

## Remerciements

---

La réalisation d'une thèse de doctorat est certes un travail personnel mais pas un travail achevé sans aide ni conseils. C'est pourquoi je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes remerciements.

Tout d'abord au professeur Bernard Joris, mon promoteur, pour m'avoir accueillie au Centre d'Ingénierie des protéines et pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire de licence et ma thèse de doctorat au sein de son équipe. Merci Bernard (maintenant je pense pouvoir vous appeler par votre prénom !) de m'avoir fait entrer dans le monde de BlaR. Merci pour vos conseils, votre gentillesse, votre diplomatie et pour la relecture de cette thèse.

Je remercie le FRIA et l'Université de Liège pour m'avoir financé pendant un peu plus de quatre années.

Merci au professeur Eric Goormaghtigh pour m'avoir accueillie pour quelques semaines au sein de son laboratoire afin de me lancer dans la spectroscopie infrarouge. Merci également à Grégory Vernier par ses conseils et sa patience.

Merci à D. Blanot du laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques de l'Université Paris-Sud pour une analyse de la composition en acides aminés et une analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

Merci à K. Devin du Trinity College de Dublin et à M. Hecker de l'Université de Greifswald pour nous avoir fourni les souches de *B. subtilis*.

Un grand merci à Ana pour son suivi, ses conseils et son implication tout au long de ma thèse. Un merci particulier également à Sébastien Rigali pour ses idées, son intérêt et pour m'avoir mise sur la piste d'une certaine autolysine...

Merci à Anne, dite Fafa, pour m'avoir enseigné les « ficelles du métier », pour ta gentillesse, ta bonne humeur mais également pour m'avoir initié à la course à pied, au volley et à l'écologie...

Merci également à toutes les personnes qui m'ont aidée au cours de ces années. J'en oublie certainement, mais je citerais notamment Fabrice et Anne-Marie pour leur conseils sur la purification des protéines, Sapu pour ses conseils surtout au début de ma thèse, Olivier V. pour ses protocoles et conseils, Iris pour la réalisation des gels retards, Nicole pour ses séquençages N-terminaux, ...

Merci à Fabienne et Paola pour leur travail administratif précieux. Merci aux fées du labo, Caro et Iris, qui nous facilitent la vie de tous les jours. Merci à Raphaël, celui qui a toujours ce dont on a besoin caché dans un de ses tiroirs.

Merci à ceux que l'on appelle les « seniors » du CIP pour leurs conseils et leur gentillesse : Dr G. Dive, Dr D. Dehareng, Pr J. Coyette, Dr M. Distèche, Dr. C Duez, Dr A. Brans, Dr M. Galleni, Dr A. Matagne, Dr. P. Charlier.

Je remercie également les occupants permanents ou de passage du 1.25. Ceux qui étaient là au début : Nursel, Gilles, Olivier, Marie, Aurore, Anne P., Serge, Sapu, Valérie, Fafa et Robin, qui m'ont

accueillie et guidée lors de mon mémoire et m'ont donné l'envie de parcourir un bout de chemin dans la recherche. Merci également aux membres de l' « équipe Strepto » (Sébastien R., Séverine, Matthias, Elodie et Sébastien D.) qui ont partagé mon quotidien durant la 2<sup>ème</sup> moitié de ma thèse.

Merci à tous les membres du CIP qui ont partagé mon quotidien au cours de ces années (Delphine, Salvi, JS, Sophie, Natacha, Marylène, Marie-Eve, Olivier J., Nadia, Séverine, Julie, Xavier, Fafa, Sébastien, Alex, Sapu, Renaud, Georgios et les autres...) pour tous les bons moments passés ensemble. Merci aux sportifs d'entre eux pour les séances de volley estivales... Merci à Delphine pour son amitié et nos pauses papotes.

Je remercie également mes parents et ma sœur pour leur soutien et leurs encouragements pendant toutes ces années passées à l'unif. Cette fois Kath, j'ai quitté l'école !

Enfin, merci à toi Bastien, pour ton soutien indispensable, ton implication, tes corrections d'orthographe, ... mais surtout pour la vie que nous partageons...

## Summary

---

In *Bacillus licheniformis* 7491, BlaP  $\beta$ -lactamase is induced by the presence of  $\beta$ -lactam antibiotics outside the cell. The first step in the induction mechanism is the detection of the antibiotic by BlaR1, a membrane-bound penicillin receptor. This protein is composed of two functional domains: a carboxy-terminal domain exposed outside the cell, BlaR-CTD, which acts as a penicillin sensor and an amino-terminal domain anchored into the cytoplasmic membrane, BlaR-NTD, which works as a transducer-transmitter. The acylation of BlaR-CTD by the antibiotic generates an intramolecular signal that leads to the activation of the L3 cytoplasmic loop of the transmitter. The BlaI repressor, which represses  $\beta$ -lactamase production, is then inactivated by a protein relay including the activated L3 loop and the BlaR2 protein, yet to be identified.

The main objectives of our work were to contribute to the understanding of the BlaR1 L3 loop activation mechanism, the identification of the cytoplasmic signal launched by this activated loop and the highlighting of the blaR2 locus.

To highlight the residues that are important for the BlaR1 L3 loop activity, we have generated a multiple sequence alignment of *B. licheniformis* BlaR1 and of the BlaR1 and MecR proteins of *Staphylococcus aureus*. A consensus sequence containing strictly conserved residues was then deduced. The presence of HExxH conserved motif suggests that L3 loop could be a metalloprotease. Site-directed mutagenesis of selected conserved residues postulated to be involved in catalysis or zinc chelation, combined with zinc-blot, Western blot and  $\beta$ -lactamase induction analyses confirmed that the cytoplasmic BlaR1 L3 loop belongs to gluzincin metallopeptidase superfamily and that its cleavage during BlaR1 activation occurs by self-proteolysis. The cleavage site should be included in the K<sup>303</sup>R<sup>↓</sup>R conserved motif, in which « ↓ » indicates the cleaved peptide bond. The RR/AA cleavage site mutant also sheds new light on the BlaR1 intramolecular transduction mechanism. Indeed, in presence of  $\beta$ -lactam antibiotics, the acylation of the mutated BlaR1 receptor results in a slight induction of BlaP  $\beta$ -lactamase production (about 20% of the wild type) but without L3 cleavage. In fact, in this mutant, we have decoupled the L3 activation caused by BlaR-CTD acylation from the one due to L3 selfproteolysis. In this case, the uncleaved L3 loop exhibits a residual activity which seems unable to perform a successful autocleavage but is able to produce a sufficient amount of coactivator to partially inactivate BlaI. This finding is in agreement with a selfproteolysis mechanism in which it is necessary that BlaR-CTD acylation slightly activates L3 loop to allow its own proteolysis and its full activation.

During this work, the production of the membrane-bound protein BlaR1 has been achieved by producing the E<sup>213</sup>A mutant (E<sup>213</sup> is the catalytic residue of the L3 loop) with a StrepTag at its C-terminal extremity. This tag allows a single step purification protocole on a StrepTactin column. A protocol for the reinsertion of the purified BlaR1 protein was also determined.

Production tests of the isolated L3 loop were made. Several protein partners were used to obtain a soluble protein. Best results were obtained with the NusA-L3 fusion protein. Purified NusA-L3 and *B. subtilis* membranes containing BlaR1 were used for studying the L3 loop activity. Any protease activity of the L3 loop could be detected in our experimental conditions.

In the frame of *blaR2* locus study, two different approaches were used. The first one consists of the prediction of genes that could be regulated by BlaI with the PREDEtector software. This prediction allowed to highlight the *BLO1303* gene which codes for a protein named Yoch. EMSA and RT-PRC experiments confirmed that the production of Yoch could be regulated by BlaI. This protein

was produced, purified and its activity was studied. We showed that it has an peptidoglycan autolytic activity.

The second approach consisted in the search for proteins involved with peptidoglycan degradation and able to generate the BlaI pro-coactivator. The BlaI coactivator is  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP dipeptide, as postulated by Amoroso *et al.* (2012). This coactivator could be the result of the clivage of a pro-coactivator by the activated L3 loop. The *ykfABCD* operon encodes four proteins: YkfA, similar to the *E. coli* LdcA L,D-carboxypeptidase; Ykfb, a L-Ala-D/L-Glu isomerase; Ykfc, an endopeptidase and Ykfd, that contains characteristic motifs of ATPase part of ABC transporter. The effect of the inactivation of those genes on the  $\beta$ -lactamase induction was determined. The results showed that inactivation of *ykfA* strongly influences BlaP  $\beta$ -lactamase induction.

By sequence comparison, we were able to exclude the *BL01303* gene and the *ykfABCD* operon as blaR2 candidates. Despite the fact that this locus was not found, our study permitted to propose a completed induction model which includes new implicated proteins.



## Résumé

---

Chez *Bacillus licheniformis* 7491, la  $\beta$ -lactamase BlaP est induite par la présence d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame dans le milieu extérieur. La première étape du mécanisme d'induction est la détection de l'antibiotique par BlaR1, un récepteur de la pénicilline ancré dans la membrane. Cette protéine est composée de deux domaines fonctionnels : un domaine carboxy-terminal exposé à l'extérieur de la cellule, BlaR-CTD, qui agit en tant que senseur de la pénicilline et un domaine amino-terminal ancré dans la membrane cytoplasmique, BlaR-NTD, qui joue le rôle de transducteur-transmetteur. L'acylation de BlaR-CTD par l'antibiotique génère un signal intramoléculaire qui mène à l'activation de la boucle cytoplasmique L3 du transmetteur. Le répresseur Blal, qui réprime la production de  $\beta$ -lactamase, est ensuite inactivé par un relais protéique incluant la boucle L3 activée et la protéine BlaR2, non encore identifiée.

Les principaux objectifs de ce travail étaient de contribuer à la compréhension du mécanisme d'activation de la boucle L3 de BlaR1, à l'identification du signal cytoplasmique lancé par la boucle activée et à l'identification du locus *blaR2*.

Pour identifier les résidus importants pour l'activité de la boucle L3 de BlaR1, nous avons généré un alignement de séquences multiple de BlaR1 de *B. licheniformis* et des protéines BlaR1 et MecR de *Staphylococcus aureus*. Une séquence consensus contenant les résidus strictement conservés en a été déduite. La présence du motif conservé HExxH suggère que la boucle L3 pourrait être une métalloprotéase. La mutagénèse dirigée de résidus conservés pouvant être impliqués dans la catalyse ou la chélation du zinc, combinée avec des analyses de zinc-blot, de Western blot et d'induction de la  $\beta$ -lactamase, a confirmé que la boucle L3 cytoplasmique de BlaR1 appartient à la superfamille des gluzincine et que son clivage durant l'activation de BlaR1 est autoprotéolytique. Le site de clivage devrait être inclus dans le motif conservé  $K^{303}R^{\downarrow}R$ , où « $\downarrow$ » indique la liaison peptidique clivée. Le mutant du site de clivage RR/AA amène également de nouvelles informations sur le mécanisme intramoléculaire de transduction de BlaR1. En effet, en présence d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, l'acylation du récepteur muté a pour résultat une faible induction de la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP (environ 20% de celle obtenue avec le récepteur sauvage) mais sans clivage de la boucle L3. En fait, dans ce mutant, nous avons dissocié l'activation de la boucle L3 causée par l'acylation de BlaR-CTD de celle due à l'autoprotéolyse de la boucle L3. Dans ce mutant, la boucle L3 non clivée possède une activité résiduelle insuffisante pour s'autoprotéolyser mais capable de produire une quantité suffisante de coactivateur pour inactiver partiellement Blal. Ces résultats sont en accord avec un mécanisme d'autoprotéolyse pour lequel il est nécessaire que l'acylation de BlaR-CTD active faiblement la boucle L3 permettant ainsi sa propre protéolyse et son activation complète.

Au cours de ce travail, la production de la protéine membranaire BlaR1 a été réalisée en produisant le mutant E<sup>213</sup>A (E<sup>213</sup> étant le résidu catalytique de la boucle L3) avec une étiquette StrepTag à son extrémité C-terminal. Cette étiquette a permis la purification de la protéine par un protocole simple en une étape sur une colonne StepTactin. Un protocole de réinsertion de la protéine BlaR1 purifiée a également été mis au point.

Des tests de production de la boucle L3 isolée ont été réalisés. Plusieurs partenaires protéiques ont été envisagés afin d'obtenir une protéine soluble. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la

protéine fusion NusA-L3. La protéine NusA-L3 purifiée ainsi que des membranes de *B. subtilis* contenant la protéine BlaR1 ont été utilisées pour l'étude de l'activité de la boucle L3. Aucune activité protéasique de la boucle L3 n'a pu être détectée dans nos conditions expérimentales.

Dans le but d'étudier le locus *blaR2*, deux approches différentes ont été utilisées. La première consiste en une prédiction de gènes qui pourraient être régulés par BlaI avec le programme PREDEtector. Cette prédiction a permis de mettre en évidence le gène *BL01303* qui code pour une protéine nommée YocH. Les expériences de retard de migration électrophorétique et de RT-PCR ont confirmé que la production de YocH pouvait être régulée par BlaI. Cette protéine a été produite, purifiée et son activité a été étudiée. Nous avons montré qu'elle présente une activité autolytique sur le peptidoglycane.

La seconde approche consiste en la recherche de protéines impliquées dans la dégradation du peptidoglycane et capables de générer le pro-coactivateur de BlaI. Le coactivateur de BlaI est le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP, comme proposé par Amoroso *et al.* (2012). Ce coactivateur pourrait être le résultat du clivage d'un pro-coactivateur par la boucle L3 activée. L'opéron *ykfABCD* encode quatre protéines : YkfA, similaire à la L,D-carboxypeptidase LdcA de *E. coli* ; YkfB, une L-Ala-D/L-Glu isomérase ; YkfC, une endopeptidase et YkfD, qui contient les motifs caractéristiques des ATPases d'ABC transporteur. L'effet de l'inactivation de ces gènes sur l'induction de la  $\beta$ -lactamase a été déterminé. Les résultats ont montré que l'inactivation de *ykfA* influence fortement l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP.

Par comparaison de séquences, nous avons pu exclure le gène *BL01303* ainsi que l'opéron *ykfABCD* comme candidat pour *blaR2*. Malgré le fait que ce locus n'ait pas été trouvé, notre étude a permis de proposer un modèle d'induction complété incluant de nouvelles protéines.

## Acides aminés

---

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
	DAP	Acide diaminopimélique
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

## Liste des abréviations

---

A <sup>600</sup> :	absorbance à une longueur d'onde de 600 nm
AA :	acide aminé
Ac :	acide
ADN :	acide désoxyribonucléotidiques
anhMurNAc :	acide N-acétyl anhydromuramique
ARN :	acide ribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
BlaRCTD :	domaine C-terminal de BlaR1
BlaRNTD :	domaine N-terminal de BlaR1
BCIP :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
bp :	paire de bases
BSA :	sérum albumine bovine
°C :	degré celsius
DDM :	dodécyl maltoside
DMF :	diméthyl formamide
dNTP :	désoxyribonucléotide
EDTA :	éthylènediamine tétraacétate
FI :	facteur d'induction
FTIR :	Fourier Transformed Infra-Red
g :	gramme
Glc-NAc :	N-acétylglucosamine
GST :	Glutathione S-transférase
h :	heure
IPTG :	isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside
k <sub>3</sub> :	constante de désacylation
k <sub>2</sub> /K :	constante d'acylation
k <sub>cat</sub> :	constante de vitesse catalytique, turnover de l'enzyme
kb :	kilobase
kDa :	kilodalton
LB :	Luria-Bertani
min :	minute
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
MM :	masse moléculaire
MurNAc :	acétylmuramyl
NaCl :	Chlorure de sodium
NBT :	4-nitrilo blue tetrazolium chloride
nm :	nanometre
NTP :	nucléotides triphosphates
OP :	opérateur
pb :	paires de base
PBP :	peptidoglycan binding protein
PCR :	polymerase chain reaction
PRE :	penicillin recognizing enzyme
rpm :	rotation par minute
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE :	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS :	Tris buffered saline
TFA :	Trifluoroacetic acid

TM :	segments transmembranaires
TNBSA:	Trinitrobenzene sulfonic acid
TTBS :	Tween Tris buffered saline
U :	unité
UDP :	uridine-diphosphate
w/v :	rapport poids/volume
WT :	wild type
X-gal:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside
$\mu$ g:	micro-gramme
$\mu$ l:	micro-litre
$\mu$ m:	micro-mètre

# Table des matières

---

## 1. Introduction

<b>1.1. Structure et mécanisme d'action des <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	1
<b>1.2. Biosynthèse et remodelage du peptidoglycane</b> .....	2
1.2.1. La paroi bactérienne.....	2
1.2.2. La structure du peptidoglycane.....	4
1.2.3. La biosynthèse du peptidoglycane .....	5
1.2.4. Les PBPs.....	8
1.2.5. Dégradation et remodelage du peptidoglycane .....	8
1.2.6. Recyclage du peptidoglycane .....	9
<b>1.3. La résistance des bactéries aux <math>\beta</math>-lactamines</b> .....	12
1.3.1. La modification des PBPs.....	12
1.3.2. La modification de la perméabilité de la membrane externe .....	13
1.3.3. L'inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	13
1.3.3.1. Structure des $\beta$ -lactamases.....	13
1.3.3.2. Mécanisme catalytique des $\beta$ -lactamases et PBPs .....	14
<b>1.4. Mécanismes d'induction de la synthèse des <math>\beta</math>-lactamases</b> .....	16
1.4.1. Induction de la synthèse de $\beta$ -lactamases chez <i>Citrobacter freundii</i> .....	16
1.4.2. Induction de la synthèse de $\beta$ -lactamases chez <i>Aeromonas</i> spp .....	17
1.4.3. Induction de la synthèse des $\beta$ -lactamases chez <i>Streptomyces cacaoi</i> .....	18
1.4.4. Mécanisme d'induction de la $\beta$ -lactamase chez <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus licheniformis</i> . .....	19
<b>1.5. Objectifs du travail</b> .....	27

## 2. Résultats et discussions

<b>2.1. Etude de la transmission du signal de la présence d'antibiotiques par le récepteur BlaR1</b> .....	28
2.1.1. Résidus conservés des domaines N-terminaux des protéines BlaR1 et MecR de <i>B. licheniformis</i> et <i>S. aureus</i> .....	28
2.1.2. Etude de l'activation de BlaR1.....	30
2.1.3. Spécificité de l'acide glutamique catalytique.....	32
2.1.4. Les ligands du zinc.....	33
2.1.5. Discussion.....	34
<b>2.2. Production et purification de la boucle L3 de BlaR1 et du récepteur entier</b> .....	38
2.2.1. Production et purification de la boucle L3 de la protéine BlaR1.....	38
2.2.1.1. Constructions génétiques.....	38
2.2.1.2. Production de la boucle L3 en fusion avec la GST .....	40

2.2.1.3.	Production de la boucle L3 en fusion avec la MBP .....	41
2.2.1.4.	Production de la boucle L3 en fusion avec une StrepTag .....	42
2.2.1.5.	Production de la boucle L3 en fusion avec NusA .....	42
2.2.1.6.	Purification de la protéine fusion NusA-L3.....	43
2.2.2.	Production et purification de la protéine BlaR1.....	45
2.2.2.1.	Constructions génétiques.....	45
2.2.2.2.	Production et purification de BlaR1 avec une StrepTag en fusion C-terminale.....	45
2.2.2.3.	Mutagenèse du site de dégradation de la protéine BlaRSC .....	49
2.2.2.4.	Mutagenèse du site actif ou du site d'activation de la protéine BlaRSC .....	51
2.2.2.4.1.	Mutation du site d'activation .....	52
2.2.2.4.2.	Mutation du site actif .....	52
2.2.3.	Reconstitution du récepteur BlaR1 dans des liposomes.....	53
2.2.4.	Discussion .....	55
<b>2.3.</b>	<b>Etude de l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 de BlaR1 .....</b>	<b>56</b>
2.3.1.	Préparation de membranes de <i>B. subtilis</i> enrichies en BlaR1.....	56
2.3.2.	Test de l'activité de la boucle L3 du récepteur BlaR1 .....	57
2.3.3.	Discussion.....	60
<b>2.4.</b>	<b>Recherche de BlaR2 .....</b>	<b>61</b>
2.4.1.	Identification du gène <i>BL01303</i> en tant que nouveau membre du régulon de Blal chez <i>B. licheniformis</i> .....	61
2.4.1.1.	Création de la matrice de prédiction du régulon Blal.....	61
2.4.1.2.	Analyse de la prédiction du régulon Blal chez <i>B. licheniformis</i> .....	64
2.4.1.2.1.	Détermination de la fiabilité des prédictions .....	64
2.4.1.2.2.	Identification du gène <i>BL01303</i> comme candidat potentiel du régulon Blal.....	65
2.4.1.3.	Blal lie la séquence identifiée en amont du gène <i>BL01303</i> .....	67
2.4.1.4.	Le gène <i>BL01303</i> est réprimé par Blal et induit par les antibiotiques à noyau $\beta$ -lactame.....	68
2.4.1.5.	Discussion .....	69
2.4.2.	Etude de l'autolysine YocH de <i>B. licheniformis</i> .....	72
2.4.2.1.	Comparaison de la séquence du gène <i>BL01303</i> de <i>B. licheniformis</i> 749I avec celle du mutant BlaR2-.....	72
2.4.2.2.	Phénotype du mutant YocH <sup>-</sup> .....	72
2.4.2.3.	Effet de l'inactivation du gène <i>BL01303</i> sur l'induction de la $\beta$ -lactamase BlaP .....	73
2.4.2.5.	Construction de vecteurs pour la production de la protéine YocH .....	75
2.4.2.6.	Production et purification de YocH .....	75
2.4.2.7.	Etude de l'activité de YocH.....	78
2.4.2.7.1.	Analyse de l'activité de YocH par zymogramme.....	78
2.4.2.7.2.	Test de fixation de YocH au peptidoglycane.....	78
2.4.2.7.3.	Analyse par HPLC des produits de la dégradation du peptidoglycane par YocH .....	79
2.4.2.9.	Discussion .....	83
2.4.3.	Etude de l'opéron ykfABCD .....	84

