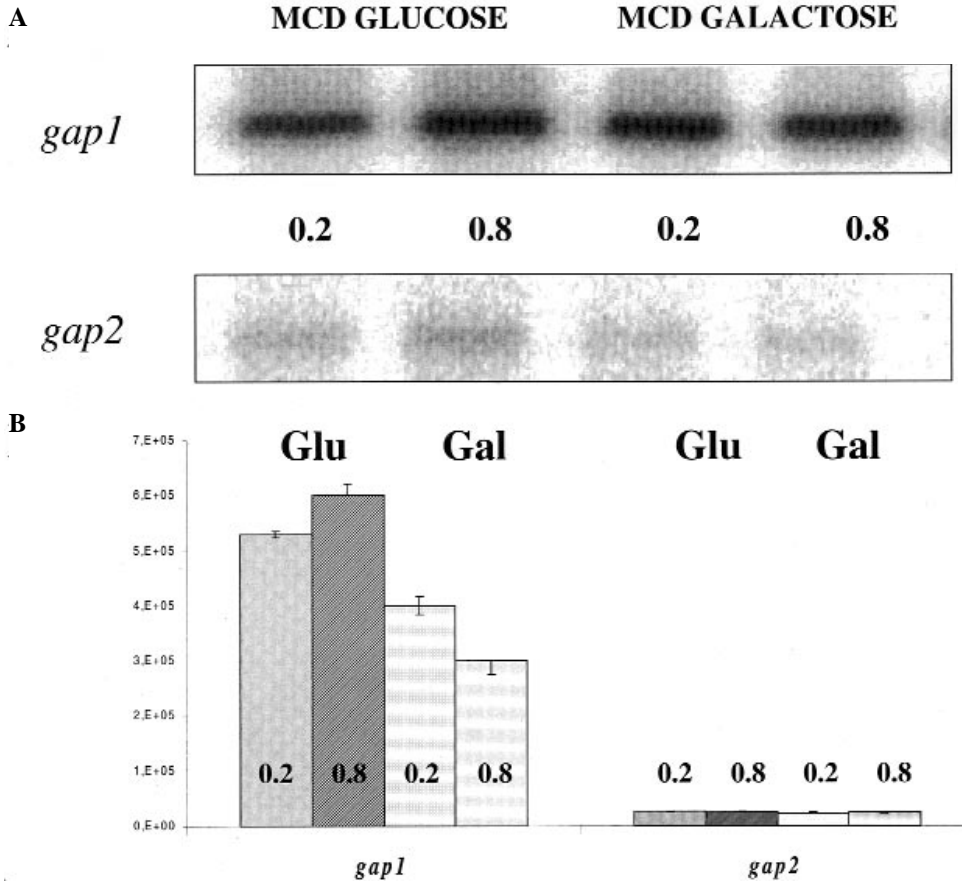
conditions expérimentales, telles que la source de carbone, les carences et les stress.

Les premiers résultats montrent que l'expression de *gap2* est faible et constante au cours de la croissance. Nous n'avons pas



**Figure 3.** Arbre phylogénétique des gènes *gap* chez les micro-organismes. L'arbre a été construit à l'aide des programmes « pileup », « distances » et « growtree » sous GCG.

**Figure 3.** Phylogenetic tree of *gap* genes from micro-organisms. The tree was constructed with "pileup", "distances" et "growtree" GCG programs.



**Figure 4.** Northern blot (A) et quantification des transcrits (B) des gènes *gap*. Quinze microgrammes d'ARN totaux ont été séparés sur un gel d'agarose 1 % puis ensuite transférés et fixés sur une membrane de nitrocellulose [17]. Deux sondes oligonucléotiques de 26 mers spécifiques à chaque gène ont été utilisées pour l'hybridation. L'intensité des bandes révélée au phospho-imager est quantifiée par le logiciel ImageQuant v3.3 de Molecular Dynamic. Les résultats finaux sont obtenus après avoir pondéré les mesures par les quantités d'ARN 16S.