2.4.3.1.	Comparaison de la séquence de l'opéron <i>ykfABCD</i> de <i>B. licheniformis</i> 749I avec celle du mutant <i>BlaR2<sup>-</sup></i> .....	84
2.4.3.2.	Inactivation des gènes de l'opéron <i>ykfABCD</i> chez <i>B. subtilis</i> .....	84
2.4.3.3.	Effet de l'inactivation du gène <i>ykfD</i> sur l'induction de <i>BlaP</i> .....	85
2.4.3.4.	Effet de l'inactivation des gènes de l'opéron <i>ykfABCD</i> sur l'induction de <i>BlaP</i> .....	87
2.4.3.5.	Complémentation du mutant <i>ykfA<sup>-</sup></i> .....	90
2.4.3.6.	Discussion .....	92

### 3. Conclusion et perspectives

#### 4. Matériel et méthodes

<b>4.1.</b>	<b>Souches bactériennes .....</b>	<b>100</b>
<b>4.2.</b>	<b>Vecteurs d'expression et de clonage.....</b>	<b>101</b>
4.2.1.	Le pGEM-T Easy .....	101
4.2.2.	Les vecteurs d'expression pET.....	101
4.2.3.	Le pGEX-5X-1 .....	103
4.2.4.	Le pMAL-c2x.....	104
4.2.5.	Le pDML995 .....	104
4.2.6.	Le pDML2523 .....	105
4.2.7.	Le pDML1549 .....	105
<b>4.3.</b>	<b>Milieux de culture.....</b>	<b>105</b>
<b>4.4.</b>	<b>Les antibiotiques .....</b>	<b>106</b>
<b>4.5.</b>	<b>Les enzymes.....</b>	<b>106</b>
<b>4.6.</b>	<b>Les marqueurs de taille.....</b>	<b>107</b>
<b>4.7.</b>	<b>Les oligonucléotides synthétiques .....</b>	<b>108</b>
4.7.1.	Oligonucléotides utilisés pour l'amplification de la boucle L3 de <i>BlaR1</i> .....	108
4.7.2.	Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le séquençage du gène <i>blaR1</i> .....	108
4.7.3.	Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du gène <i>blaR1</i> .....	108
4.7.4.	Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de l'opéron <i>ykfABCD</i> de <i>B. licheniformis</i> . .....	109
4.7.5.	Oligonucléotides utilisés pour l'inactivation des gènes de l'opéron <i>ykfABCD</i> de <i>B. subtilis</i> .....	109
4.7.6.	Oligonucléotides utilisés lors des expériences de RT-PCR sur de l'ARN total de <i>B. licheniformis</i> . .....	110
4.7.7.	Oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard de migration électrophorétique de l'opérateur présent en amont du gène <i>BL01303</i> .....	111
4.7.8.	Oligonucléotides utilisés pour le séquençage et l'amplification du gène <i>BL01303</i> .....	111
<b>4.8.</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>111</b>
4.8.1.	Electrophorèse en gel d'agarose .....	111
4.8.2.	Purification des fragments d'ADN .....	111
4.8.3.	Extraction et purification de l'ADN plasmidien .....	112



4.8.4.	Extraction et purification de l'ADN génomique .....	112
4.8.5.	Mesure de la concentration en ADN .....	112
4.8.6.	Ligation .....	112
4.8.7.	Technique de Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	112
4.8.8.	Mutagenèse dirigée .....	113
4.8.9.	Séquençage de séquence nucléotidique .....	113
4.8.10.	Isolement et purification des ARN totaux de <i>B. licheniformis</i> .....	114
4.8.11.	RT-PCR .....	114
4.8.12.	Préparation de cellules compétentes et transformation d' <i>E. coli</i> .....	114
4.8.13.	Préparation de cellules compétentes et transformation de <i>B. subtilis</i> .....	115
<b>4.9.</b>	<b>Techniques d'analyse des protéines .....</b>	<b>115</b>
4.9.1.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	115
4.9.2.	Test d'acylation .....	116
4.9.3.	Production et purification des anticorps dirigés contre BlaR-CTD .....	116
4.9.4.	Immunodétection (Western blotting) .....	117
4.9.5.	Séquençage NH2 terminal .....	117
4.9.6.	Dosage des protéines par la méthode au BCA (Pierce) .....	117
4.9.7.	Fractionnement cellulaire .....	118
4.9.8.	Purification de protéines par IMAC (« Immobilized Metal Affinity Chromatography ») .....	118
4.9.9.	Purification de protéines sur colonne StrepTactin .....	119
4.9.10.	Induction des souches de <i>B. subtilis</i> et dosage de l'activité $\beta$ -lactamasique .....	119
<b>4.10.</b>	<b>Reconstitution de la protéine BlaRE213D dans des liposomes .....</b>	<b>120</b>
<b>4.11.</b>	<b>Test d'activité de la boucle L3 de BlaR1 .....</b>	<b>121</b>
<b>4.12.</b>	<b>Préparation des membranes de <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>121</b>
<b>4.13.</b>	<b>Analyse par gel retard ou « EMSA » (electrophoretic migration shift assay) .....</b>	<b>121</b>
<b>4.14.</b>	<b>Test d'autolyse cellulaire .....</b>	<b>122</b>
<b>4.15.</b>	<b>Préparation de peptidoglycane de <i>B. licheniformis</i> purifié .....</b>	<b>122</b>
<b>4.16.</b>	<b>Test de fixation d'une protéine sur du peptidoglycane purifié de <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>4.17.</b>	<b>Etude de l'activité de Yoch par zymogramme .....</b>	<b>123</b>
<b>4.18.</b>	<b>Analyse par HPLC de la dégradation du peptidoglycane .....</b>	<b>123</b>
<b>4.19.</b>	<b>Outils bioinformatiques .....</b>	<b>124</b>
<b>4.20.</b>	<b>PREDetector .....</b>	<b>124</b>

## 5. Références

## 6. Annexes

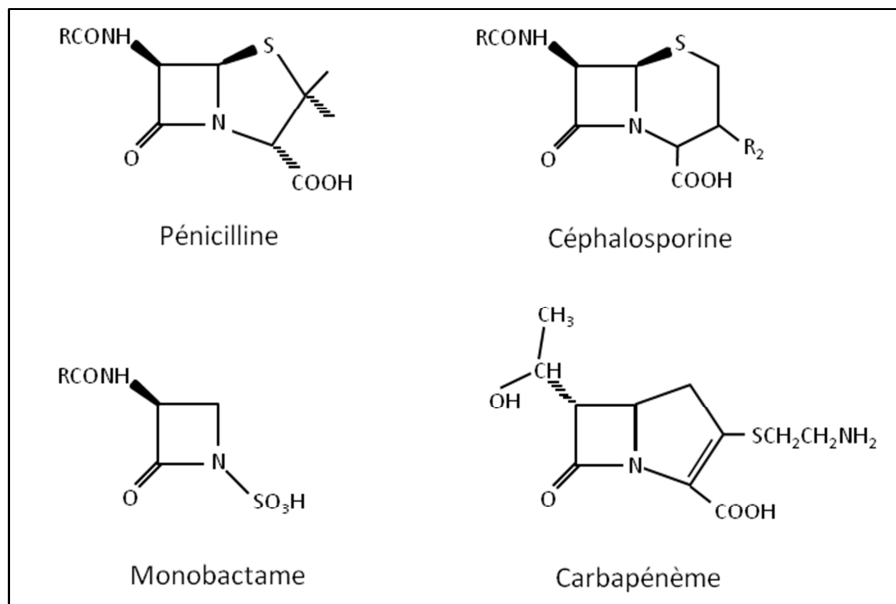
La découverte des antibiotiques au début du XXe siècle, a ouvert une voie dans la lutte contre les maladies infectieuses. Le premier antibiotique a été mis en évidence par Sir A. Fleming qui s'aperçut que certaines de ses cultures bactériennes dans des boîtes de Petri oubliées, avaient été contaminées par les expériences de son voisin de paillasse qui travaillait avec un champignon : le *Penicillium notatum*. Cette moisissure produisait la pénicilline, un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame ou  $\beta$ -lactamine. Depuis son identification, de nombreux antibiotiques de cette famille ont été isolés ou produits sous forme de composés semi-synthétiques (Kidwai *et al.*, 1999). Les  $\beta$ -lactamines sont largement utilisées, en raison de leur activité antibactérienne élevée et de leur absence presque totale d'effet secondaire pour les cellules eucaryotes.

Malheureusement, l'usage intensif de cette famille d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a eu pour conséquence la sélection de souches bactériennes capables de résister à leur action. Les bactéries acquièrent cette propriété lors de mutations spontanées ou d'échanges de matériel génétique.

Le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines le plus répandu est la production d'une enzyme extracellulaire capable d'hydrolyser l'antibiotique et appelée  $\beta$ -lactamase. Chez *Bacillus licheniformis*, la présence de  $\beta$ -lactamines dans le milieu extérieur induit la production d'une  $\beta$ -lactamase nommée BlaP. Cette faculté d'induction permet à la bactérie une économie d'énergie par rapport à un système constitutif. Ce processus complexe implique plusieurs protéines permettant la détection de la présence de l'antibiotique dans le milieu extérieur, la transmission de cette information à l'intérieur de la cellule et enfin la dérégulation du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase. Ce mécanisme d'induction est apparenté à ceux de la  $\beta$ -lactamase BlaZ et de la Penicillin-binding protein 2a (PBP2a) chez *Staphylococcus aureus*, une bactérie pathogène responsable de nombreuses infections nosocomiales (Hackbarth & Chambers, 1993).

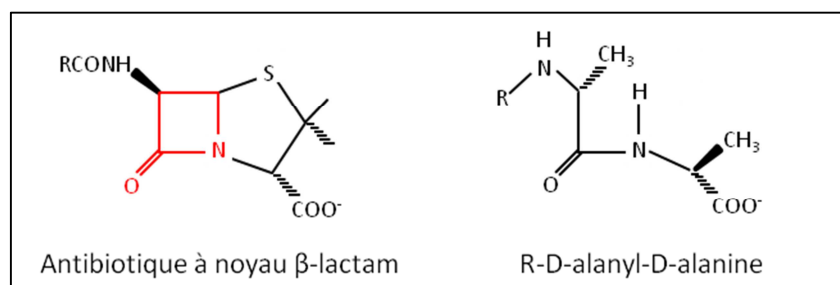
### 1.1. Structure et mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

D'un point de vue chimique, les  $\beta$ -lactamines sont des antibiotiques ayant en commun la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame à quatre pièces contenant une liaison amide tendue qui est plus réactionnelle qu'une fonction amide classique. Du point de vue de leur activité biologique, les  $\beta$ -lactamines possèdent une action inhibitrice sur la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries. En fonction de l'hétérocycle associé au noyau  $\beta$ -lactame, on distingue différentes familles de  $\beta$ -lactamines (Figure 1.1). Dans le cas des pénicillines et des céphalosporines, le noyau est fusionné respectivement à un cycle thiazolidine et un cycle dihydrothiazine. Les monobactames ne possèdent que le seul cycle  $\beta$ -lactame et portent un groupement sulfonate au lieu du COOH présent chez les pénicillines et les céphalosporines. Selon les  $\beta$ -lactamines, la modification d'une ou de plusieurs chaînes latérales permet de varier le spectre d'action de ces antibiotiques. Cette propriété a permis de répondre à l'apparition de souches résistantes aux premiers antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame utilisés en médecine humaine.



**Figure 1.1.** Principales familles d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame ou  $\beta$ -lactamines. R : chaîne latérale variable.

Les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame sont des analogues structuraux du dipeptide D-Alanyl-D-Alanine (D-Ala-D-Ala), présent à l'extrémité C-terminale du substrat naturel des DD-peptidases (Figure 1.2). Ces enzymes, aussi appelées PBPs (pour *Penicillin-Binding-Proteins*) sont impliquées dans la formation du peptidoglycane qui est le composant majeur de la paroi bactérienne. Ainsi, en se liant de manière covalente au site actif de ces enzymes, les  $\beta$ -lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane (Ghuysen & Goffin, 1999).



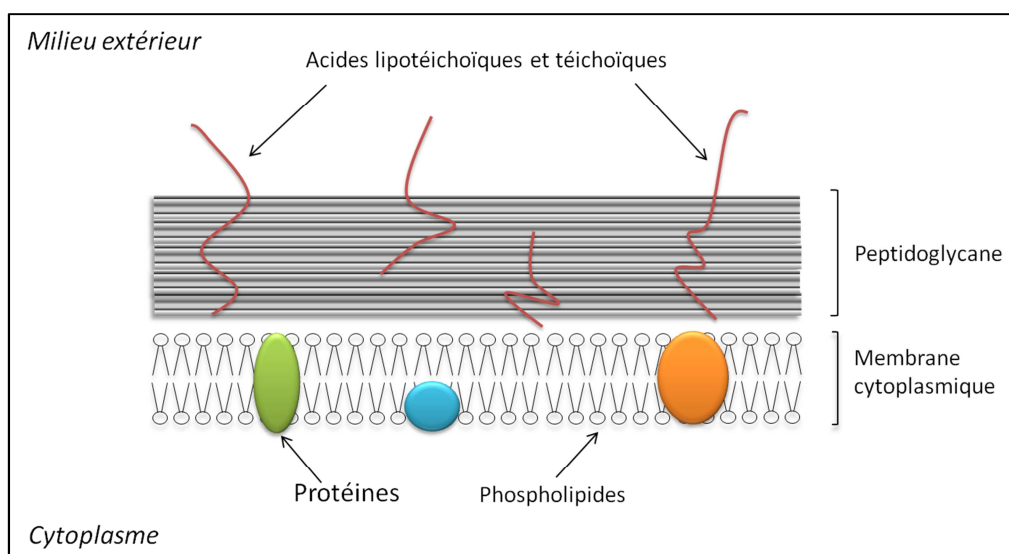
**Figure 1.2.** Analogie de structure entre un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame et le substrat des DD-peptidase, le peptide R-D-alanyl-D-alanine.

## 1.2. Biosynthèse et remodelage du peptidoglycane

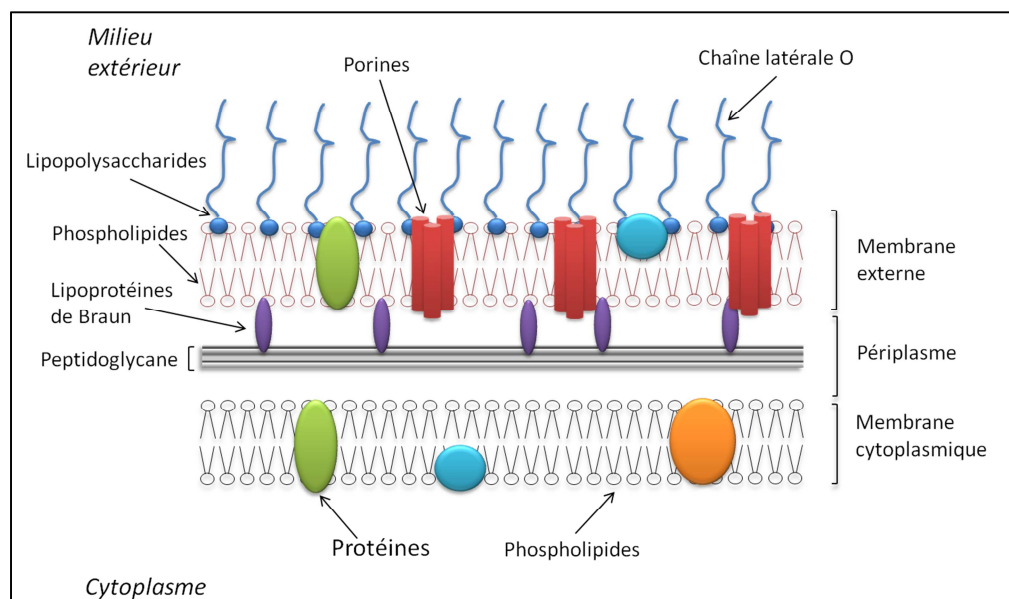
### 1.2.1. La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide qui entoure la membrane plasmique de toutes les bactéries sauf les Mycoplasmes. Elle détermine la morphologie de la cellule et lui permet de résister à sa forte pression osmotique interne. La paroi est également le site cible de nombreux antibiotiques.

On peut classer les bactéries en deux grands groupes en fonction de la réactivité de leur paroi au colorant de Gram : les bactéries Gram-positives, qui conservent la coloration violette et les Gram-négatives qui la perdent (Prescott L.M., 1995). La paroi cellulaire des bactéries Gram-positives (Figure 1.3) est formée d'une couche homogène de peptidoglycane, épaisse de 20 à 80 nm, comprenant également une grande quantité d'acides teichoïques. Les bactéries Gram-négatives, quant à elles, ont une paroi beaucoup plus complexe (Figure 1.4). Le peptidoglycane est présent sous forme d'une couche mince (1 à 3 nm) et peu dense. La cellule est entourée d'une membrane externe de 7 à 8 nm, une bicouche lipidique constituée d'une couche interne de phospholipides et d'une couche externe de lipopolysaccharides. On retrouve également, enchâssées dans cette membrane, des protéines appelées porines, qui lui assurent une perméabilité relative. L'espace situé entre les membranes plasmique et externe et comprenant le peptidoglycane est appelé le périplasma (Prescott L.M., 1995).



**Figure 1.3.** La paroi d'une bactérie à Gram positif.

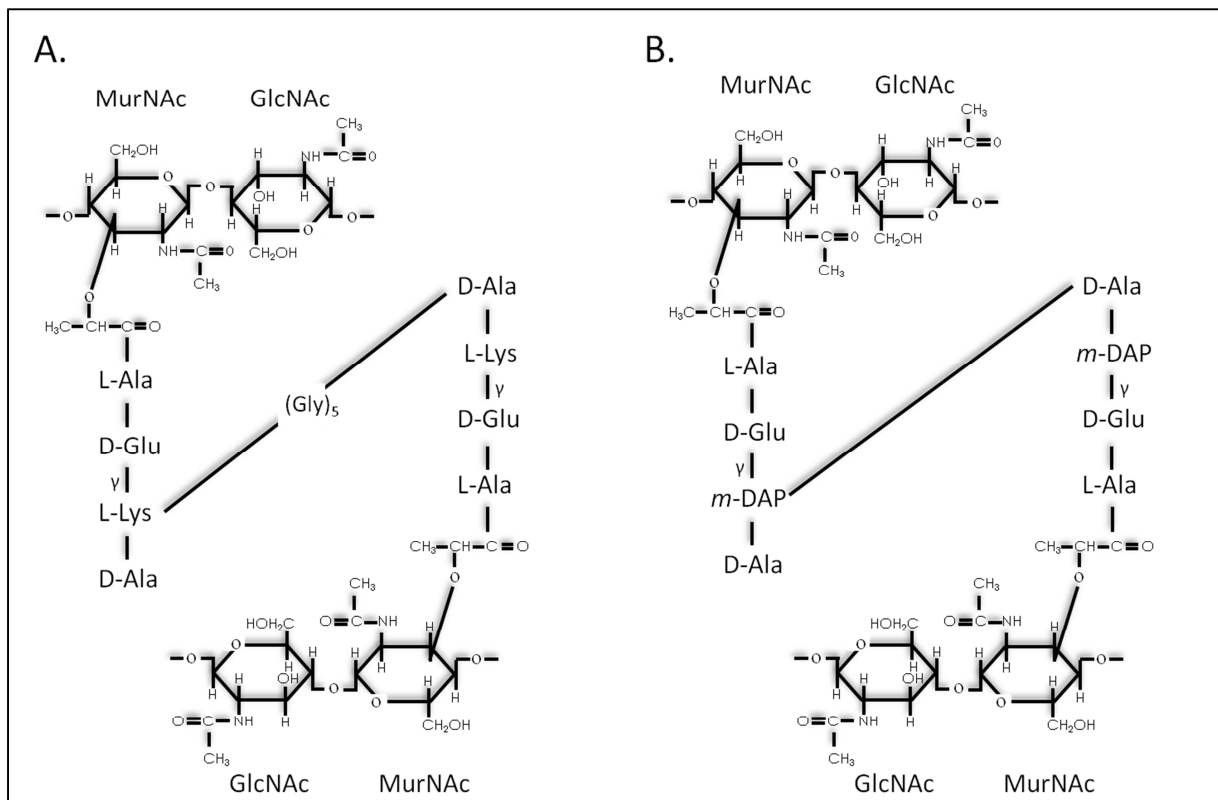


**Figure 1.4.** La paroi d'une bactérie à Gram négatif.

### 1.2.2. La structure du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un hétéropolymère constitué de chaînes de glycane reliées entre elles par de courts peptides (figure 1.5). La chaîne de glycane est composée de disaccharides de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et de son éther lactyle : l'acide N-acétylmuranique (MurNAc) reliés entre eux par une liaison  $\beta$ -1,4. Chaque disaccharide porte un tétrapeptide lié au groupement lactyle du MurNAc et constitué d'une alternance d'acides aminés de configuration L et D. Le premier acide aminé est toujours une L-alanine (L-Ala) et le deuxième, un acide D-glutamique (D-Glu). En troisième position, on retrouve un acide diaminé, soit la L-lysine ou l'acide diaminopimélique en configuration *méso* ou L,L (*m*-DAP ou L,L-DAP) selon les espèces. Cet acide diaminé est lié au précédent via une liaison  $\gamma$ , c'est-à-dire entre le carbone  $\gamma$  de la chaîne latérale du D-Glu et le carbone  $\alpha$  de l'acide diaminé. Le tétrapeptide se termine par une D-alanine. La fonction amine libre du troisième résidu d'un tétrapeptide est reliée par une liaison amide à l'extrémité carboxylique d'un tétrapeptide d'une chaîne de glycane voisine. Dans le peptidoglycane de certaines bactéries, un pont interpeptidique relie la fonction amine libre du résidu diaminé à la fonction carboxylique du tétrapeptide situé sur une chaîne de glycane adjacente.

Il est à noter que l'acide D-glutamique, la D-alanine et l'acide diaminopimélique sont spécifiques au peptidoglycane et ne sont pas présents dans les protéines.



**Figure 1.5.** Structure du peptidoglycane chez *S. aureus* (A) et chez *E. coli* (B). La structure du peptidoglycane des bactéries du genre *Bacillus* est identique à celle d'*E. coli*. Chez *S. aureus*, un pont pentaglycine relie les deux tétrapeptides présents sur deux chaînes de glycane voisines.

### 1.2.3. La biosynthèse du peptidoglycane

La biosynthèse du peptidoglycane se déroule en une série de réactions complexes qui se produisent dans les trois compartiments cellulaires (van Heijenoort, 1998). La première étape se déroule dans le cytoplasme et correspond à la biosynthèse du précurseur soluble du peptidoglycane. Celui-ci est transporté à l'extérieur de la cellule via un transporteur lipidique inséré dans la membrane cytoplasmique. L'assemblage du peptidoglycane est ensuite réalisé à la surface externe de la membrane cytoplasmique (Green, 2002, van Heijenoort, 2001, van Heijenoort, 2007).

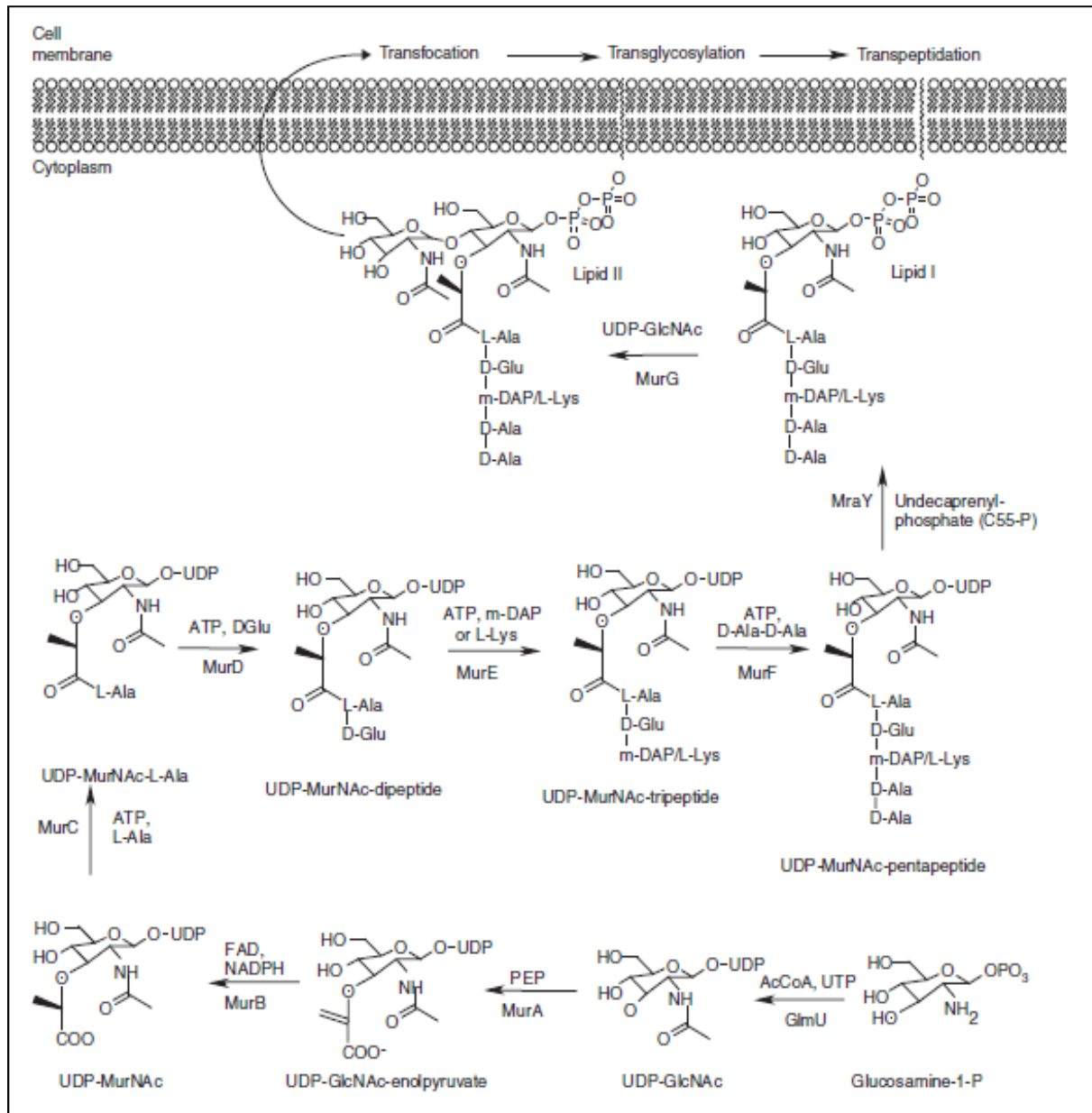
- La phase cytoplasmique :

Cette phase permet la synthèse de deux précurseurs nucléotidiques du peptidoglycane: l'uridine-diphosphate-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et l'uridine-diphosphate-N-acétylmuramique-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide) (figure 1.6).

La première étape est la production de l'UDP-GlcNAc grâce à l'enzyme GlmU à partir de glucosamine-1-phosphate. Cette réaction implique le transfert des groupements acétyle et uridyle utilisant respectivement l'acétyl coenzyme A (AcCoA) et l'uridine triphosphate (UTP).

Les 2 étapes de synthèse suivantes convertissent l'UDP-GlcNAc en UDP-MurNAc. L'UDP-GlcNAc-énolpyruvate est d'abord synthétisé par l'enzyme MurA, une UDP-GlcNAc énoylpyruvyltransférase, et est ensuite converti en UDP-MurNAc grâce à l'enzyme MurB, une UDP-N-acétylénolpyruvyl-glucosamine réductase.

Les acides aminés L-Ala, D-Glu, *m*-DAP ou L-Lys et le dipeptide D-Alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) sont ensuite additionnés séquentiellement sur le groupement D-lactyle de l'UDP-MurNAc grâce à différentes ligases spécifiques (MurC, D, E et F). Ces réactions utilisent de l'énergie sous forme d'ATP. Il faut noter que l'enzyme MurE utilise la fonction carboxylate  $\gamma$  du résidu D-Glu plutôt que celle localisée en  $\alpha$ . De plus, c'est cette enzyme qui impose la spécificité de l'acide diaminé. Ainsi, chez *S. aureus* et *S. pneumoniae*, c'est la L-Lys qui est utilisée alors que chez *E. coli* et *B. subtilis*, MurE ajoute l'acide *m*-DAP.



**Figure 1.6.** Schéma de la biosynthèse du peptidoglycane (Green, 2002). Les enzymes, substrats, produits et cofacteurs utilisés pour la biosynthèse du peptidoglycane sont décrits dans le texte.

- La phase membranaire :

Cette étape de biosynthèse se déroule au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique. Le groupement phospho-MurNAc-pentapeptide est tout d'abord transféré du précurseur nucléotidique, l'UDP-MurNAc pentapeptide, sur le phosphate d'un transporteur lipidique membranaire, l'undécaprénylphosphate, grâce à l'enzyme MraY. Le composé formé lors de cette réaction est l'undécaprénylpyrophosphate-MurNAc-pentapeptide, également appelé Lipide I.

Ensuite, le GlcNAc de l'UDP-GlcNAc est, à son tour, transféré par la protéine MurG sur l'UDP-PP-MurNAc-pentapeptide via une liaison glycosidique  $\beta$ -1,4. Cette réaction permet la formation du

précurseur lipidique du peptidoglycane, l'undécaprényl-pyrophosphate-disaccharide-pentapeptide ou lipide II.

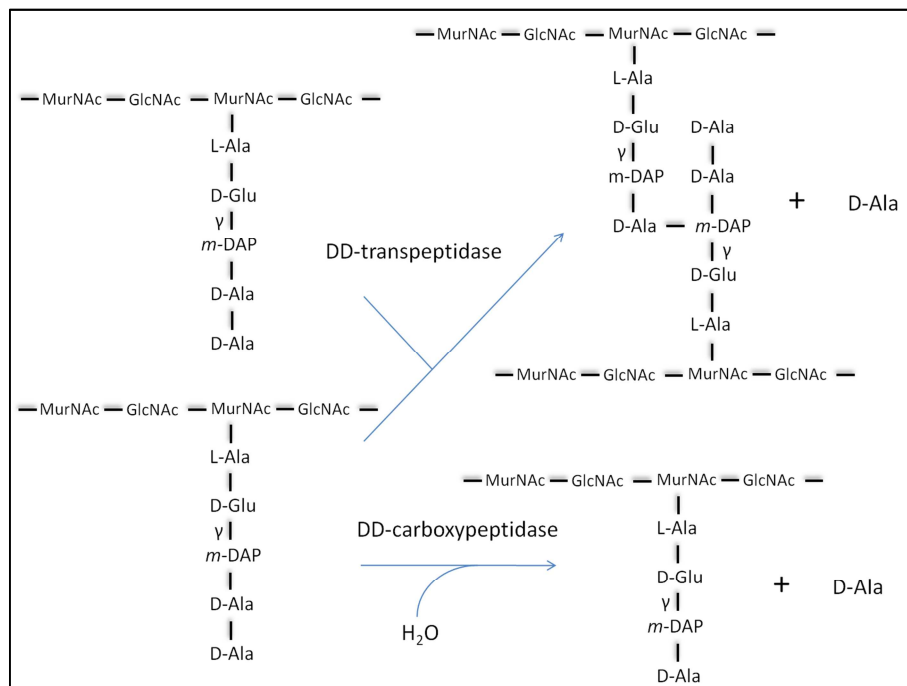
Les acides aminés intervenant dans le pont interpeptidique sont ajoutés à ce stade. Chez *S. aureus*, la fonction amine libre de la L-lysine du pentapeptide du lipide II est substituée par un peptide pentaglycine grâce aux peptidyle-transférases de la famille FemABX (Rohrer & Berger-Bachi, 2003).

Finalement, le lipide II est transporté à la face externe de la membrane cytoplasmique par un mécanisme encore inconnu mais utilisant la protéine FtsW (Mohammadi *et al.*, 2011).

- La phase extracellulaire :

Lors de cette dernière étape, les chaînes de glycanes sont polymérisées par des glycosyl-transférases qui utilisent le lipide II comme substrat. Lors de cette réaction de transglycosylation, la sous-unité disaccharide-pentapeptide du lipide II est transférée à l'extrémité d'une chaîne de glycane naissante (figure 1.7). Ensuite, les DD-transpeptidases permettent la réticulation du peptidoglycane, c'est-à-dire la formation de ponts interpeptidiques entre deux chaînes de glycane voisines. Cette réaction, appelée transpeptidation, débute par l'hydrolyse du lien peptidique entre les résidus D-Ala<sub>4</sub>-D-Ala<sub>5</sub>, libérant la fonction carboxilique du D-Ala<sub>4</sub>. Ce groupement carboxyl est ensuite transféré sur une amine libre, soit celle de l'acide diaminé d'un pentapeptide porté par une chaîne de glycane voisine, soit celle du pont interpeptidique qui le substitue (Goffin & Ghuysen, 1998).

La réticulation du peptidoglycane serait limitée par l'action des DD-carboxypeptidases qui clivent le lien entre les deux résidus D-Ala d'un pentapeptide et ainsi diminueraient le nombre de pentapeptides disponibles pour la réaction de transpeptidation (figure 1.7).



**Figure 1.7.** Représentation des réactions de transpeptidation et carboxypeptidation chez *E. coli*.



#### 1.2.4. Les PBPs

Les DD-transpeptidases et les DD-carboxypeptidases sont des enzymes à sérine ayant une activité acyl-transférase. Elles sont regroupées dans la famille des DD-peptidases. Ces enzymes sont inhibées par les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame. En effet, les  $\beta$ -lactamines sont des analogues structuraux du dipeptide D-Ala-D-Ala, le substrat naturel des DD-peptidases (cf §1.1). Ces antibiotiques sont ainsi capables de se lier de manière covalente au niveau de la sérine active (Frère *et al.*, 1976).

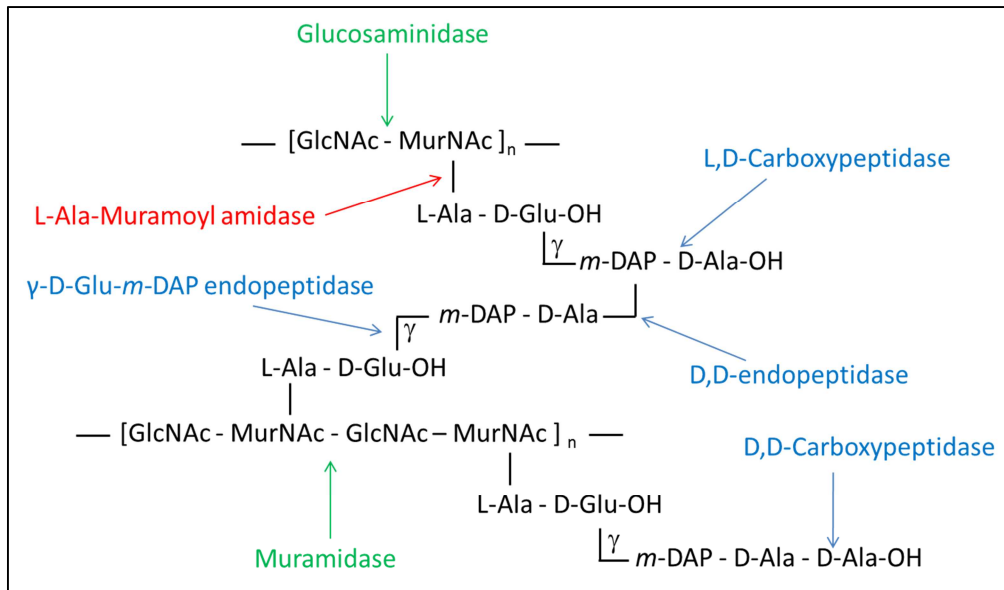
Pour leur capacité à lier la pénicilline, les DD-peptidases sont également appelées PBPs pour Penicillin-Binding Proteins. Ils peuvent être regroupés en deux catégories principales : les PBPs de haut poids moléculaire (HMM) et ceux de faible poids moléculaire (LMM) (Sauvage *et al.*, 2008) (Goffin & Ghuysen, 1998).

Les PBPs de haut poids moléculaire sont multimodulaires et participent à la polymerization du peptidoglycane et à son insertion dans la paroi cellulaire pré-existante. Ils sont composés d'une extrémité cytoplasmique, d'un segment transmembranaire d'ancrage et de deux domaines localisés à la surface externe de la membrane cytoplasmique, là où se déroule l'assemblage final du peptidoglycane. Sur base de leur structure et de l'activité catalytique du domaine N-terminal, les PBPs de haut poids moléculaire peuvent être subdivisés en deux classes : A et B. Le domaine C-terminal de tous les PBPs de haut poids moléculaire possède une activité transpeptidasique. Le domaine N-terminale des PBPs de la classe A est responsable de leur activité de glycosyltransférase alors que celui des PBPs de la classe B pourrait jouer un rôle dans la morphogénèse des cellules ou dans la division cellulaire.

Les PBPs de faible poids moléculaire sont des enzymes monofonctionnelles qui possèdent un seul domaine DD-peptidase (DD-carboxypeptidase) et sont insérés dans la membrane cytoplasmique via un peptide d'ancrage C-terminal. Ces PBPs sont généralement référencés comme ceux de classe C.

#### 1.2.5. Dégradation et remodelage du peptidoglycane

Au cours du cycle cellulaire, le peptidoglycane doit être perpétuellement remodelé pour permettre à la fois le développement de la bactérie et la division cellulaire. Il doit donc subir des remaniements constants qui ne peuvent pas altérer ses propriétés mécaniques. La bactérie possède donc un système autolytique constitué d'enzymes capables de remanier le peptidoglycane (figure 1.8). *E. coli*, par exemple, dégrade le réseau de peptidoglycane à l'aide de trois classes d'enzymes capables de couper les liaisons du peptidoglycane : les peptidases, les amidases et les glucosaminidases et transglycosylases lytiques (Park & Uehara, 2008). Les peptidases clivent les liaisons peptidiques alors que les amidases clivent la liaison entre le peptide et le MurNAc. Les trois principales amidases sont AmiA, AmiB et AmiC. Elles sont localisées dans le périplasme. Une quatrième amidase, AmiD, présente dans la membrane externe, a été récemment identifiée (Uehara & Park, 2007, Pennartz *et al.*, 2009). Les transglycosylases lytiques clivent la liaison osidique qui lie le MurNAc au GluNAc (Holtje *et al.*, 1975). La transglycosylase principale est SltY, une enzyme soluble du périplasme.



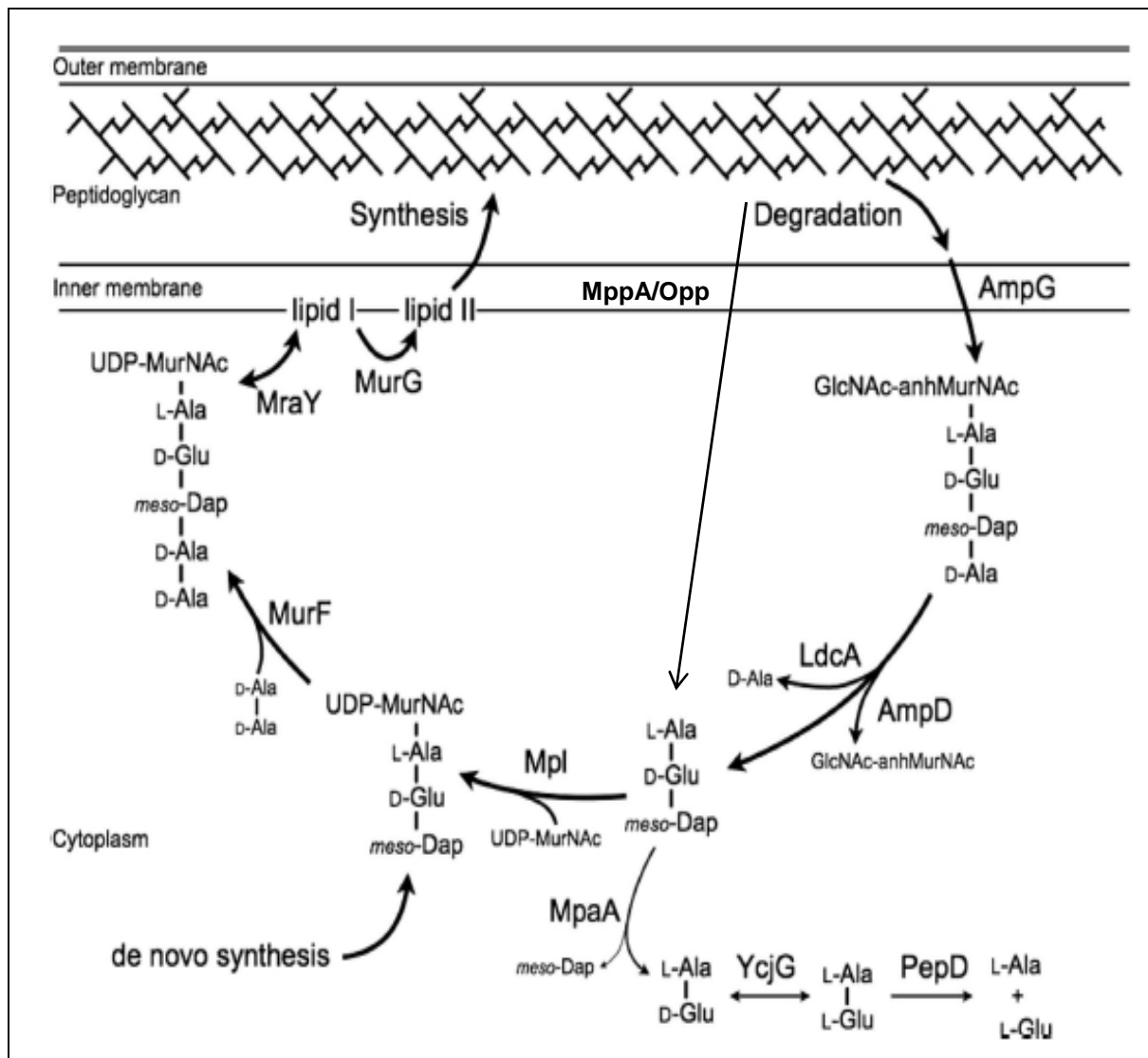
**Figure 1.8.** Représentation schématique des activités enzymatiques intervenant dans la dégradation du peptidoglycane. On trouve les trois grandes classes d'enzymes lytiques : les peptidases (en bleu), les amidases (en rouge) et les glucosaminidases (en vert).