**Figure 4.** Northern blot (A) et quantification of *gap* genes transcripts (B). Fifteen micrograms of total RNA are laid on 1% agarose gel. RNA are blotted and fixed on nylon membrane [17]. Two 26 mers oligonucleotidic probes are used for hybridisation. Intensity of bands reveals in phospho-imager, are quantified with ImageQuant v3.3 program of Molecular Dynamics.

déterminé de différences significatives du niveau de transcription lors d'une croissance en glucose, en galactose ou en présence d'autres sucres non-PTS comme le ribose. Un stress par augmentation de la température ou une carence en sucre ne conduit également pas à l'augmentation du niveau de transcription (donnée non présentée).

### 2.3. Études fonctionnelles des gènes *gap*

Nous avons tenté d'inactiver chacun des gènes *gap* par intégration chromosomique d'un plasmide par simple recombinaison homologue dans leur phase ouverte de lecture. Par cette technique, aucun mutant du

gène *gap1* n'a pu être isolé, quelle que soit la source de carbone utilisée (glucose, fructose, galactose et ribose). Au contraire, différents clones inactivés pour le gène *gap2* ont été obtenus sans difficulté. Ces résultats démontrent le caractère essentiel du gène *gap1*. Pour confirmer ces observations, nous avons mis sous contrôle d'un promoteur inductible (le promoteur nisine), chacun de ces gènes. Seul le promoteur du gène *gap2* a pu être remplacé par le promoteur nisine sur le chromosome. Ces résultats montrent que le remplacement du promoteur

de *gap1* par le promoteur nisine ne permet pas l'expression correcte de ce gène lors de la sélection des clones et ceci quelles que soient les quantités de nisine ajoutées au milieu.

La comparaison des motifs conservés des gènes *gap* de *L. lactis* avec ceux identifiés chez les autres organismes [6] et pour lesquels la fonction biochimique a été caractérisée, montre que *gap1*, comme *gap2*, possèdent les signatures des enzymes glycolytiques et non des GapDH néoglucogéniques ou de E4pDH (Fig. 5). Pour *gap2*, seule une

Glycolyse	34	182	190	212
<i>L. lactis (gap1)</i>	NDL	HGYTGDQ	MTLDGPH	NSTGA
<i>L. lactis (gap2)</i>	NDL	HGYTGDQ	MTLDGPH	ASSGA
<i>B. stearothermophilus</i>	NDL.	HSYTNDQ	QILDLP.	TTTGA
<i>B. subtilis (gapA)</i>	NDL.	HSYTNDQ	QILDLP.	TSTGA
<i>E. coli (gapA)</i>	NDL.	HATTATQ	KTVDGPS	SSTGA
<i>H. pylori (gap2)</i>	ND.P	HSYTSDQ	KLIDL.A	TTTKA
<i>N. gonorrhoeae (gap1)</i>	NDL.	HAYTGDQ	NTLDAPH	NSTGA
<i>N. meningitidis (gap1)</i>	NDL.	HAYTGDQ	NTLDAPH	NSTGA
<i>P. aeruginosa (gap1)</i>	NDLG	HAYTADQ	RLQDAPH	TTTGA
<i>S. putrefaciens (gap1)</i>	NDPA	HDITNTQ	TILDAP.	TTTGS
<i>S. typhimurium (gap1)</i>	NDL.	HATTATQ	KTVDGPS	SSTGA
<i>V. cholerae (gap1)</i>	NDVA	HNLTNTQ	TILDAPH	TTTGS

E4pDH				
<i>E. coli (gapB)</i>	NELA	HSAMHDQ	QVIDAY.	VDTKL
<i>P. aeruginosa (gap2)</i>	NDLA	HSAMNDQ	PVIDAYH	VSTGL
<i>S. putrefaciens (gap2)</i>	NELA	HSAMNDQ	QVIDAY.	VDTKL
<i>S. typhimurium (gap2)</i>	NELA	HSAMNDQ	QVIDAY.	VDTKL
<i>V. cholerae (gap5)</i>	NELA	HSSMNDQ	QVIDAY.	VDTKL
<i>Y. pestis (gap2)</i>	NELA	HSSMNDQ	PVIDAY.	VDTKL