### 1.2.6. Recyclage du peptidoglycane

Le recyclage du peptidoglycane d'*E. coli* débute par l'action des transglycosylases et des endopeptidases périplasmiques. Les produits de dégradation sont ensuite importés dans le cytoplasme par les transporteurs AmpG et MurP (Park & Uehara, 2008). La perméase AmpG transporte spécifiquement le disaccharide GlcNAc-anhMurNAC lié ou non au peptide. La muuropeptide perméase MurP est impliqué dans le transport du MurNAC et de l'anhydro-MurNAC.

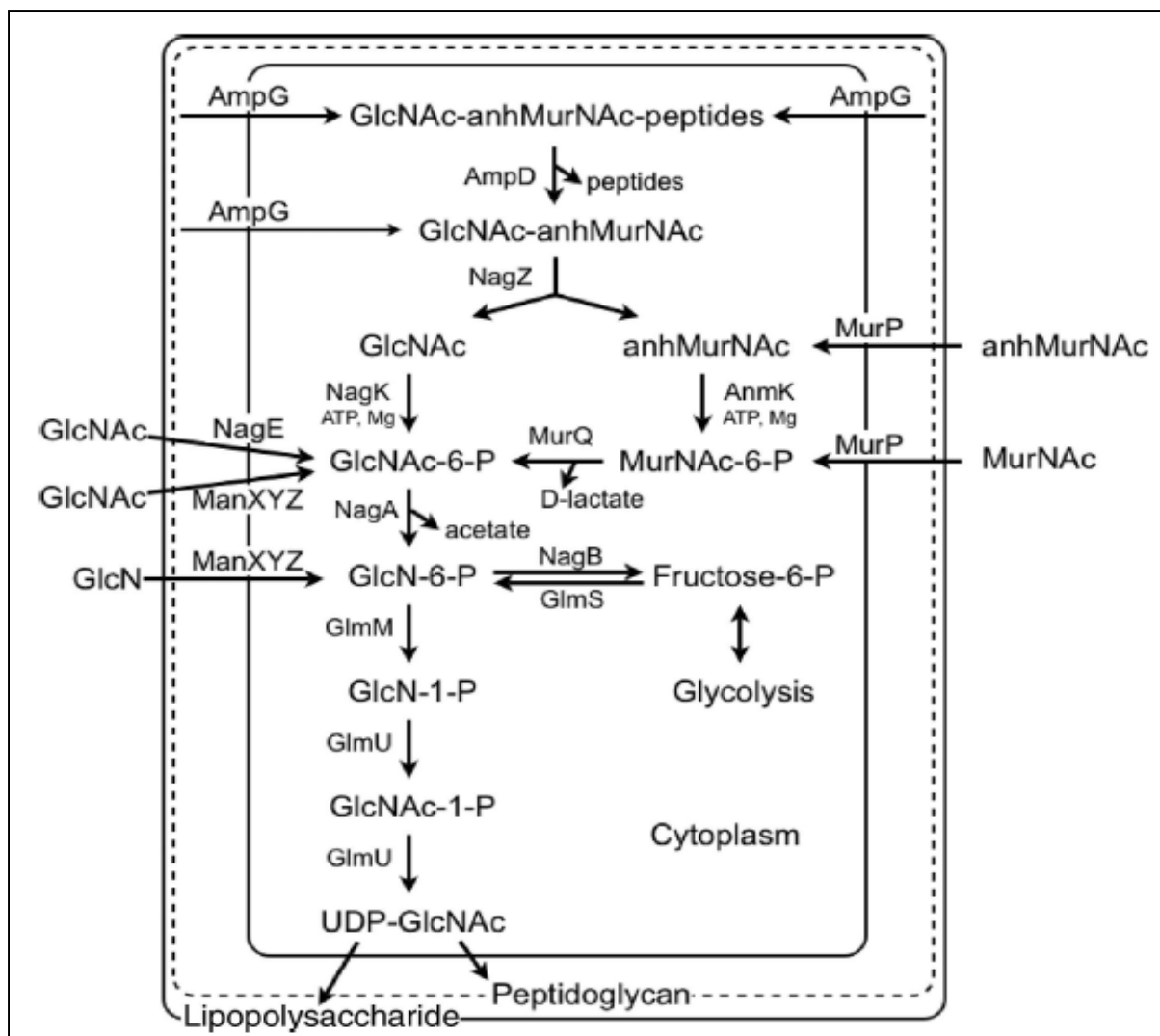
Les amidases périplasmiques vont générer des tri-, tetra- et pentapeptides qui vont diffuser en dehors de la cellule ou être transportés dans le cytoplasme via le système MppA-OppBCDF. MppA est une protéine périplasmique qui est requise dans la capture des muro-tripeptides (Park *et al.*, 1998), tandis que OppBCDF sont les composants d'un transporteur d'oligopeptides ATP-dépendant (Pearce *et al.*, 1992).

Une fois dans le cytoplasme, la carboxypeptidase LdcA va cliver la D-Ala du tetrapeptide pour former un MurNAC-tripeptide (Templin *et al.*, 1999) (figure 1.9). AmpD, une anhydro-N-acétylmuramyl-L-Ala amidase, va, quant à elle, libérer le peptide en clivant la liaison anhMurNAC-L-Ala (Jacobs *et al.*, 1995). Le peptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-m-DAP peut être utilisé par la ligase Mpl pour former de l'UDP-MurNAC-tripeptide et ainsi être directement réutilisé pour la synthèse de peptidoglycane (Goodell, 1985). Il peut également être détourné vers une voie où l'amidase MpaA et l'épimérase du L-Ala-D/L-Glu (YcjG) vont libérer les acides aminés du peptide sous forme simple pour les réutiliser.



**Figure 1.9.** Voie de recyclage des acides aminés du peptidoglycane chez *E. coli* (Park & Uehara, 2008).

En parallèle, le disaccharide GlcNAc-anhMurNAc est également recyclé (figure 1.10). Une  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, NagZ chez *E. coli*, libère le GlcNAc et le MurNAc qui sont ensuite tous deux convertis en GlcNAc-6-phosphate qui est utilisé soit pour former de l'UDP-GlcNAc, soit dans la voie de la glycolyse (Cheng *et al.*, 2000).



**Figure 1.10.** Voie de recyclage des sucres du peptidoglycane chez *E. coli* (Park & Uehara, 2008).

Bien que *B. subtilis* ne possède pas la perméase AmpG, on y retrouve notamment des orthologues de NagZ (YbbD), MurQ (YbbI), MurP (YbbF), LdcA (YkfA), MpaA (YqgT) et YcjG (YkfB) (Park & Uehara, 2008) (table 1.1). Le peptidoglycane pourrait donc être clivé par une muramidase et une amidase pour produire le disaccharide GlcNAc-anhMurNAc et des peptides. Le GlcNAc-anhMurNAc pourrait être clivé par YbbD (NagZ), qui semble être exporté par une séquence signal putative. Le GlcNAc est importé dans le cytoplasme par un système de phosphotransférase spécifique, Ykff (NagP), et métabolisé par NagA et NagB. Le MurNAc serait, quant à lui, phosphorylé et importé dans le cytoplasme par YbbF (MurP) pour produire le MurNAc-6-P qui est ensuite converti en GlcNAc-6-P par YbbI (MurQ) (Litzinger *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que les orthologues de NagZ, MurQ et MurP (YbbD, YbbI et YbbF) sont encodés par les gènes faisant partie d'un opéron qui contient également un gène qui pourrait coder pour une  $\beta$ -lactamase putative. Les peptides libres seraient importés dans le cytoplasme via une perméase inconnue et pourraient être dégradés par YkfA (LdcA), YkfB (YcjG) et YkfC (une  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP amidase). Ces protéines sont codées par des gènes situés en aval de l'opéron *dpp* (dipeptide perméase). Ainsi, bien que le recyclage du peptidoglycane à proprement dit n'ait jamais été observé chez les bactéries à Gram positif, il est possible que des fragments de peptidoglycane puissent entrer dans la cellule par l'intermédiaire des oligopeptides perméases.

**Table 1.1.** Enzymes impliquées dans le recyclage du peptidoglycane chez *E. coli* et leur orthologue chez *B. subtilis*. L'activité de ces enzymes est détaillée dans le texte.

Gènes ( <i>E. coli</i> )	Orthologues chez <i>B. subtilis</i>	Activité	Localisation
<i>ampG</i>		GlcNAc-anhMurNAc perméase	Membrane interne
<i>murP</i>	<i>ybbF</i>	Muropeptide perméase	Membrane interne
<i>ampD</i>		anhMurNAc-L-Ala amidase	Cytoplasme
<i>Mpl (yjfG)</i>		UDP-MurNAc:L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-DAP ligase	Cytoplasme
<i>ldcA (f304 gene)</i>	<i>ykfA</i>	LD-Carboxypeptidase	Cytoplasme
<i>mpaA (ycjI)</i>	<i>yqgT</i>	$\gamma$ -D-Glu-DAP amidase	Cytoplasme
<i>ycjG</i>	<i>ykfB</i>	L-Ala-D/L-Glu épimérase	Cytoplasme
<i>nagZ (ycfO)</i>	<i>YbbD</i>	$\beta$ -N –Acetylglucosaminidase	Cytoplasme
<i>nagA</i>	<i>nagA</i>	GlcNAc kinase	Cytoplasme
<i>nagK (ycfX)</i>	<i>argB</i>	anhMurNAc kinase	Cytoplasme
<i>anmK (ydhH)</i>		MurNAc-6-P éthérase	Cytoplasme
<i>murQ (yfeU)</i>	<i>YbbI</i>	MurNAc-6-P éthérase	Cytoplasme
<i>amiA</i>		Amidase	Périplasme
<i>amiB</i>		Amidase	Périplasme
<i>amiC</i>		Amidase	Périplasme
<i>amiD (ybjR)</i>		anhMurNAc-L-Ala amidase	Membrane externe
<i>mppA</i>		protéine de liaison au peptide muréique	Périplasme

### 1.3. La résistance des bactéries aux $\beta$ -lactamines

Face à l'utilisation importante d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, les bactéries ont développé une série de mécanismes de résistance efficaces. Ces mécanismes peuvent intervenir individuellement mais la résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines résulte souvent de la combinaison de plusieurs des mécanismes décrits ci-dessous.

#### 1.3.1. La modification des PBPs

La résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines peut être le résultat de modifications des PBPs par un processus graduel de multiples substitutions dans la séquence en acides aminés, ce qui résulte en une diminution de l'affinité pour les  $\beta$ -lactamines tout en gardant leur activité enzymatique.

Par exemple, les bactéries du genre *Enterococcus* sont naturellement résistantes aux antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame car elles produisent un PBP de faible affinité, nommé PBP5 chez *Enterococcus faecium*. Cette faible affinité pour l'antibiotique serait due à la rigidité anormale de la cavité catalytique, suite à la présence d'un pont salin, et à un résidu valine qui réduit l'accessibilité du site actif (Sauvage *et al.*, 2002).

Parfois, des recombinaisons interspèces forment des gènes dits mosaïques codant pour des PBPs hybrides contenant des fragments émanant de bactéries non-résistantes aux  $\beta$ -lactamines. L'exemple le plus connu est le PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* (Hakenbeck, 1998).

On observe également chez certaines souches l'acquisition d'un gène codant pour une nouvelle DD-peptidase résistante, capable de remplacer les PBPs intrinsèques inhibés par les  $\beta$ -lactamines. C'est le cas notamment du PBP2a de la souche MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) qui joue un rôle supplétif lorsque les PBPs essentiels sont inhibés par les  $\beta$ -lactamines. Ces souches de *S. aureus* sont apparues suite à l'introduction de la méthicilline en thérapie humaine. Le gène *mecA* code pour un PBP de faible affinité (le PBP2a) dont le site actif est déformé suite à un encombrement stérique entre certains résidus proches du site actif (Lim & Strynadka, 2002).

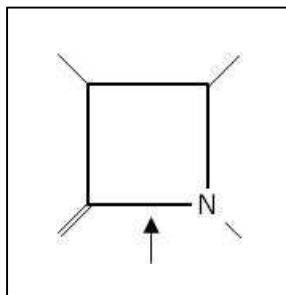
### 1.3.2. La modification de la perméabilité de la membrane externe

Chez les bactéries Gram-négatives, les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame peuvent diffuser à travers la membrane externe vers le périplasma via les porines. La résistance aux antibiotiques empruntant cette voie peut être conférée par l'acquisition de mutations au niveau des gènes codant pour ces porines ou la modification du niveau d'expression de ceux-ci (Nikaido 1994).

De plus, la diminution de la perméabilité de la membrane externe s'accompagne généralement d'un transport actif des antibiotiques du périplasma vers le milieu extérieur. Par exemple, le système d'efflux tripartite *AcrA/AcrB/TolC* d'*E. coli* est la pompe en charge de l'efflux de plusieurs antibiotiques, des colorants, des détergents et de différents solvants (Fernandez-Recio *et al.*, 2004).

### 1.3.3. L'inactivation enzymatique de l'antibiotique

Le mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines le plus répandu, aussi bien pour les bactéries Gram-positives que les Gram-négatives, est la production de  $\beta$ -lactamases. Ces enzymes hydrolysent la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame, inactivant ainsi l'antibiotique (Figure 1.11).



**Figure 1.11.** Site d'action des  $\beta$ -lactamases. La liaison amide clivée par les  $\beta$ -lactamases est indiquée par la flèche.

#### 1.3.3.1. Structure des $\beta$ -lactamases

On peut classer les  $\beta$ -lactamases en quatre classes selon leur séquence en acides aminés. Les classes A, C et D comprennent les enzymes à sérine active (Matagne *et al.*, 1999). Les  $\beta$ -lactamases de classe A sont généralement appelées pénicillinases (ex. : TEM1 de *Escherichia coli*), celles de classe C, céphalosporinases (ex. : AmpC de *Citrobacter freundii*) et celles de classe D oxacillinases (ex. : OXA2 de *Salmonella Typhimurium*). Les  $\beta$ -lactamases de classe B sont des métalloenzymes qui nécessitent la présence d'un ion  $Zn^{2+}$  dans leur site actif.

Trois éléments structuraux conservés (Table 1.2), contenant des chaînes latérales identiques ou fortement similaires, ont été mis en évidence chez les  $\beta$ -lactamases à sérine. Ces motifs sont présents dans le site actif et interviennent de façon directe ou indirecte dans l'activité catalytique. Ces résidus sont également présents dans les modules liant la pénicilline des DD-peptidases à sérine (Frère *et al.*, 1988).

**Table 1.2.** Eléments conservés dans les sites actifs des enzymes à sérine reconnaissant la pénicilline

Enzyme	Elément 1	Elément 2	Elément 3
$\beta$ -lactamases			
Classe A	SXXK	SDN	(K/R)(S/T)G
Classe C	SXXK	YAN	KTG
Classe D	STFK	SXV	K(T/S)G
DD-peptidases	S(T/S)FK	(Y/S)X(N/C)	(H/K)(T/S)G

Malgré le faible pourcentage d'identité de leur structure primaire, les  $\beta$ -lactamases à sérine possèdent une structure tertiaire fortement similaire. En effet, leur structure tridimensionnelle est composée d'un domaine « tout- $\alpha$  » et d'un domaine «  $\alpha\beta$  ». Cette structure est également celle rencontrée chez les DD-peptidases (figure 1.12) (Kelly *et al.*, 1998, Massova & Mobashery, 1998). La sérine active est située à l'extrémité amino-terminale d'une longue hélice à l'interface des deux domaines. Le deuxième motif conservé se localise sur une boucle reliant 2 hélices  $\alpha$  du domaine « tout- $\alpha$  » et le troisième motif est situé sur le brin  $\beta$  le plus interne du feuillet antiparallèle. Les  $\beta$ -lactamines de classe A possèdent un quatrième motif conservé (EXELN) qui est situé sur la boucle  $\omega$  reliant 2 hélices  $\alpha$  à l'entrée du site actif (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991).

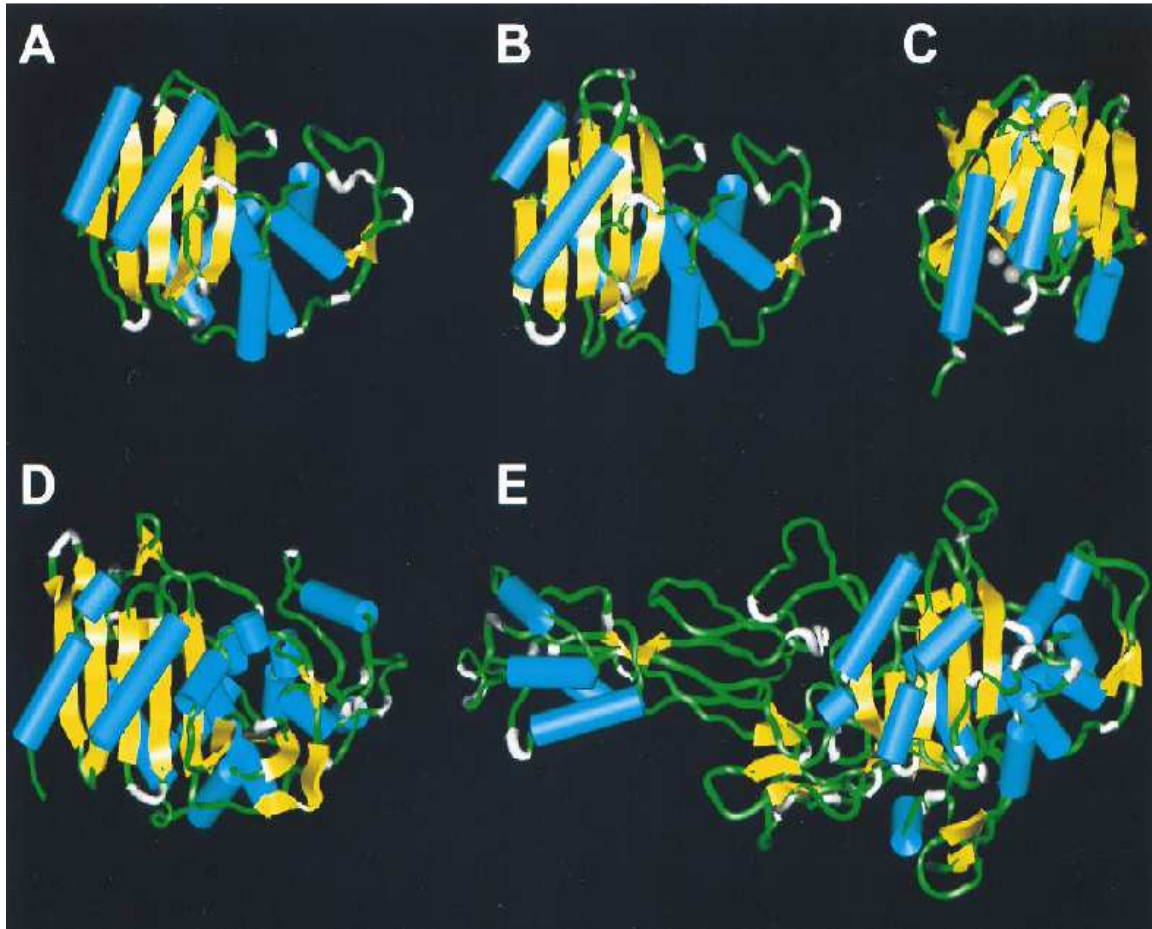
### 1.3.3.2. Mécanisme catalytique des $\beta$ -lactamases et PBPs

Les  $\beta$ -lactamases à sérine font partie de la superfamille des Enzymes à sérine Reconnaisant la Pénicilline (PRE). Dans cette superfamille on retrouve également les DD-peptidases (ou PBPs) qui interviennent dans la formation du peptidoglycane et qui sont inactivées par les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame. Ainsi, les pénicillines inactivent les PBPs alors que les  $\beta$ -lactamases inactivent les pénicillines.

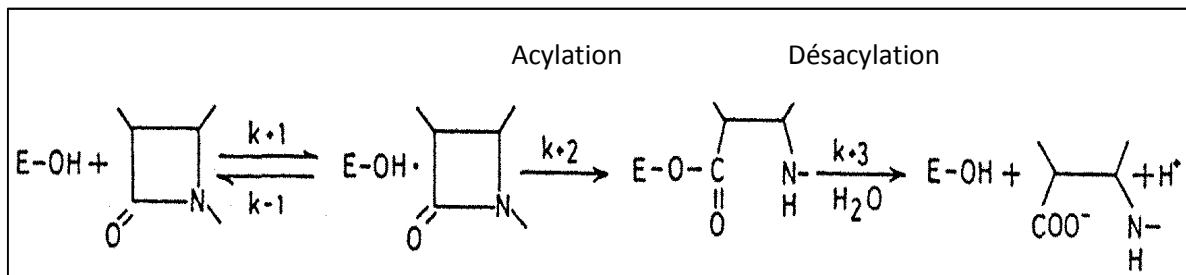
Les  $\beta$ -lactamases à sérine et les PBPs interagissent avec les  $\beta$ -lactamines selon un modèle cinétique identique à celui de la chymotrypsine et des autres peptidases à sérine active. La première étape de ce mécanisme consiste à transférer l'oxygène de la sérine sur le carboxyle de la pénicilline, ce qui aboutit à la formation d'un acyl-enzyme, c'est l'acylation. Lors de la deuxième étape, appelée désacylation, l'ester formé est hydrolysé par une molécule d'eau (Figure 1.13). Le résultat de cette réaction est l'hydrolyse de la pénicilline et la régénération d'une enzyme active.

La vitesse de désacylation ( $k_3$ ) pour les DD-peptidases est faible, de l'ordre de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , ce qui conduit à l'accumulation d'un acyl-enzyme stable. Par contre, pour les  $\beta$ -lactamases, aussi bien l'acylation que l'hydrolyse de l'acyl-enzyme sont généralement rapides, ce qui implique une grande affinité pour leur substrat ( $k_2/K$ , constante d'acylation, allant jusqu'à  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) et un  $k_3$  (constante de désacylation) rapide, de l'ordre de  $1.000 \text{ s}^{-1}$  (Frère, 1995).





**Figure 1.12.** Représentation de la structure tridimensionnelle de la  $\beta$ -lactamase de classe A TEM-1 d'*E. coli* (A), de la  $\beta$ -lactamase de classe A BlaP de *B. licheniformis* 749C (B), de la  $\beta$ -lactamase de classe B de *B. fragilis* (C), de la  $\beta$ -lactamase de classe C de *E. cloacae* P99 (D) et du PBP2x (transpeptidase) de *S. pneumoniae* (E). Les hélices  $\alpha$  sont représentées en bleu, les feuillets  $\beta$  en jaune et les sphères grises sont des ions zinc. (Kelly et al., 1998) .



**Figure 1.13.** Représentation du chemin réactionnel des PBPs avec les  $\beta$ -lactamines.  $k_2/K$ = constante d'acylation,  $k_3$ =constante de désacylation.



## 1.4. Mécanismes d'induction de la synthèse des $\beta$ -lactamases

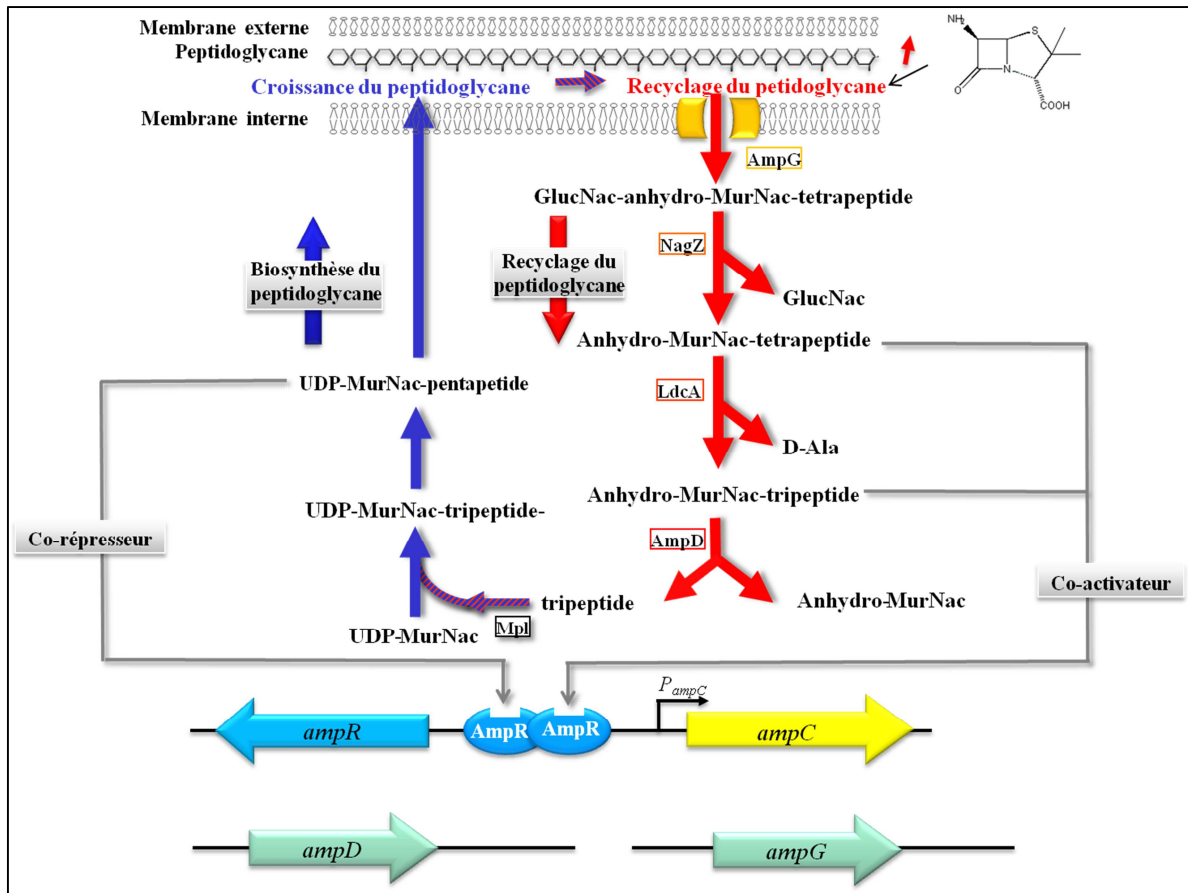
La synthèse de  $\beta$ -lactamases peut être soit constitutive, soit induite par la présence de  $\beta$ -lactamines dans le milieu extérieur. Un système inductible, bien que plus complexe, est plus favorable énergétiquement qu'une production constitutive de l'enzyme. Quatre systèmes d'induction de la production de  $\beta$ -lactamases sont actuellement décrits dans la littérature. Pour les bactéries à Gram négatif, le modèle type est celui décrit chez *C. freundii*. Un autre exemple est celui décrit chez *Aeromonas spp.* Chez les bactéries à Gram positif, deux modèles ont été bien étudiés : celui de *Streptomyces cacaoi* et celui décrit chez *S. aureus* et *B. licheniformis*.

### 1.4.1. Induction de la synthèse de $\beta$ -lactamases chez *Citrobacter freundii*

Chez les bactéries Gram-négatives, le mécanisme de régulation de la production de  $\beta$ -lactamases le plus répandu est le système AmpCR retrouvé chez la majorité des *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* (Hanson & Sanders, 1999) (Lodge et al., 1993) (Trepanier et al., 1997) (Okazaki & Avison, 2008). Il a été intensivement étudié chez *C. freundii* où le mécanisme d'induction de la  $\beta$ -lactamase AmpC fait intervenir trois gènes : *ampR*, *ampG* et *ampD* (Lindquist et al., 1989a) (Figure 1.14). Les gènes *ampC* et *ampR* sont adjacents mais sont transcrits en sens opposé. Le gène *ampC* code pour une  $\beta$ -lactamase de classe C et le gène *ampR* code pour un activateur transcriptionnel de la famille LysR. La protéine AmpR se lie dans la région intergénique entre *ampC* et *ampR* et agit à la fois comme activateur et comme répresseur suivant le ligand qui interagit avec elle (Lindquist et al., 1989b). Les autres gènes nécessaires à l'induction de la production de AmpC ne sont pas liés aux précédents : le gène *ampG* code pour une perméase et le gène *ampD* code pour une amidase impliquée dans le recyclage des produits de dégradation du peptidoglycane qui pénètrent dans la cellule via AmpG.

En absence d'antibiotique, AmpR est complexé par un précurseur de la synthèse du peptidoglycane, l'UDP-MurNAc-pentapeptide, et réprime la transcription du gène *ampC*. Par contre, quand les antibiotiques inactivent un ou plusieurs PBP au niveau du périplasme, un déséquilibre apparaît entre la biosynthèse et la dégradation du peptidoglycane. Le GlcNAc-anhydro-MurNAc-peptide, produit de dégradation du peptidoglycane, traverse la membrane cytoplasmique via la perméase AmpG (Cheng & Park, 2002). Elle est ensuite dégradée, dans le cytoplasme, en anhydro-MurNAc-peptide par une N-acétylglucosamidase. L'anhydro-MurNAc-peptide peut alors déplacer l'UDP-MurNAc-pentapeptide pour se fixer à AmpR, qui devient ainsi un activateur de la transcription permettant l'expression de la  $\beta$ -lactamase AmpC (Jacobs et al., 1997) (Jacobs et al., 1994).

L'amidase AmpD est une enzyme impliquée dans le recyclage du peptidoglycane. Elle permet le clivage de l'anhydro-MurNAc-tripeptide pour libérer le tripeptide qui peut alors réintégrer la voie de biosynthèse du peptidoglycane (Jacobs et al., 1995). Une inactivation du gène *ampD* permet l'accumulation de l'anhydro-MurNAc-peptide et entraîne une surproduction constitutive de la  $\beta$ -lactamase AmpC (Lindberg et al., 1987).



**Figure 1.14.** Représentation schématique de la voie de régulation de l'expression du gène *ampC* chez *C. freundii*, détaillée dans le texte.

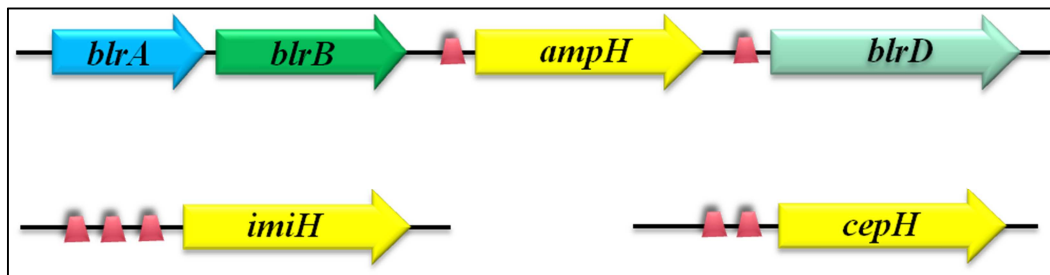
#### 1.4.2. Induction de la synthèse de $\beta$ -lactamases chez *Aeromonas* spp

La régulation de la production de  $\beta$ -lactamases chez les bactéries du genre *Aeromonas* implique un autre mécanisme de régulation que le système AmpCR. En effet, ces bactéries produisent plusieurs  $\beta$ -lactamases inductibles grâce à un système à deux composants (TCS pour two-component system). La plupart de ces bactéries produisent trois  $\beta$ -lactamases différentes : une de classe B, une de classe C et une de classe D, codées par des gènes chromosomiques non liés (Avison *et al.*, 2000, Niumsop *et al.*, 2003).

Chez *A. hydrophila*, les trois  $\beta$ -lactamases inductibles produites sont ImiH (classe B), CepH (classe C) et AmpH (classe D). L'expression des gènes *imiH*, *cepH* et *ampH* est contrôlée par le facteur de transcription BlrA, dont l'activité est médiée par phosphorylation. Le senseur de la présence d'antibiotique, associé à BlrA, est la protéine kinase BlrB. Ces protéines sont codées par les gènes *blrA* et *blrB*, organisés en opéron et localisés en amont du gène *ampH* (figure 1.15). Au niveau des régions promotrices des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases, on trouve respectivement une, deux ou trois séquences cis répétées en tandem (TTCAC) pouvant être reconnues par le régulateur BlrA (Avison *et al.*, 2004). Le niveau d'expression de chacune des  $\beta$ -lactamases est proportionnel au nombre de copies de ces séquences répétées observées en amont de leur gène.

La protéine BlrB est une protéine membranaire comportant 2 segments transmembranaires et possédant une activité histidine kinase. Son activité pourrait répondre à la concentration en monomères disaccharide-pentapeptide de peptidoglycane qui augmente en présence d'antibiotiques (Tayler *et al.*, 2010).

Un quatrième gène a été identifié en aval du gène *ampH*, *blrD* qui code pour une protéine membranaire de fonction encore inconnue. Sa région promotrice contient une séquence répétée TTCAC pouvant être reconnue par BlrA (Avison *et al.*, 2004).



**Figure 1.15.** Organisation des gènes impliqués dans la régulation des  $\beta$ -lactamases AmpH, ImiH et CepH chez *A. hydrophila*. Les petits trapèzes rouges représentent les séquences TTCAC reconnues par le régulateur BlrA.

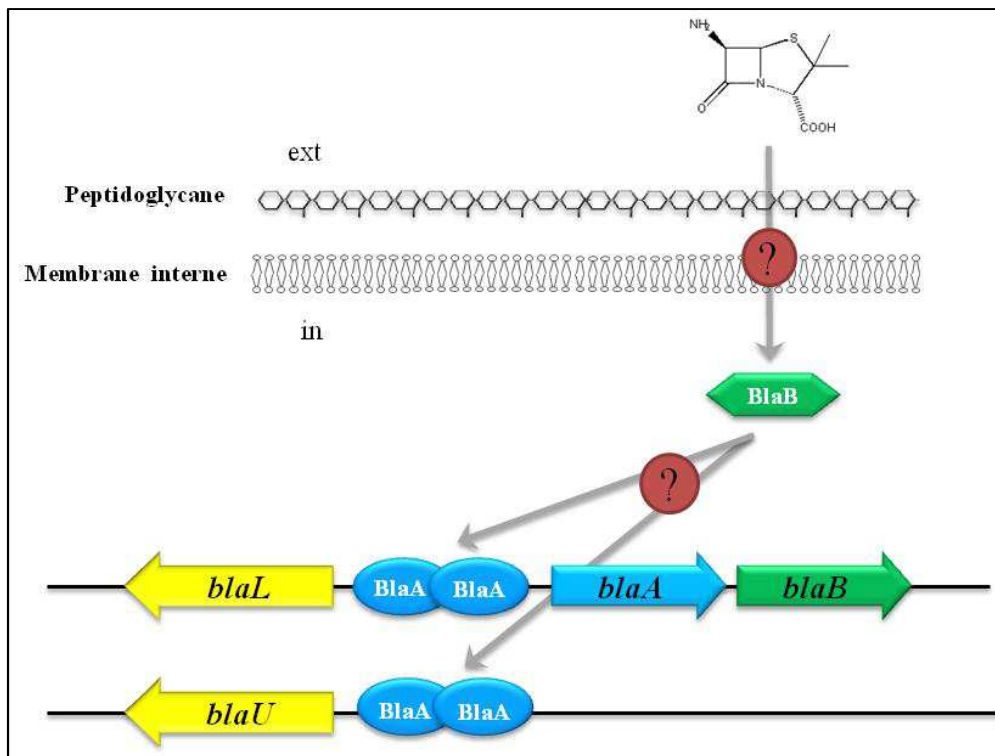
#### 1.4.3. Induction de la synthèse des $\beta$ -lactamases chez *Streptomyces cacaoi*

Le génome de *S. cacaoi* contient deux gènes non liés codant pour deux  $\beta$ -lactamases de classe A différentes : BlaL et BlaU. Deux autres gènes, *blaA* et *blaB*, localisés en amont de *blaL*, sont requis pour la régulation de l'induction. Ils forment un opéron et sont transcrits de manière divergente par rapport à *blaL* (figure 1.16).

La protéine BlaA est un régulateur transcriptionnel de la famille LysR. Elle joue un rôle dans l'activation de la transcription de la  $\beta$ -lactamase BlaL en se liant, grâce à un motif « helix-turn-helix », sur la région intergénique séparant *blaL* et *blaA* (Lenzini *et al.*, 1992, Urabe & Ogawara, 1992). La protéine BlaB présente les séquences conservées SxxK, KTG et SxN caractéristiques des PREs et est homologue aux  $\beta$ -lactamases de classe A (Magdalena *et al.*, 1995).

La présence d'un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame dans le milieu extracellulaire génèrerait un stress, transmis à la cellule par un signal intracellulaire, de nature encore inconnue, permettant l'activation de BlaB. Ce dernier pourrait alors transmettre l'information via BlaA qui activerait la production de la synthèse de  $\beta$ -lactamases (Raskin *et al.*, 2003).

La production de la  $\beta$ -lactamase BlaU serait régulée de la même manière que celle de BlaL. Le régulateur BlaA pourrait se lier sur la région promotrice du gène *blaU* et cette régulation impliquerait également BlaB (Magdalena *et al.*, 1997).



**Figure 1.16.** Représentation schématique de la voie de régulation des  $\beta$ -lactamases BlaL et BlaU chez *S. cacaoi*, détaillée dans le texte.

#### 1.4.4. Mécanisme d'induction de la $\beta$ -lactamase chez *Staphylococcus aureus* et *Bacillus licheniformis*.

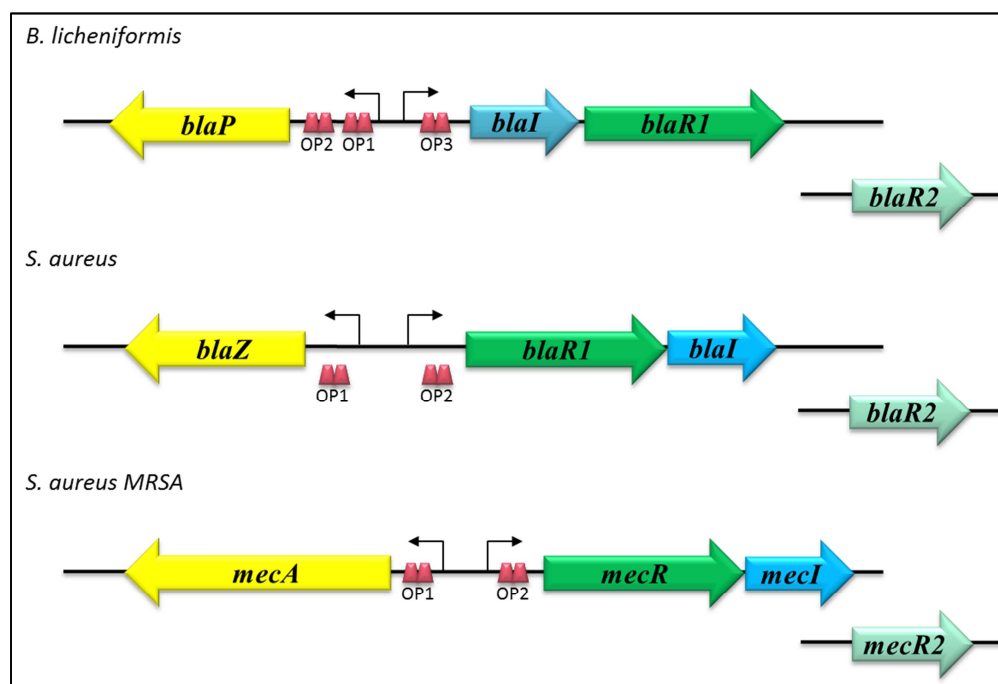
Pour résister aux antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, *S. aureus* et *B. licheniformis* peuvent produire une  $\beta$ -lactamase de classe A inducible, appelée respectivement BlaZ et BlaP. L'expression du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase (nommé *blaZ* chez *S. aureus* et *blaP* chez *B. licheniformis*) est sous le contrôle de deux protéines, Blal et BlaR1, un répresseur transcriptionnel et un récepteur membranaire (Clarke & Dyke, 2001) (Salerno & Lampen, 1988). Les gènes codant pour ces deux protéines, *blal* et *blaR1*, sont groupés en opéron et forment un divergeon avec le gène *blaZ/blaP* (Figure 1.17). Ces gènes sont chromosomiques dans le cas de *B. licheniformis*, tandis que chez *S. aureus*, ils font partie du transposon Tn552 et sont localisés soit sur un plasmide, soit sur le chromosome (Rowland & Dyke, 1990).

Un troisième gène régulateur, *blaR2*, a été mis en évidence par des expériences de mutagenèse chimique. La protéine codée par celui-ci serait indispensable à la levée de la répression (Sherratt & Collins, 1973). L'existence du gène *blaR2* ne repose que sur des arguments génétiques. Il n'est pas lié au divergeon *bla*, mais il n'a pas encore été identifié.

Etant donné que *B. licheniformis* est difficilement transformable, le mécanisme d'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP est étudié chez *B. subtilis*. Cette souche est phylogénétiquement très proche de *B. licheniformis* mais ne possède pas le divergeon *blaP-blal-blaR1*. Les gènes *blaP*, *blal* et *blaR1* peuvent être introduit chez *B. subtilis* à l'aide du plasmide pDML995 (cf §4.2.5). La souche *B.*

*subtilis/pDML995* est capable de produire la  $\beta$ -lactamase BlaP de manière inductible. Ceci implique que le locus *blaR2* est présent dans le génome de *B. subtilis*.

Certaines souches de *S. aureus* ont acquis un opéron permettant la production inductible d'un PBP de faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines, le PBP2a. L'expression du gène *mecA*, codant pour le PBP2a, est sous le contrôle des protéines Mecl et MecR codées par les gènes *mecI* et *mecR* (Tesch *et al.*, 1990, Stapleton & Taylor, 2002). La présence du gène *mecA* est responsable de la résistance de cette souche à la méthicilline (Méthicillin Resistant *S. aureus* ou MRSA). Le mécanisme d'induction de la synthèse du PBP2a ainsi que l'organisation des gènes impliqués sont comparables au système permettant l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaZ (Figure 1.17). Des similarités de séquences entre les régions opératrices en amont des gènes *mecA* et BlaZ ont également été mises en évidence. De plus, les répresseurs Mecl et Blal de *S. aureus* sont interchangeable. Par contre, les récepteurs BlaR1 et MecR ne le sont pas (McKinney *et al.*, 2001).