Néoglucogénèse				
<i>B. subtilis (gapB)</i>	NAS.	HAYTNDQ	KNIDNP.	TTTGA
<i>H. pylori (gap1)</i>	NS.T	HSYTNDQ	NLLDTK.	TSTGV
<i>N. gonorrhoeae (gap2)</i>	NAS.	HALTNDQ	TVT DVR.	TKTGA
<i>N. meningitidis (gap2)</i>	NAS.	HALTNDQ	TVT DVR.	TKTGA

**Figure 5.** Comparaison des motifs conservés chez les glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases. Trois classes ont été définies dans cette classification, les GapDH glycolytiques, les Erythrose-4-phosphateDH et les GapDH impliquées dans la néoglucogénèse.

**Figure 5.** Comparison between conserved motifs from glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenases. This classification defines three class: glycolytic GapDH, Erythrose-4-phosphateDH and neoglucogenic GapDH.

serine remplace une tyrosine dans le dernier motif. Cancilla a montré en 1995 [2], grâce à une étude par complément fonctionnelle de *E. coli*, que le produit du gène *gap2* avait une activité glycolytique. Nous avons également effectué une étude similaire pour confirmer les résultats obtenus par l'analyse de la séquence concernant le rôle biochimique de Gap1. Le gène a été cloné dans un vecteur sous la dépendance d'un promoteur fort et constitutif. Ce vecteur a été introduit dans le double mutant DS123 de *E. coli*,  $\Delta gapA$ ,  $\Delta epd$  (*gapB* : Erythrose-4-phosphateDH) [19]. Ce dernier pousse uniquement dans un milieu minimum supplémenté de glycérol et de succinate [19] puisque la glycolyse et la néoglucogénèse ne sont plus fonctionnelles. Les bactéries transformées sont testées sur des milieux nécessitant une activité GapDH glycolytique ou impliquée dans la néoglucogénèse cellulaire. Le gène *gap1* est capable, comme le gène *gap2*, de compléter le double mutant en restituant un phénotype de croissance en LB, LB glucose et milieu minimum glucose.

### 3. LES GÈNES CODANT UNE ÉNOLASE

#### 3.1. Étude des séquences des gènes *eno*

Les deux gènes *eno* de *L. lactis* IL1403 codent des protéines de 433 et 422 acides aminés qui possèdent 60 % d'identité avec les émolases caractérisées chez les autres micro-organismes. Au contraire des gènes *gap1* et *gap2*, les produits des gènes *eno* ne possèdent que 64 % d'identité entre eux, ce qui suggère qu'ils ne résultent pas d'une duplication récente d'un même gène. Les gènes *eno* sont transcrits individuellement en un messager d'environ 1 300 nucléotides. L'étude de la séquence a permis de révéler la présence des signaux consensuels d'initiation de la transcription et de la traduction. L'étude du biais de codons montre que *enoA*, contrairement à *enoB*, est fortement

biaisé de façon comparable au gène *gap1*. Ces données suggèrent que *enoA* puisse être plus fortement exprimé qu'*enoB* et joue ainsi un rôle majeur dans la glycolyse.