**Figure 1.17.** Représentation des divergeons responsables de l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP de *B. licheniformis* et de la  $\beta$ -lactamase BlaZ et du PBP2a résistant de *S. aureus*.

Le gène *blal* de *B. licheniformis* code pour un répresseur transcriptionnel de 128 acides aminés, Blal, constitué de deux parties distinctes : un domaine N-terminal de liaison à l'ADN comprenant un motif « helix-turn-helix » et un domaine C-terminal de dimérisation (Wittman *et al.*, 1993). Les pourcentages d'identité entre les structures primaires des différentes protéines régulatrices Blal/Mecl de *B. licheniformis* et *S. aureus* sont détaillés dans la table 1.3.

Le répresseur Blal de *B. licheniformis* reconnaît spécifiquement trois régions opératrices situées dans la région intergénique entre les gènes *blaP* et *blal* : deux en tandem devant le gène *blaP* (OP1 et OP2) et la dernière devant l'opéron *blal-blaR1* (OP3) (figure 1.17) (Wittman & Wong, 1988). Chez *S. aureus*, une seule séquence opératrice est localisée en amont des gènes *blaZ/mecA* et en amont de l'opéron *blal-blaR1/mecI-mecR* (Tesch *et al.*, 1990). Ces éléments régulateurs *cis* sont constitués de séquences répétées inverses, d'une longueur de 23 pb (Wittman *et al.*, 1993, Wittman & Wong,

1988). L'affinité de Blal de *B. licheniformis* 749I pour ces différents sites de liaisons n'est pas identique : OP1 possède une séquence qui est la plus proche du palindrome parfait (Figure 1.18) et présente la plus grande affinité pour Blal (Filée *et al.*, 2003). Ceci suggère qu'en absence d'antibiotique, la transcription de *blaP* est mieux réprimée que celle de l'opéron *blal-blaR1*.

**Table 1.3.** Pourcentage d'identité entre les structures primaires des protéines Blal de *B. licheniformis*, Blal de *S. aureus* et Mecl de *S. aureus* ainsi que de leur domaine de liaison à l'ADN et de leur domaine de dimérisation.

	Pourcentage d'identité
<b>Régulateur entier :</b>	
Blal de <i>B. licheniformis</i> / Blal de <i>S.aureus</i>	40 %
Blal de <i>B. licheniformis</i> / Mecl de <i>S. aureus</i>	44 %
Blal de <i>S. aureus</i> / Mecl de <i>S. aureus</i>	61 %
<b>Domaine de liaison à l'ADN (résidus 1 à 82 pour Blal de <i>B. licheniformis</i>) :</b>	
Blal de <i>B. licheniformis</i> / Blal de <i>S.aureus</i>	39 %
Blal de <i>B. licheniformis</i> / Mecl de <i>S. aureus</i>	42 %
Blal de <i>S. aureus</i> / Mecl de <i>S. aureus</i>	62 %
<b>Domaine de dimérisation (résidus 83 à 128 pour Blal de <i>B. licheniformis</i>) :</b>	
Blal de <i>B. licheniformis</i> / Blal de <i>S.aureus</i>	50 %
Blal de <i>B. licheniformis</i> / Mecl de <i>S. aureus</i>	54 %
Blal de <i>S. aureus</i> / Mecl de <i>S. aureus</i>	61 %

<b>Opérateurs de Blal de <i>B. licheniformis</i></b>		
	→	←
OP1	AAGTATT <b>TACAT</b>	ATGTAAGATTT
OP2	AAATCT <b>TACAA</b>	ATGTAAGTCTTT
OP3	GAGTATT <b>TACAT</b>	T <b>TGTA</b> AGTATA
Consensus	aAgTa <b>TACAt</b>	a <b>TGTA</b> agNtTt

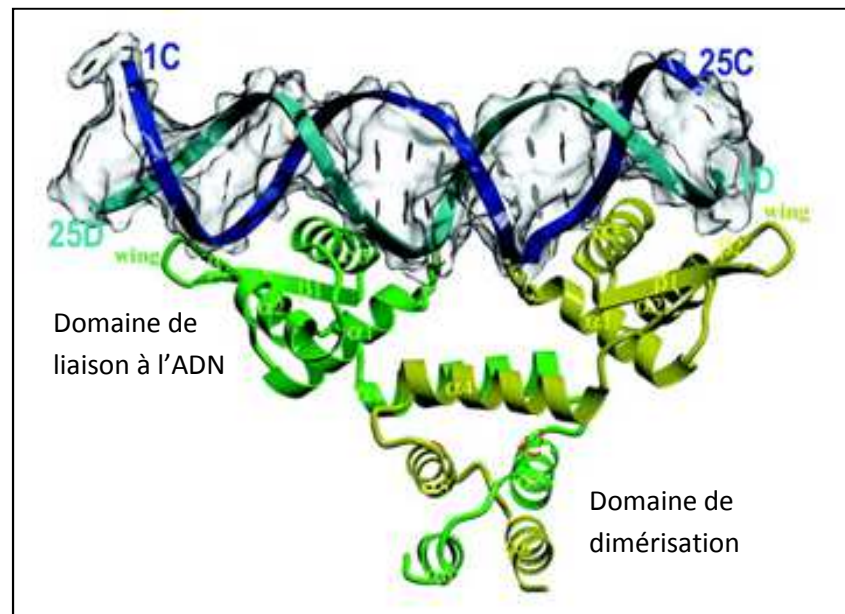
  

<b>Opérateur de Blal et Mecl de <i>S. aureus</i></b>		
	→	←
OP1 Blal	AAAAAT <b>TACAA</b>	C <b>TGTA</b> ATATCG
OP2 Blal	CGATAT <b>TACAA</b>	T <b>TGTA</b> ATATTA
Consensus	aaAa <b>TACAA</b>	c <b>TGTA</b> ATATca
OP1 Mecl	TCATA <b>TACAA</b>	T <b>TGTA</b> AGTATTA
OP2 Mecl	TAATAT <b>TACAA</b>	A <b>TGTA</b> ATATGA
Consensus	TaATA <b>TACAA</b>	a <b>TGTA</b> aTATgA

**Figure 1.18.** Alignement des séquences nucléotidiques des opérateurs de Blal de *B. licheniformis*, Blal de *S. aureus* et Mecl de *S. aureus*. Les résidus en gras sont les bases strictement conservées dans les sept régions opératrices.

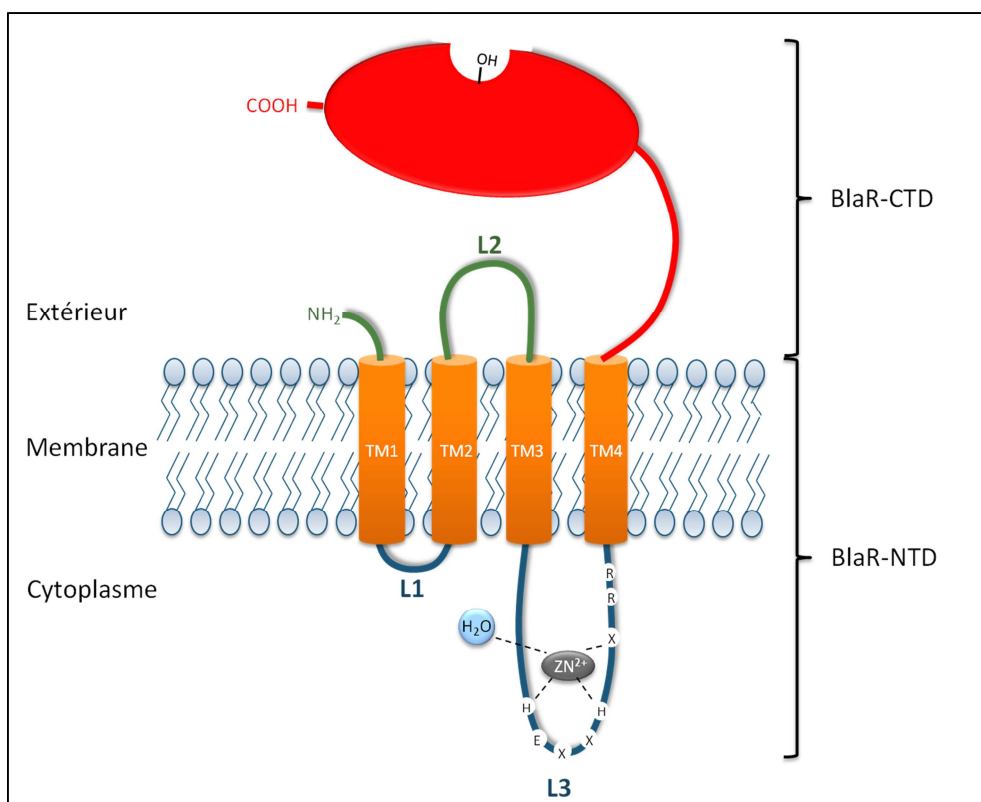


La structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN de BlaI de *B. licheniformis* ainsi que celle des protéines BlaI et MecI de *S. aureus* ont été publiées (Garcia-Castellanos *et al.*, 2003, Melckebeke *et al.*, 2003, Safo *et al.*, 2005). Celle de MecI en interaction avec l'ADN est également disponible (Garcia-Castellanos *et al.*, 2004). Celle-ci révèle que MecI agit sous forme de dimère constitué de deux domaines en hélices indépendants, liant chacun un demi site de l'opérateur, de deux domaines de dimérisation et d'un cœur hydrophobe (figure 1.19). De plus, peu de changements conformationnels sont observés lors de la formation du complexe MecI-ADN, que ce soit au niveau de l'ADN ou de la protéine.



**Figure 1.19.** Représentation de la structure tridimensionnelle du dimère du répresseur MecI en interaction avec son opérateur (Garcia-Castellanos *et al.*, 2004). Le répresseur MecI interagit avec sa séquence opératrice via son hélice de reconnaissance  $\alpha 3$ , qui s'insère dans le sillon majeur de l'ADN et via sa boucle W1 (wing) qui interagit avec le sillon mineur de l'ADN.

Le gène *blaR1* de *B. licheniformis* code pour un récepteur de  $\beta$ -lactamines transmembranaire de 601 acides aminés appelé BlaR1 et composé de deux domaines (Figure 1.20). Le domaine N-terminal (BlaR-NTD ; M<sup>1</sup>-P<sup>339</sup>) comprend quatre segments transmembranaires, formant une botte de quatre hélices  $\alpha$ , qui délimitent trois boucles : L1 (K<sup>27</sup>-T<sup>35</sup>) et L3 (Y<sup>134</sup>-K<sup>322</sup>), cytoplasmiques, et L2 (P<sup>53</sup>-S<sup>115</sup>), exposée à l'extérieur de la cellule (Hardt *et al.*, 1997). La boucle L3 possède un motif de liaison au zinc, H<sup>212</sup>ExxH, caractéristique des métalloprotéases à Zinc de la famille de la thermolysine. Ce motif est conservé chez MecR1 et BlaR1 de *S. aureus* et est essentiel pour l'induction (Benlafya, thèse de doctorat, Zhang *et al.*, 2001). Le domaine C-terminal (BlaR-CTD ; S<sup>340</sup>-R<sup>601</sup>) est extracytoplasmique et possède les motifs caractéristique des enzymes à sérine reconnaissant la pénicilline : S\*TYK (S\*=sérine active), SxT et KTG (Joris *et al.*, 1988). Le pourcentage d'identité entre la structure primaire des récepteurs BlaR1 de *B. licheniformis* et *S. aureus* et MecR de *S. aureus* est illustré à la table 1.4.



**Figure 1.20.** Topologie du récepteur BlaR1 de *B. licheniformis*. Ce récepteur contient 2 domaines, un extracellulaire : BlaR-CTD (en rouge) et un transmembranaire : BlaR-NTD. Ce dernier est composé de 4 segments transmembranaires (en orange) : TM1 à 4, qui délimitent 3 boucles. La boucle L2 est exposée à l'extérieur de la cellule (en vert) et les boucles L1 et L3 sont cytoplasmiques (en bleu). La boucle L3 contient le motif H<sup>212</sup>EXXH caractéristique des métalloprotéases à zinc.

**Table 1.4.** Pourcentage d'identité entre les structures primaires des protéines BlaR1 de *B. licheniformis*, BlaR1 de *S. aureus* et MecR de *S. aureus* ainsi que de leurs domaines NTD et CTD.

	Pourcentage d'identité
<b>Récepteur entier :</b>	
BlaR1 de <i>B. licheniformis</i> / BlaR1 de <i>S.aureus</i>	27 %
BlaR1 de <i>B. licheniformis</i> / MecR de <i>S. aureus</i>	31 %
BlaR1 de <i>S. aureus</i> / MecR de <i>S. aureus</i>	34 %
<b>Domaine NTD (Résidus 1 à 339 de BlaR1 de <i>B. licheniformis</i>):</b>	
BlaR1 de <i>B. licheniformis</i> / BlaR1 de <i>S.aureus</i>	27 %
BlaR1 de <i>B. licheniformis</i> / MecR de <i>S. aureus</i>	24 %
BlaR1 de <i>S. aureus</i> / MecR de <i>S. aureus</i>	30 %
<b>Domaine CTD (Résidus 340 à 601 de BlaR1 de <i>B. licheniformis</i>):</b>	
BlaR1 de <i>B. licheniformis</i> / BlaR1 de <i>S.aureus</i>	37 %
BlaR1 de <i>B. licheniformis</i> / MecR de <i>S. aureus</i>	43 %
BlaR1 de <i>S. aureus</i> / MecR de <i>S. aureus</i>	46 %



Le domaine BlaR-CTD peut être surproduit sous forme recombinante dans le périplasme de *E. coli* et soluble, indépendamment du reste de la protéine (Joris *et al.*, 1990). Il est capable de lier covalentiellement la pénicilline et possède 30% d'identité avec la  $\beta$ -lactamase de classe D OXA-2 de *Salmonella typhimurium*. Sa structure tridimensionnelle a été résolue et présente une forte similarité avec celle des  $\beta$ -lactamases à sérine (figure 1.21). Elle comporte un domaine « tout- $\alpha$  » et un domaine «  $\alpha\beta$  ». La poche catalytique se situe entre ces deux domaines. Une longue boucle, nommée  $\Omega$ , délimite le dessous du site catalytique et contient un résidu W488, caractéristique des  $\beta$ -lactamases de classe D (Kerff *et al.*, 2003).



**Figure 1.21.** Représentation de la structure tridimensionnelle de BlaR-CTD de *B. licheniformis* 7491 (Kerff *et al.*, 2003)

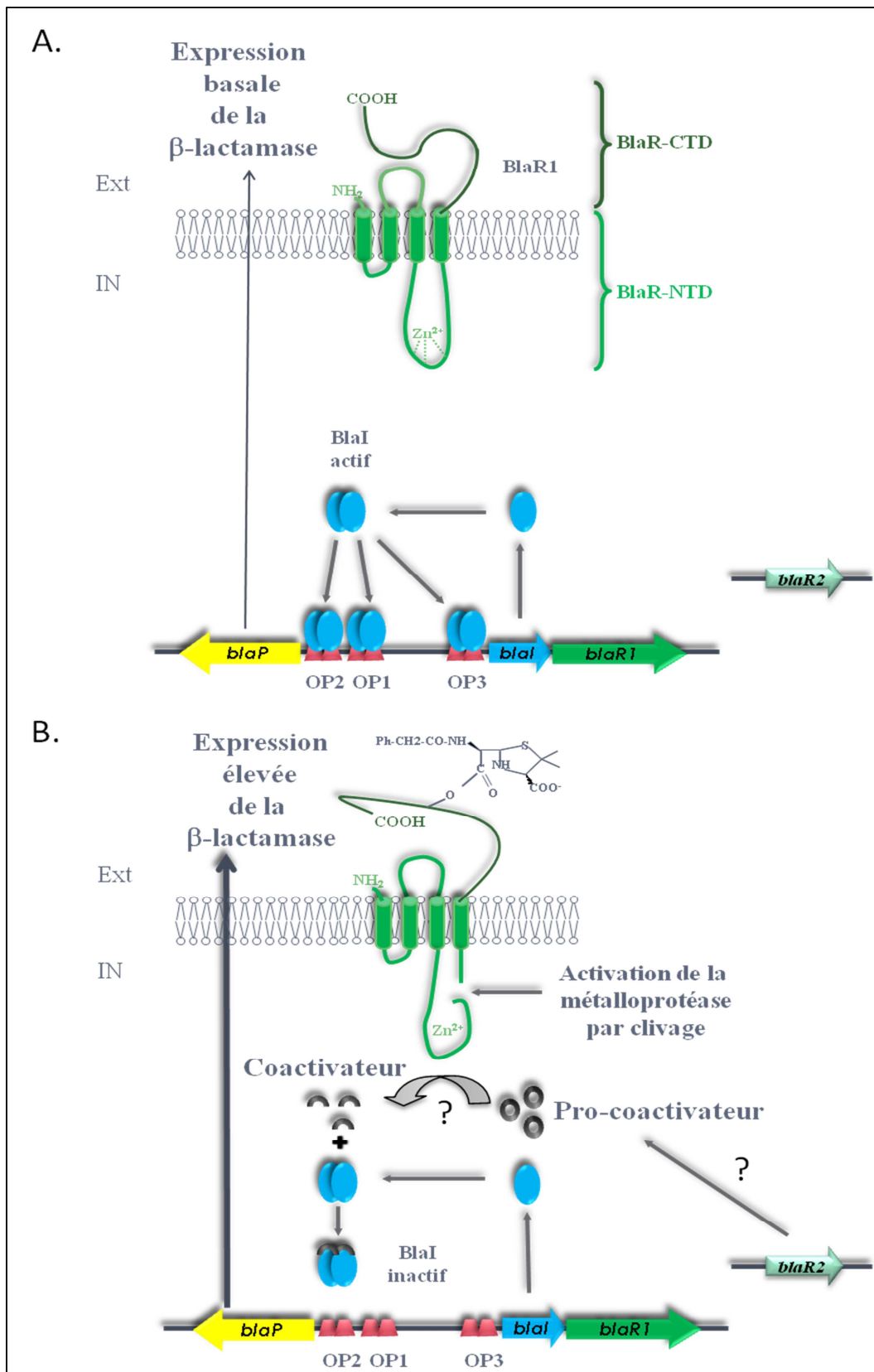
En l'absence de  $\beta$ -lactamine, le domaine BlaR-CTD interagirait avec la boucle L2 et la boucle L3 est inactive. En présence de l'inducteur, l'acylation de BlaR-CTD par celui-ci entraîne un affaiblissement de l'interaction entre la boucle L2 et BlaR-CTD qui permettrait l'activation de la boucle L3 via un changement de conformation des segments transmembranaires (Hanique *et al.*, 2004). Dans le domaine C-terminal de BlaR1 de *S. aureus*, le résidu lysine du motif conservé SxxK ( $K^{392}$ ) serait carboxylé en absence d'antibiotique mais l'acylation de la sérine active par l'antibiotique aurait pour conséquence la décarboxylation de ce résidu (Borbulevych *et al.*, 2011). Le domaine senseur de BlaR1 serait ainsi figé dans un état activé, nécessaire à la transduction du signal. Pour la protéine BlaR1 de *B. licheniformis*, cette lysine carboxylée n'a jamais été observée.

L'activation de la boucle L3, suite à l'acylation de BlaR-CTD, serait obtenue par clivage. Le site de clivage de la boucle L3 a été déterminé pour BlaR1 de *S. aureus* au niveau de la liaison peptidique reliant les résidus  $R^{293}$  et  $R^{294}$ . Une mutation de ce site ne permet plus l'induction de la  $\beta$ -lactamase (Zhang *et al.*, 2001). Ces deux résidus d'arginine sont conservés dans BlaR1 de *B. licheniformis* où ils sont annotés  $R^{304}$  et  $R^{305}$ .

Au niveau cytoplasmique, l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 activée pourrait transmettre le signal de la présence d'antibiotiques en clivant un pro-coactivateur en coactivateur. Ce pro-coactivateur serait généré à partir du stress cellulaire lié à la présence de l'antibiotique. La liaison du coactivateur à Blal déplacerait celui-ci de son opérateur nucléotidique, levant la répression et permettant l'expression des gènes sous le contrôle de Blal (Filée *et al.*, 2003). La figure 1.22 illustre le mécanisme d'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*.

Pour obtenir l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*, deux conditions sont nécessaires. En effet, l'induction de BlaP nécessite non seulement l'acylation de BlaR1 par l'antibiotique, mais également un stress cellulaire aux pénicillines, probablement dû à une acylation partielle du PBP1 (Duval *et al.*, 2003).