#### 3.2. Étude phylogénétique des gènes *eno*

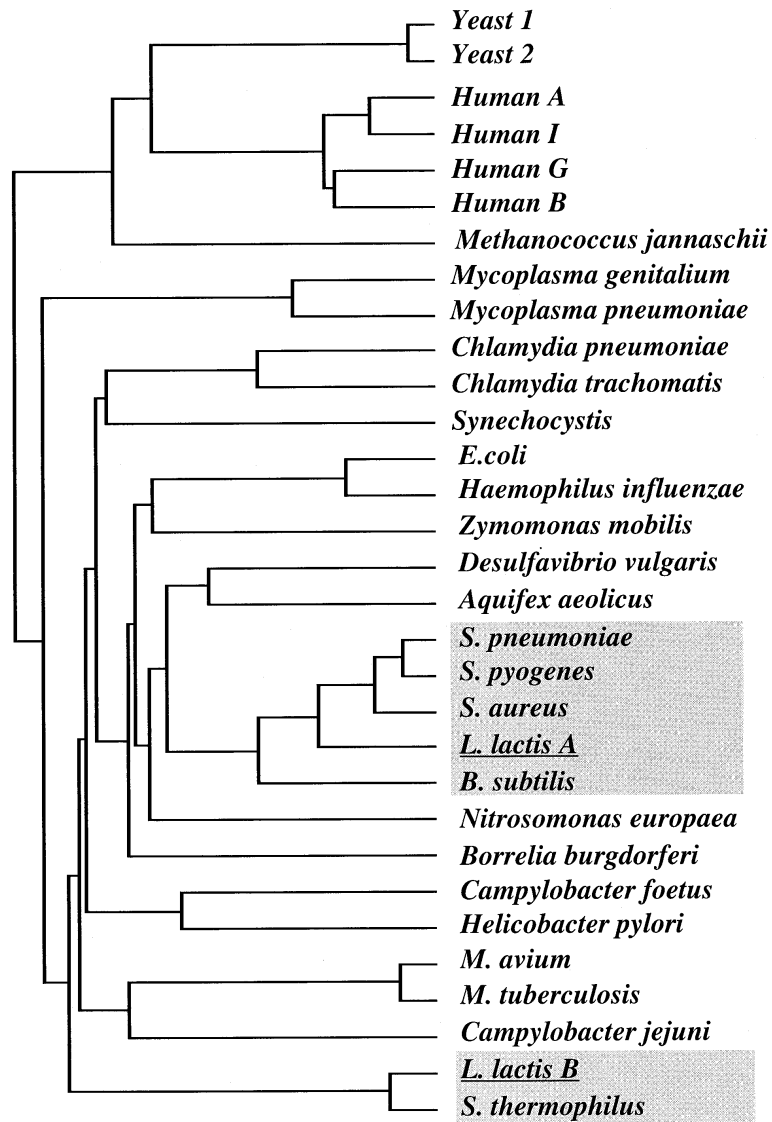
L'arbre phylogénétique (Fig. 6), obtenu par comparaison des séquences codant les émolases disponibles dans les banques, confirme l'éloignement génétique des émolases EnoA et EnoB. Il révèle de plus l'appartenance d'EnoA au groupe des émolases chromosomiques des streptocoques et de façon plus générale, des bactéries Gram-positif. Par contre, EnoB est très proche d'une émolase de *Streptococcus thermophilus* portée par un plasmide [13]. Deux groupes peuvent ainsi être distingués : un premier groupe composé d'EnoA de *L. lactis* et des émolases de *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* et *Staphylococcus aureus* qui présentent plus de 80 % d'identité entre elles. Le deuxième groupe étant composé d'EnoB et de l'émolase plasmidique de *S. thermophilus* partageant 91 % d'identité. Par contre, d'un groupe à l'autre, les séquences partagent moins de 65 % d'identité. Ces résultats suggèrent que le gène *enoB* ait pu être transféré d'une souche de *Lactococcus lactis* vers *Streptococcus thermophilus*. EnoA de *L. lactis* serait ainsi un orthologue des émolases présentes chez les Gram-positifs tandis que l'origine et le rôle d'EnoB reste à déterminer.

#### 3.3. Transcription des gènes *eno*

Les mesures de la transcription des deux gènes *enoA* et *enoB* ont été faites par Northern blot (Fig. 7) en utilisant comme sonde un fragment PCR dans une région non homologue interne à chacun des gènes. *enoA* est fortement exprimé durant la phase exponentielle en présence de glucose ou de galactose. Le niveau de transcription semble dépendre faiblement de la source de sucre

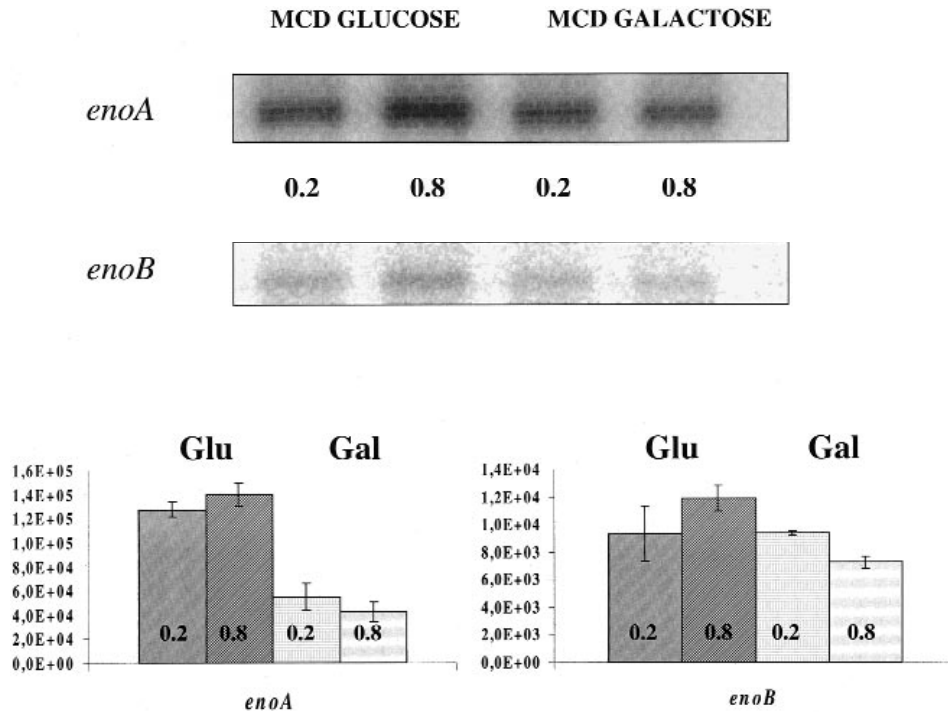
(facteur 2 à 3 entre le glucose et le galactose). Le niveau de transcription du gène *enoB* semble moins fort que celui d'*enoA* et nous n'avons pas détecté de variations

entre glucose et galactose. Des fusions transcriptionnelles au promoteur de chacun des gènes nous permettront de confirmer prochainement ces résultats.



**Figure 6.** Arbre phylogénétique des gènes codant pour des émolases potentielles dans les trois règnes (Prokaryotes, Eucaryotes et Archae) obtenu par la même méthode que celui de la figure 3.

**Figure 6.** Phylogenetic tree of putative enolase genes from the three kingdoms (Prokaryotes, Eukaryotes and Archae) obtained with the same method as Figure 3.



**Figure 7.** Analyse de la transcription des gènes *enoA* et *enoB* chez *L. lactis* par Northern blot. La même méthode que la figure 4 a été utilisée. Les membranes ont été hybridées avec une sonde PCR de 700 pb internes aux gènes.

**Figure 7.** Analysis of *enoA* and *enoB* transcription from *L. lactis* by Northern blot. The same method as Figure 4 has been used. Membranes are hybridized with 700 bp PCR internal probes.

### 3.4. Premiers éléments d'une étude fonctionnelle

Les deux gènes *eno* sont exprimés ensemble lors de la croissance cellulaire, que ce soit en glucose ou en galactose. La comparaison des motifs conservés (Fig. 8) entre les différentes énolasses caractérisées montre que EnoA et EnoB de *L. lactis* ont toutes les deux, les domaines conservés et les signatures protéiques caractéristiques des énolasses glycolytiques. En particulier, l'histidine (acide aminé 154, 155 ou 157) correspondant au site actif, les aspartates (241 ou 244 et 312 ou 314) ainsi que le glutamate (285 ou 287) impliqués dans la

ixation du magnésium nécessaires à la conversion du phosphoenol pyruvate en pyruvate, sont conservés dans EnoA comme dans EnoB. Les premières tentatives d'interruption des deux gènes suggèrent quant à elles, comme pour les gènes *gap*, qu'une seule des deux énolasses de *L. lactis*, EnoA, est essentielle à la glycolyse.