Dans la littérature, le mécanisme proposé pour l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaZ et du PBP2a chez *S. aureus* est différent de celui de BlaP chez *B. licheniformis*. L'acylation du récepteur BlaR1/MecR1 par l'inducteur générerait un clivage de la boucle L3 intracytoplasmique, ce qui active la métalloprotéase. La boucle L3 générerait alors un second signal qui va provoquer la protéolyse de Blal/Mecl. Le clivage de Blal/Mecl a lieu au niveau de la liaison peptidique reliant les résidus N<sup>101</sup> et F<sup>102</sup> (Clarke & Dyke, 2001, Gregory *et al.*, 1997). Cependant, de nouveaux résultats (Amoroso *et al.*, 2012) montrent que le mécanisme d'inactivation de Blal de *S. aureus* serait identique à celui du répresseur de *B. licheniformis*. En effet, il a été montré par des expériences de retard de migration électrophorétique que les dipeptides  $\gamma$ -D-Glu- *m*-DAP et  $\gamma$ -D-Glu-L-Lys sont capables de déplacer Blal de sa cible nucléotidique et ce, aussi bien pour le répresseur de *B. licheniformis* que pour celui de *S. aureus*. Ces deux peptides, qui joueraient donc le rôle de coactivateurs, sont des fragments issus des peptides reliant les chaînes de glycanes du peptidoglycane respectivement de *B. licheniformis* et de *S. aureus*. Ainsi, l'inactivation de Blal/Mecl chez *S. aureus* serait due à la liaison d'un coactivateur, tout comme chez *B. licheniformis* et sa protéolyse n'aurait lieu qu'après la levée de la répression, sans doute pour dégrader la protéine. Il est également proposé que la boucle L3 du récepteur activé posséderait une activité L-Ala peptidase qui permettrait de générer le dipeptide à partir du tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP. Ce dernier pourrait être généré par les enzymes du catabolisme du peptidoglycane dont feraient partie les produits des gènes de l'opéron ykfABCD (cf. § 1.2.6).



**Figure 1.22 :** Représentation schématique de la voie de production de la  $\beta$ -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*, comme décrite dans la littérature avant le début de ce travail. A : situation en absence d'antibiotique ; B : situation lorsqu'un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame est présent dans le milieu extérieur.

## 1.5. Objectifs du travail

Le récepteur BlaR1 de *B. licheniformis* joue un rôle central dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP de *B. licheniformis*. En effet, une fois acylé par un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame, BlaR1 subirait un changement conformationnel qui aurait pour conséquence l'activation de l'activité métalloprotéasique de sa boucle cytoplasmique L3. Celle-ci pourrait alors cliver directement ou indirectement un pro-coactivateur en coactivateur.

Le premier objectif de ce travail est de comprendre le mécanisme moléculaire par lequel le récepteur BlaR1 transmet à l'intérieur de la cellule le signal de la présence d'une  $\beta$ -lactamine dans le milieu extérieur. Pour atteindre cet objectif, nous étudierons à la fois le changement conformationnel du récepteur purifié, le mécanisme d'activation de la boucle L3 et l'activité enzymatique de cette dernière. Dans ce but, nous produirons et purifierons la protéine BlaR1 entière et/ou la boucle cytoplasmique L3. Les changements conformationnels de BlaR1 en présence de pénicilline seront mis en évidence par des expériences de spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR). L'activité métalloprotéasique supposée de la boucle L3 sera mise en évidence en incubant la protéine avec différents fragments de peptidoglycane et en analysant les produits de dégradation par HPLC. Des expériences de mutagénèse seront également réalisées afin d'obtenir différents mutants de la boucle L3 pour étudier son mécanisme d'activation.

Notre équipe a démontré que le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP, issu de la dégradation du peptidoglycane, est le coactivateur capable d'inactiver le répresseur Blal. Les produits des gènes de l'opéron ykfABCD pourraient être des candidats pour dégrader, dans le cytoplasme, le mucopeptide issu du turn-over du peptidoglycane et pour générer ainsi le pro-coactivateur. C'est ainsi que le second objectif de cette thèse est de mettre en évidence le rôle des protéines YkfA, YkfB, YkfC et YkfD dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase. L'une d'entre-elles serait-elle le mystérieux locus *blaR2* ? Parallèlement à cette démarche, nous réaliserons une prédiction bio-informatique du régulon de Blal au sein de la souche *B. licheniformis* DSM13, la seule dont le génome est connu. La ou les protéines éventuellement mises en évidence par cette prédiction pourraient être le locus *blaR2* manquant et seront donc étudiées.

## 2.1. Etude de la transmission du signal de la présence d'antibiotiques par le récepteur BlaR1

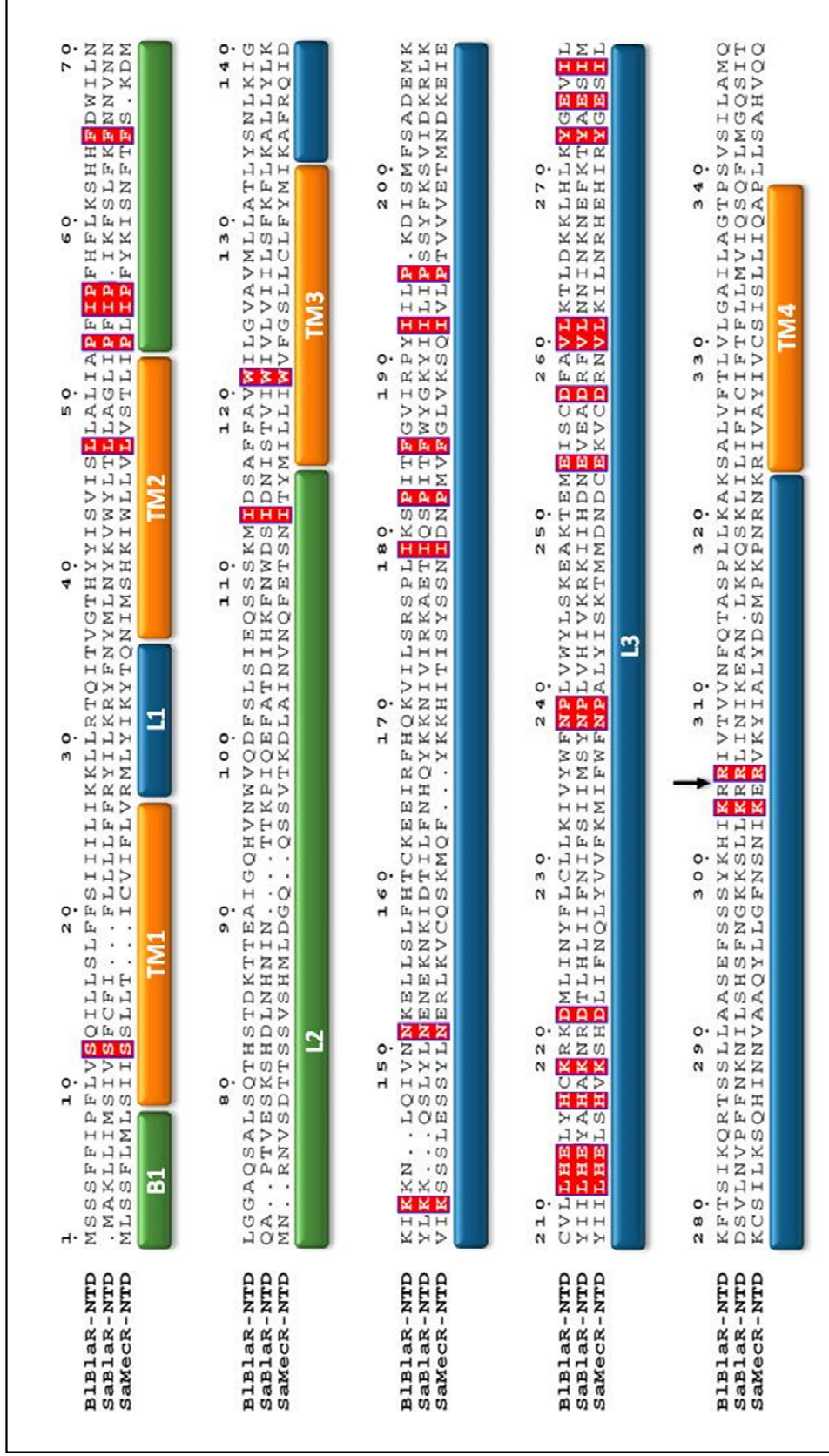
La protéine BlaR1 est une protéine membranaire qui joue le rôle de récepteur transmetteur lorsqu'un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame est présent dans le milieu extérieur. Le domaine BlaR-CTD agit comme senseur et le domaine BlaR-NTD comme transmetteur (cf § 1.4.4 de l'introduction). Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la boucle cytoplasmique L3 qui, au vu de sa séquence, pourrait agir comme une métalloprotéase à zinc et ainsi transmettre, à l'intérieur de la cellule, le signal de la présence de l'antibiotique dans le milieu extérieur.

### 2.1.1. Résidus conservés des domaines N-terminaux des protéines BlaR1 et MecR de *B. licheniformis* et *S. aureus*

Un alignement multiple des séquences des domaines N-terminaux des protéines BlaR1/MecR de *B. licheniformis* et *S. aureus* (figure 2.1) met en évidence 32 résidus strictement conservés, ce qui correspond à 9,4 % d'identité lorsqu'on prend comme référence la longueur de BlaR-NTD de *B. licheniformis* ( $[32/339] \times 100 = 9,4 \%$ ). Hors de ces 32 résidus conservés, 24 sont situés dans la boucle L3 ( $[24/188] \times 100 = 12,8 \%$ ), ce qui montre l'importance de cette boucle dans la signalisation intracellulaire.

Parmi les résidus conservés de la boucle L3, on retrouve le motif HExxH, caractéristique des métalloprotéases à zinc (Hooper, 1994). Dans les enzymes appartenant à cette famille, telle que la thermolysine, l'ion zinc, essentiel pour l'activité catalytique, est coordonné par les deux résidus histidines du motif HExxH (H<sup>142</sup> et H<sup>146</sup> pour la thermolysine), un résidu acide glutamique (le E<sup>166</sup> pour la thermolysine) et une molécule d'eau. Le mécanisme catalytique implique un mécanisme de base générale incluant l'acide glutamique du motif HExxH et un résidu histidine protoné (H<sup>231</sup> pour la thermolysine). Parmi les résidus strictement conservés de la boucle L3, quatre résidus acides (D<sup>221</sup>, E<sup>253</sup>, D<sup>257</sup> et E<sup>274</sup> chez *B. licheniformis*) pourraient jouer le rôle de troisième ligand du zinc ou être impliqué dans le mécanisme de base générale. Aucun résidu histidine conservé pouvant jouer le rôle du H<sup>231</sup> de la thermolysine n'est présent dans la boucle L3. Le meilleur candidat pour ce rôle est le résidu tyrosine conservé (Y<sup>272</sup> chez *B. licheniformis*).

Zhang et son équipe ont décrit que lorsque la protéine BlaR1 de *S. aureus* est acylée par un antibiotique, la boucle L3 subit un clivage qui pourrait permettre l'activation de la métalloprotéase. Ce clivage a lieu entre les résidus R<sup>293</sup> et R<sup>294</sup> (Zhang *et al.*, 2001). Ce site de clivage est conservé dans la protéine BlaR1 de *B. licheniformis* et partiellement conservé pour MecR de *S. aureus* (figure 2.1).

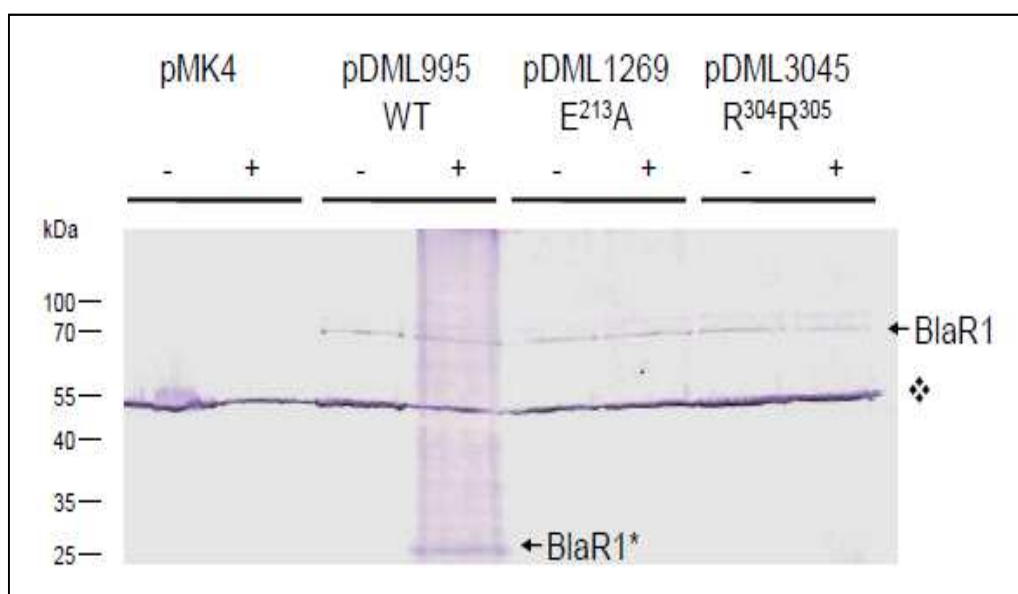


**Figure 2.1.** Alignement des séquences des domaines N-terminaux des protéines BlaR1 de *B. licheniformis* (BiBlaR-NTD), BlaR1 de *S. aureus* (SaBlaR-NTD) et MecR de *S. aureus* (SaMecR-NTD). Les résidus conservés sont surlignés en rouge et les segments transmembranaires (TM1 à 4) sont surlignés en orange, le segment B1 (M<sup>1</sup>-P<sup>8</sup>) et la boucle L2 (P<sup>53</sup>-S<sup>115</sup>) extracellulaires en vert et les boucles cytoplasmiques L1 (K<sup>27</sup>-I<sup>35</sup>) et L3 (Y<sup>134</sup>-K<sup>222</sup>) en bleu. Le site de clivage, situé entre les résidus R<sup>293</sup> et R<sup>294</sup> de BlaR1 de *S. aureus*, est indiqué par une flèche.



### 2.1.2. Etude de l'activation de BlaR1

Les fractions membranaires de *B. subtilis* transformé par le pDML995 (portant le divergeon *blaP-blaI-blaR*) et cultivé en présence ou non de céphalosporine C (l'inducteur), ont été analysées par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre BlaR-CTD (figure 2.2). Cette analyse montre la présence de 2 bandes induites : la première d'une taille d'environ 33 kDa et la seconde d'une taille d'environ 68 kDa. La bande de faible masse moléculaire peut correspondre au domaine C-terminal de la protéine BlaR1 activée et clivée, alors que la bande de haute masse moléculaire serait le récepteur entier. Ces résultats sont en accord avec un clivage d'activation entre les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup>, correspondant aux résidus R<sup>293</sup> et R<sup>294</sup> de *S. aureus*.

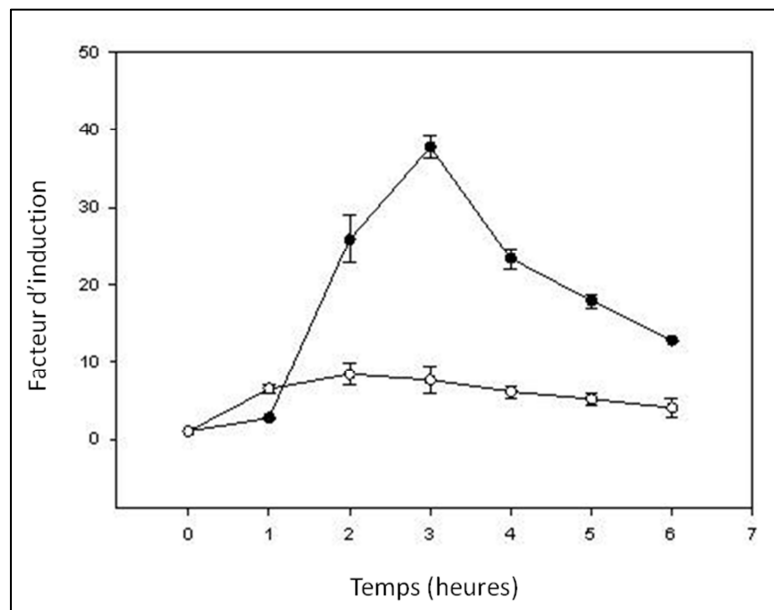


**Figure 2.2.** Analyse par Western blot des membranes de *B. subtilis* transformé par le pMK4 (control négatif), le pDML995 (contenant le gène *blaR1* sauvage), le pDML1269 (contenant le gène *blaR1* portant la mutation E<sup>213</sup>A) ou le pDML3045 (contenant le gène *blaR1* portant la mutation R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A). Les protéines membranaires de cultures induites (+) ou non induites (-) ont été séparées par SDS-PAGE. Les anticorps utilisés sont des anticorps anti-BlaR-CTD purifiés. Le symbole « ❖ » met en évidence une bande intense et non spécifique. BlaR1 et BlaR1\* indiquent respectivement le récepteur BlaR1 entier ou activé.

Afin de confirmer cette hypothèse, les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup> de BlaR1 ont été mutés en alanine. Pour ce faire la mutation R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A a été introduite sur un plasmide dérivé du pGem T-Easy portant le gène *blaR1* (pG-BlaR). La mutagenèse a été réalisée à l'aide du kit « QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene). Le plasmide résultant de cette mutagenèse a été nommé pGBlaR-RRAA. Ce dernier a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *SacI* et *MscI*. Le fragment résultant contient environ 800 pb et porte la mutation R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A. Il a été inséré dans le pDML995 digéré par les mêmes enzymes de restriction afin de donner le pDML3045. La séquence de ce dernier a été vérifiée par séquençage. *B. subtilis* 168 a ensuite été transformé par le pDML3045 et l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP de cette souche a été comparée à celle de *B. subtilis* 168 transformé par le pDML995. Les méthodes utilisées pour les tests d'induction et le dosage de l'activité  $\beta$ -lactamasique sont décrites au chapitre matériel et méthodes, paragraphe 4.9.10.

En présence d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, le mutant  $R^{304}A/R^{305}A$  induit très faiblement la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP (figure 2.3). En effet, l'induction de ce mutant correspond à environ 20 % de l'induction du sauvage. Une analyse par Western blot avec des anticorps dirigés contre BlaR-CTD a été réalisée sur des extraits membranaires du mutant  $R^{304}A/R^{305}A$  (figure 2.2). Cette expérience montre qu'aucun clivage de la protéine BlaR1 n'est induit en présence d'antibiotiques pour ce mutant.

Ces résultats montrent que les acides aminés  $R^{304}$  et  $R^{305}$  sont importants pour la transmission du signal par BlaR1 et constituent probablement le site de clivage nécessaire à l'activation de la boucle L3.



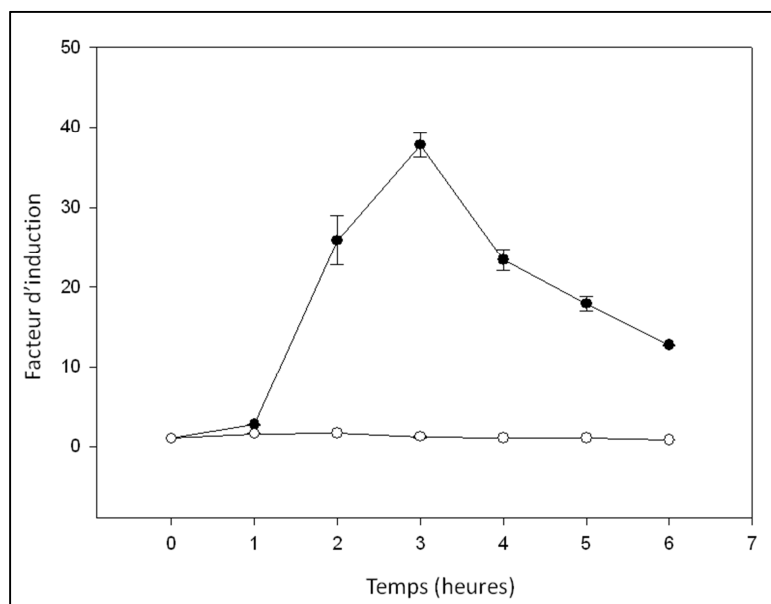
**Figure 2.3.** Induction de la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP en présence (induit) ou non (non induit) de céphalosporine C (2,5  $\mu$ g/ml) pour les souches de *B. subtilis* transformées par le pDML995 (divergeon *bla* sauvage ; ●) ou par le pDML3045 (mutation  $R^{304}A/R^{305}A$  de *blaR1* ; ○). Le niveau d'induction est exprimé sous forme d'un facteur d'induction qui est le rapport entre la quantité de  $\beta$ -lactamases produites par les cellules induites et la quantité de  $\beta$ -lactamases produites par les cellules non induites. La quantité de cellules est mesurée par l'absorbance à 600 nm ( $A^{600}$ ).

Pour déterminer si ce clivage peut être le résultat de l'activité protéolytique de la boucle L3, nous avons introduit la mutation  $E^{213}A$  dans la séquence codant pour BlaR1. Dans ce mutant, l'activité catalytique de la boucle L3 est abolie puisque l'acide aminé muté est l'acide glutamique conservé du motif HExxH impliqué dans le relais acide-base des enzymes de la famille des métalloprotéases à zinc neutres. La mutation  $E^{213}A$  a été introduite sur le pG-BlaR à l'aide du kit « QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene). Le vecteur résultant, le pGBlaR-E213A, a été digéré par les enzymes de restriction *SstI* et *EcoRI*. Le fragment résultant a été inséré dans le pDML995 digéré par les mêmes enzymes de restriction afin de donner le pDML1269. La séquence de ce vecteur a été vérifiée par séquençage.

La capacité de *B. subtilis* transformé par le pDML1269 à induire la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP a été testée. Comme attendu, il s'est avéré que cette souche n'est pas inductible (figure 2.4).