## 4. CONCLUSION

Nous avons caractérisé deux enzymes de la glycolyse, chacune potentiellement codée par deux gènes chez *L. lactis* IL1403. L'étude transcriptionnelle et fonctionnelle de ces

154 à 157

<i>L.lactisA</i>	VPSGASTG	GANAILGVSI	IINGGSHSDA	VGDEGGFAPK	LIKVNQIGTLTETF	SGETEDSTISDIAVATNAGQIKTG
<i>L.lactisB</i>	VPSGASTG	GANAILGVSM	VINGGVHADS	VGDEGGFAPK	LIKLNQIGTVTEAI	SGETVDSYIADFAVAMHAGQIKTG
<i>S.thermophilus</i>	VPSGASTG	GANAILGVSM	VINGGVHADS	VGDEGGFAPK	LIKLNQIGTVTETI	SGETVDSYIADFSVAMHAGQIKSG
<i>S.pneumoniae</i>	VPSGASTG	GANAILGVSI	IINGGSHSDA	VGDEGGFAPR	LIKVNQIGTLTETF	SGETEDSTIADI AVATNAGQIKTG
<i>S.pyogenes</i>	VPSGASTG	GANAILGVSI	IINGGSHSDA	VGDEGGFAPK	LIKVNQIGTLTETF	SGETEDSTIADI AVATNAGQIKTG
<i>E.coli</i>	APSGASTG	GANAILAVSL	IINGGFHADN	VGDEGGYAPN	LIKFNQIGSLTETL	SGETEDATIADLAVGTAAGQIKTG
<i>S.aureus</i>	VPSGASTG	GANAILGVSI	IVNGGFHADS	VGDEGGFAPK	LIKVNQIGTLTETF	SGETEDSTIADI AVATNAGQIKTG
<i>M.tuberculosis</i>	VPSGASTG	GGNAILGVSL	ILNGGAHADT	LGDEGGFAPD	LVKVNQIGTLTETL	SGETEDTMIADLAVAIGSGQIKTG
<i>B.subtilis</i>	VPSGASTG	GANAILGVSM	IVNGGFHADN	VGDEGGFAPN	LIKVNQIGTLTETF	SGETEDTTIADI AVATNAGQIKTG
<i>yeast2</i>	VPSGASTG	GANAILGVSM	VLNGGSHAGG	VGDEGGVAPN	LLKVNQIGTLSESI	SGETEDTFIADLVVGLRTGQIKTG
<i>human A</i>	VPSGASTG	GANAILGVSL	VINGGSHAGN	VGDEGGFAPN	LLKVNQIGSVTESL	SGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTG

**Figure 8.** Comparaisons des motifs conservés chez les énoïases fonctionnelles.

**Figure 8.** Comparison of conserved motifs in functional enolases.

gènes a permis de montrer que *L. lactis* était différente des bactéries modèles comme *E. coli* ou *B. subtilis*. En effet, la présence de deux gènes codant des enzymes homologues avec des GapDH a été mise en évidence chez de nombreuses autres bactéries, mais pour la plupart d'entre elles, les activités enzymatiques correspondantes sont différentes. Chez *L. lactis* IL1403, les gènes *gap1* et *gap2* codent pour des GapDH glycolytiques, mais dans les conditions de croissance testées en laboratoire, seul *gap1* est fortement transcrit quelle que soit la source de carbone consommée par la bactérie. Par contre, l'expression du gène *gap2* semble être cryptique dans cette sous-espèce de lactocoques, de façon similaire à l'opéron *bgl* décrit chez *E. coli* [18]. Les conditions naturelles où *gap2* serait exprimé restent à déterminer.

Les protéines codées par les gènes *eno* possèdent les caractéristiques d'enzymes impliquées dans la glycolyse. Les gènes sont transcrits ensemble pendant la phase exponentielle de croissance et leur taux de transcription semble relativement différent. La présence de deux copies de ce gène est néanmoins tout à fait surprenante dans le règne microbien. En effet, *L. lactis* est jusqu'à présent la seule bactérie possédant deux gènes codant des émolases. Il est intéressant de noter que *Saccharomyces cerevisiae* possède également deux émolases. Ces deux organismes ont un métabolisme fermentaire très actif qui pourrait nécessiter la présence de deux enzymes, principalement afin d'éviter une limitation lors d'un flux glycolytique intense. Une autre hypothèse serait d'assurer les fonctions de la voie dans des conditions spécifiques comme par exemple, en fin de fermentation.

Ces deux duplications de gènes glycolytiques pourraient être le résultat d'une adaptation de *Lactococcus lactis*, probablement par différents mécanismes. En effet, dans l'état actuel de nos connaissances, l'hypothèse la plus probable est que *gap2* serait le résultat d'une duplication relativement récente, alors qu'*enoB* pourrait provenir d'un transfert de gène.

## RÉFÉRENCES

- [1] Bolotin A., Mauger S., Malarne K., Ehrlich S.D., Sorokin A., Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome, *Antonie van Leeuwenhoek* 76 (1999) 27–76.
- [2] Cancilla M.R., Hillier A.J., Davidson B.E., *Lactococcus lactis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, *gap*: further evidence for strongly biased codon usage in glycolytic pathway genes, *Microbiology* 141 (1995) 1027–1036.
- [3] Chambliss G.H., Carbon source-mediated catabolite repression. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, in: Sonenshein A.L., Joch J.A., Losick R. (Eds.), *Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 1993, pp. 213–219.
- [4] Charpentier B., Bardey V., Robas N., Branlant C., The EIIGlc protein is involved in glucose-mediated activation of *Escherichia coli* *gapA* and *gapB*-*pgk* transcription, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 6476–6483.
- [5] Chin C., Brewer J.M., Wold F., The amino acid sequence of yeast enolase, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1377–1384.
- [6] Fillinger S., Boschi-Muller S., Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium, *J. Biol. Chem.* 275 6 (2000) 14031–14037.
- [7] Griffin H.G., MacCormick C.A., Gasson M.J., Cloning, DNA sequence, and regulation of expression of a gene encoding beta-galactosidase from *Lactococcus lactis*, *DNA Seq.* 6 (1996) 337–346.
- [8] Grundy F.J., Waters D.A., Allen S.H.G., Henkin T.M., Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 7348–7355.
- [9] Hidalgo E., Limon A., Aguilar J., A second *Escherichia coli* gene with similarity to *gapA*, *Microbiologia* 12 (1996) 99–106.
- [10] Holland M.J., Holland J.P., Thill G.P., Jackson K.A., The primary structures of two yeast enolase genes. Homology between the 5' noncoding flanking regions of yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1385–1395.
- [11] Hueck C.J., Hillen W., Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria?, *Mol. Microbiol.* 15 (1995) 395–401.
- [12] Luesink E.J., van Herpen R.E.M.A., Grossiord B.P., Kuipers O.P., de Vos W.M., Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA, *Mol. Microbiol.* 30 (1998) 789–798.

- [13] O'Sullivan T., van Sinderen D., Fitzgerald G., Structural and functional analysis of pCI65st, a 6.5 kb plasmid from *Streptococcus thermophilus* NDI-6, *Microbiology* 145 (1999) 127–134.
- [14] Ouzounis C., Bork P., Casari G., Sander C., New protein functions in yeast chromosome VIII, *Protein Sci.* 4 (1995) 2424–2428.
- [15] Saier M.H. Jr., Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria, *Biotechnol. Bioeng.* 58 (1998) 170–174.
- [16] Saier M.H. Jr., Chauvaux S., Cook G.M., Deutscher J., Paulsen I.T., Reizer J., Ye J.J., Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria, *Microbiology* 142 (1996) 217–230.
- [17] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.
- [18] Schnetz K., Rak B., Regulation of the *bgl* operon of *Escherichia coli* by transcriptional antitermination, *EMBO J.* 7 (1988) 3271–3277.
- [19] Seta F.D., Boschi-Muller S., Vignais M.L., Branlant G., Characterization of *Escherichia coli* strains with *gapA* and *gapB* genes deleted, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 5218–5221.
- [20] Tobisch S., Zuhlke D., Bernhardt J., Stulke J., Hecker M., Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 6996–7004.
- [21] Vaughan E.E., Pridmore R.D., Mollet B., Transcriptional regulation and evolution of lactose genes in the galactose-lactose operon of *Lactococcus lactis* NCDO2054, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 4893–4902.