L'état de la protéine BlaR1 portant la mutation E<sup>213</sup>A dans la fraction membranaire d'une culture de *B. subtilis*/pDML1269 induite, a également été analysé par Western blot comme décrit pour le mutant R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A. Comme montré à la figure 2.2, aucun clivage de BlaR-E<sup>213</sup>A n'a pu être détecté en présence de l'inducteur, ce qui suggère que ce répresseur est activé par auto-protéolyse.



**Figure 2.4.** Induction de la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP en présence (induit) ou non (non induit) de céphalosporine C (2,5  $\mu$ g/ml) pour les souches de *B. subtilis* transformées par le pDML995 (divergeon *bla* sauvage ; ● ) ou par le pDML1269 (mutation E<sup>213</sup>A de *blaR1* ; ○ ). Pour plus de détails, voir la légende de la figure 2.3.

### 2.1.3. Spécificité de l'acide glutamique catalytique

La mutation de l'acide catalytique E<sup>231</sup> de la boucle L3 en alanine implique un phénotype non inductible et empêche l'activation par clivage de la boucle L3. Ce résidu est donc essentiel pour la protéine BlaR1. Il serait intéressant de déterminer si c'est la fonction acide et/ou la structure de la chaîne latérale de ce résidu qui est importante. Afin de le déterminer, nous avons étudié par Western blot, à l'aide d'anticorps dirigés contre BlaR-CTD, les mutants E<sup>213</sup>D et E<sup>213</sup>Q. Le remplacement de l'acide glutamique par un acide aspartique modifie la chaîne latérale mais permet de conserver une fonction acide, alors que la glutamine présente la même chaîne latérale que l'acide glutamique mais n'a pas la fonction acide. Pour cela, nous avons utilisé des souches de *B. subtilis* transformées respectivement par les plasmides pDLM1279 et pDML1280 (K. Benlafya, Thèse de doctorat ; table 2.1).

Il apparaît que la modification du résidu catalytique en acide aspartique (mutation E<sup>213</sup>D) ou en glutamine (mutation E<sup>231</sup>Q) a pour effet d'empêcher le clivage de la boucle L3 (figure 2.5). Le résidu catalytique doit donc nécessairement être un acide glutamique qui est essentiel aussi bien pour sa fonction acide que pour sa chaîne latérale.

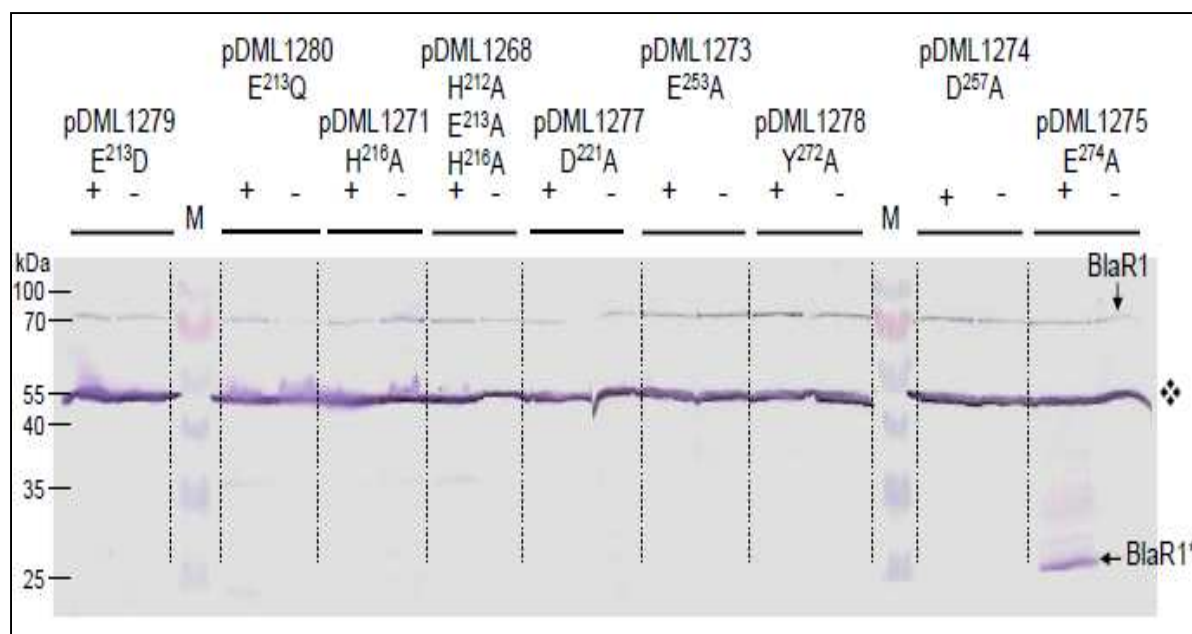
**Table 2.1.** Liste des plasmides construits par K. Benlafya et utilisés dans ce travail

Plasmide	Caractéristiques
pDML1268	Dérivé du pDML995 portant la mutation H <sup>212</sup> A/E <sup>213</sup> A/H <sup>216</sup> A
pDML1271	Dérivé du pDML995 portant la mutation H <sup>216</sup> A
pDML1273	Dérivé du pDML995 portant la mutation E <sup>253</sup> A
pDML1274	Dérivé du pDML995 portant la mutation D <sup>257</sup> A
pDML1275	Dérivé du pDML995 portant la mutation E <sup>274</sup> A
pDML1277	Dérivé du pDML995 portant la mutation D <sup>221</sup> A
pDML1278	Dérivé du pDML995 portant la mutation Y <sup>272</sup> A
pDML1279	Dérivé du pDML995 portant la mutation E <sup>213</sup> D
pDML1280	Dérivé du pDML995 portant la mutation E <sup>213</sup> Q

#### 2.1.4. Les ligands du zinc

Le motif H<sup>212</sup>ExxH est caractéristique des métalloprotéases à zinc. Dans cette famille de protéines, les deux premiers ligands du zinc sont les résidus histidines de ce motif conservé. La mutation de ces résidus histidines a été étudiée par Western blot à l'aide de deux mutants : le mutant H<sup>212</sup>A/E<sup>213</sup>A/H<sup>216</sup>A et le mutant H<sup>216</sup>A. A cette fin, les plasmides portant ces mutations, nommés respectivement pDML1268 et pDML1271 (Table 2.1) et construits par K. Benlafya, ont été transformés dans *B. subtilis*. Comme montré à la figure 2.5, ces deux mutations empêchent le clivage de BlaR1.

La majorité des métalloprotéases possèdent un troisième ligand du zinc. Les candidats potentiels pour ce rôle sont en général des résidus d'histidines, d'acide glutamique, d'acide aspartique ou de tyrosine. L'alignement de séquences de la protéine BlaR1 de *B. licheniformis* avec celles des protéines BlaR1 et MecR de *S. aureus*, permet de mettre en évidence cinq résidus conservés pouvant jouer le rôle de troisième ligand du zinc (figure 2.1) : le D<sup>221</sup>, le E<sup>253</sup>, le D<sup>257</sup>, le Y<sup>272</sup> et le E<sup>274</sup>. Cinq plasmides, portant chacun la mutation en alanine d'un de ces résidus (table 2.1), ont été insérés dans *B. subtilis*. Les extraits membranaires des cultures de ces souches transformées ont été analysés par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre BlaR-CTD. Il apparaît que seul le mutant E<sup>274</sup>A a le même profil que la protéine sauvage (figure 2.5). Les quatre autres mutants ne sont pas capables de cliver la boucle L3.



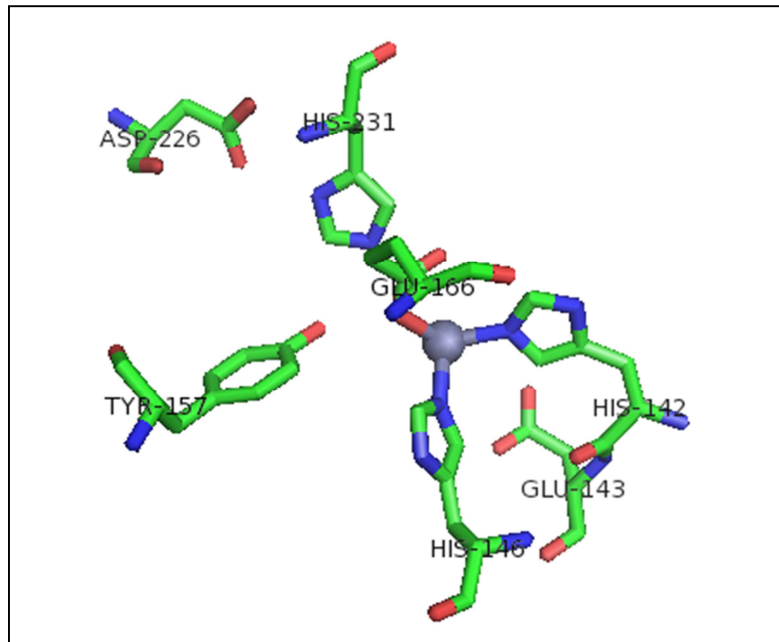
**Figure 2.5.** Analyse par Western blot de la protéine BlaR1 produite par des souches de *B. subtilis* portant des plasmides contenant les mutants de *blaR1*. Les protéines membranaires de cultures induites (+) ou non induites (-) ont été séparées par SDS-PAGE. Les anticorps utilisés sont des anticorps anti-BlaR-CTD purifiés. Le symbole « ❖ » met en évidence une bande intense et non spécifique. BlaR1 et BlaR1\* indiquent respectivement le récepteur BlaR1 entier ou activé. (M : marqueur de masse moléculaire)

### 2.1.5. Discussion

La protéine membranaire BlaR1 est un récepteur composé de 2 domaines. Le domaine C-terminal, extracellulaire, agit comme senseur des antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame. Le domaine N-terminal, ancré dans la membrane par quatre segments transmembranaires, possède une boucle exposée à l'intérieur de la cellule qui est une métalloprotéase à zinc de la famille de la thermolysine.

En effet, la séquence de la boucle L3 possède le motif conservé HExxH caractéristique des métalloprotéases à zinc (Hooper, 1994). Les 2 histidines de la séquence HExxH sont des ligands du zinc, alors que l'acide glutamique est impliqué dans le mécanisme catalytique. Dans la boucle L3, un second motif conservé, E<sup>253</sup>xxxD, peut également être mis en évidence. Ce motif est également présent dans la thermolysine et est caractéristique de la famille des métalloprotéases appelées les gluzincines (Le Moual *et al.*, 1993). Dans les enzymes appartenant à cette famille, le troisième ligand du zinc est l'acide glutamique du motif ExxxD qui est situé de 20 à 59 résidus en aval du motif HExxH. Dans la boucle L3 de BlaR1/MecR, le motif ExxxD est situé à 37 résidus en aval du motif HExxH. Pour les gluzincines ou TLPs (pour Thermolysin-like proteinases), il a été montré que le deuxième résidu histidine du motif HExxH interagit avec l'ion zinc mais également avec la fonction carboxylique de la chaîne latérale de l'acide aspartique du second motif conservé. Le rôle exact de cette triade, Zn-His-Asp, n'est pas bien compris mais semble crucial pour l'activité catalytique et dans certain cas pour la liaison du Zn<sup>2+</sup> (Le Moual *et al.*, 1993, Gao *et al.*, 2010) (figure 2.6). En absence de substrat, une molécule d'eau joue le rôle de quatrième ligand du zinc. Au cours de la catalyse, l'acide glutamique catalytique accepte un proton de la molécule d'eau nucléophile liée au zinc et le transfert au

substrat. De plus, la stabilisation de l'état de transition est assurée par la chaîne latérale d'un résidu histidine dans le cas de la thermolysine ( $H^{231}$ ) (figure 2.6).



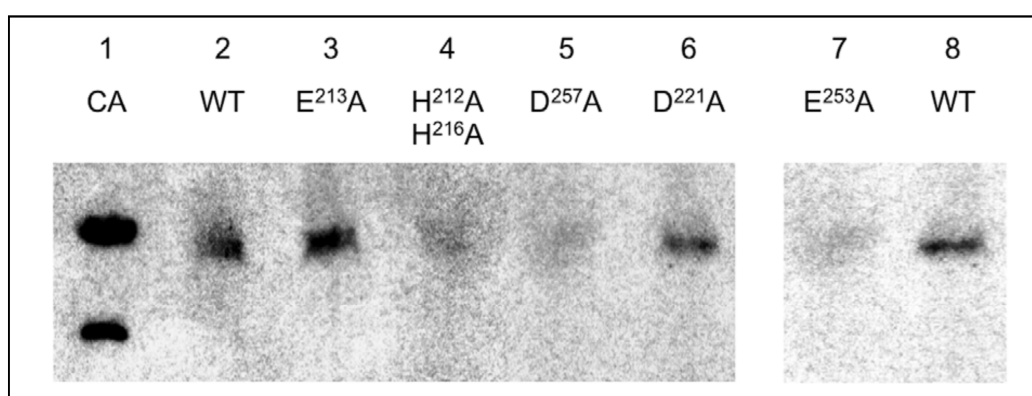
**Figure 2.6.** Représentation du site de liaison au zinc de la thermolysine.

Tout comme de nombreuses enzymes protéolytiques, les TLPs sont synthétisées sous forme de précurseurs avec un propeptide. Le clivage du propeptide est un processus autolytique combinant l'activation du domaine catalytique et le changement d'interaction entre le propeptide et le domaine catalytique (Gao *et al.*, 2010). Le site de clivage d'activation de la boucle L3 a été déterminé lors de ce travail et se situe entre les résidus arginine 304 et 305. En effet, le mutant  $R^{304}A/R^{305}A$  a perdu la capacité d'induire la  $\beta$ -lactamase BlaP et il ne subit pas de clivage. Le mutant  $H(E^{213}A)xxH$ , ne subit pas non plus de protéolyse et a également un phénotype non-inductible pour la  $\beta$ -lactamase. Ces résultats sont en accord avec le fait que le résidu d'acide glutamique agit en tant que résidu catalytique, que la boucle L3 a une activité peptidasique et que son activation est autoprotéolytique.

L'analyse par Western blot des différents mutants des autres résidus conservés de la boucle L3, combinée à l'étude de la capacité de ces mêmes mutants à induire la production de  $\beta$ -lactamases et à des expériences de zinc-blot (figure 2.7) (Berzigotti *et al.*, 2012), a confirmé que la boucle L3 possède les éléments caractéristiques des sites actifs des TLPs :

- Les mutants des résidus histidines du motif HExxH ne subissent pas de clivage d'activation, sont non inductibles et ne peuvent coordonner l'ion zinc. Ces résidus sont donc probablement les 2 premiers ligands du zinc.
- Les mutants  $E^{253}A$  et  $D^{257}A$ , qui ne sont pas protéolysés, qui ont un phénotype non-inductible et qui ont perdu la capacité de lier le zinc, montrent que ces résidus sont importants pour l'activité enzymatique de L3. Ce sont les résidus du second motif conservé ExxxD. Ainsi, l'acide glutamique de ce motif serait le troisième ligand du zinc et l'acide aspartique ferait partie de l'interaction carboxylate-histidine-zinc crucial pour l'activité des TLPs.

- Le résidu conservé Y<sup>272</sup>, dont la mutation en alanine donne lieu à une protéine non active, est probablement impliqué dans la stabilisation du complexe intermédiaire tétraédrique durant la catalyse de la boucle. En effet, pour la carboxypeptidase A, dont la topologie du site actif est la même que celle de la thermolysine, c'est le résidu Y<sup>248</sup> qui joue ce rôle (Hausrath & Matthews, 1994). Dans la thermolysine, c'est le résidu H<sup>231</sup> qui est à la position spacial de Y<sup>248</sup> de la carboxypeptidase A mais il n'y a pas de résidu histidine conservé dans la boucle L3.
- Le mutant inactif D<sup>221</sup>A montre que cet acide aspartique est important pour l'activité de la métalloprotéase. Etant donné que la chaîne latérale de ce résidu est chargée négativement, il est difficile de concevoir qu'elle pourrait interagir directement avec l'intermédiaire tétraédrique qui est lui aussi chargé négativement. Une autre hypothèse est que cet acide aspartique pourrait être important pour la liaison au substrat.



**Figure 2.7.** Analyse par zinc-blot de la boucle L3 de BlaR1 de *B. licheniformis* sauvage et de différents mutants (Berzigotti *et al.*, 2012). 1: L'anydrase carbonique bovine (CA ; 30kDA) qui a été utilisée comme contrôle positif. 2 et 8 : boucle L3 sauvage (WT). 3 à 7 : mutants de la boucle L3.

L'activation de la boucle L3 de BlaR1 est le résultat d'une cascade d'évènements qui débute par l'acylation du senseur C-terminal par la pénicilline et finit pour l'auto-protéolyse du domaine TLP du récepteur. Il a été postulé que le clivage de la boucle L3 serait provoqué par un changement conformationnel des segments transmembranaires de BlaR1. Ce changement conformationnel serait quant à lui dû à la modification de l'interaction entre BlaR-CTD et BlaR-NTD en présence de pénicilline (Hanique *et al.*, 2004).

Le mutant du site de clivage R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A nous donne de nouvelles informations sur le mécanisme de transduction intramoléculaire. En effet, en présence d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, l'acylation du récepteur BlaR1 muté donne lieu à une légère induction de la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP (environ 20% de la quantité produite par la souche contenant la protéine sauvage) mais aucun clivage de la boucle L3 n'est observé. En fait, avec ce mutant, nous avons découplé l'activité de la boucle L3 due à l'acylation de BlaR-CTD de celle causée par son autoprotéolyse. Les résultats de l'analyse de l'induction de BlaP indiquent que la boucle L3 non clivée garde une activité résiduelle qui semble être capable de produire une quantité suffisante de coactivateur pour inactiver partiellement BlaI. Ainsi, il serait nécessaire que l'acylation de BlaR-CTD active légèrement la boucle L3 pour permettre sa propre protéolyse et son activation complète.

Les résultats obtenus lors de ce travail semblent montrer la présence d'un propeptide inhibant le domaine TLP de BlaR1 qui serait localisé dans la partie C-terminale de ce domaine TLP. Le clivage

de ce propeptide a pour résultat l'activation de l'activité peptidasique, mais on ne sait pas si le peptide C-terminal reste associé ou non au domaine actif. Le site de clivage devrait être localisé dans le motif conservé  $K^{303}(R/E)^{\downarrow}R$  (figure 2.1) (« $\downarrow$ » indique la liaison peptidique clivée), et non le motif  $R^{304}\downarrow R$  comme décrit précédemment (Zhang *et al.*, 2001). La présence d'un propeptide C-terminal qui inhibe l'activité TLP de la boucle L3 et qui est clivé par auto-protéolyse pour permettre une activation complète de la boucle L3 serait unique aux protéines BlaR1/MecR dans la superfamille des TLPs.

En conclusion, la boucle L3 de BlaR1/MecR est une gluzincine et un nouveau membre de la superfamille des TLPs. Elle a dû diverger très tôt des TLPs canonicales puisqu'aucune identité significative entre la boucle L3 et les TLPs ne peut être mise en évidence en utilisant les algorithmes tel qu'un BLAST. L'activité de la boucle L3 serait réprimée par la combinaison de deux interactions intramoléculaires : la première entre la boucle L3 et son propeptide C-terminal et la seconde entre la boucle L2 et BlaR-CTD.

## 2.2. Production et purification de la boucle L3 de BlaR1 et du récepteur entier

Afin de mettre en évidence et d'étudier l'activité métalloprotéasique de la boucle cytoplasmique L3 du récepteur BlaR1, il serait intéressant de produire la protéine BlaR1 entière ou la boucle isolée sous forme soluble. La production de la protéine BlaR1 entière aurait également l'intérêt de permettre une étude structurale.

### 2.2.1. Production et purification de la boucle L3 de la protéine BlaR1

De nombreuses expériences réalisées précédemment au laboratoire ont montré que la production de la boucle L3 sous forme soluble s'avère difficile. Pour cette raison, nous avons envisagé de réaliser plusieurs constructions qui nous permettraient d'obtenir la boucle L3 en fusion N-terminale avec différents partenaires protéiques (NusA, GST, MBP ou une étiquette StrepTag). Les différents vecteurs dans lesquels a été insérée la séquence codant pour la boucle L3 sont : le pET43.1 Ek/LIC (NusA), le pGex-5x-1 (GST), le pMal-c2x (MBP) et le pET52b (StrepTag).

#### 2.2.1.1. Constructions génétiques

La séquence nucléotidique codant pour la boucle L3 (Y<sub>134</sub>-K<sub>322</sub>) a été amplifiée à partir du pDML995 à l'aide des quatre paires d'oligonucléotides suivantes : L3G5' et L3Sall3' pour la fusion avec la GST ; L3M5' et L3Sall3' pour la fusion avec la MBP ; L3S5' et L3Sall3' pour la fusion avec une StrepTag ; L3NusA5' et L3NusA3' pour la fusion avec NusA (cf § 4.7.1).

Les séquences amplifiées par les trois premières paires d'oligonucléotides ont été clonées dans le pGEM T-Easy. Les vecteurs résultants ont été appelés pGEM-L3G, pGEM-L3M et pGEM-L3S. La séquence de la boucle L3 a été vérifiée par séquençage pour chaque plasmide. Les sites de restriction *Bam*HI et *Sall*, introduits grâce aux oligonucléotides, ont permis d'extraire les inserts des pGEM et de les cloner dans leur vecteur de production respectif. Les vecteurs ainsi construits ont été nommés pGEX-L3, pMAL-L3 et pET52b-L3 (figure 2.8).

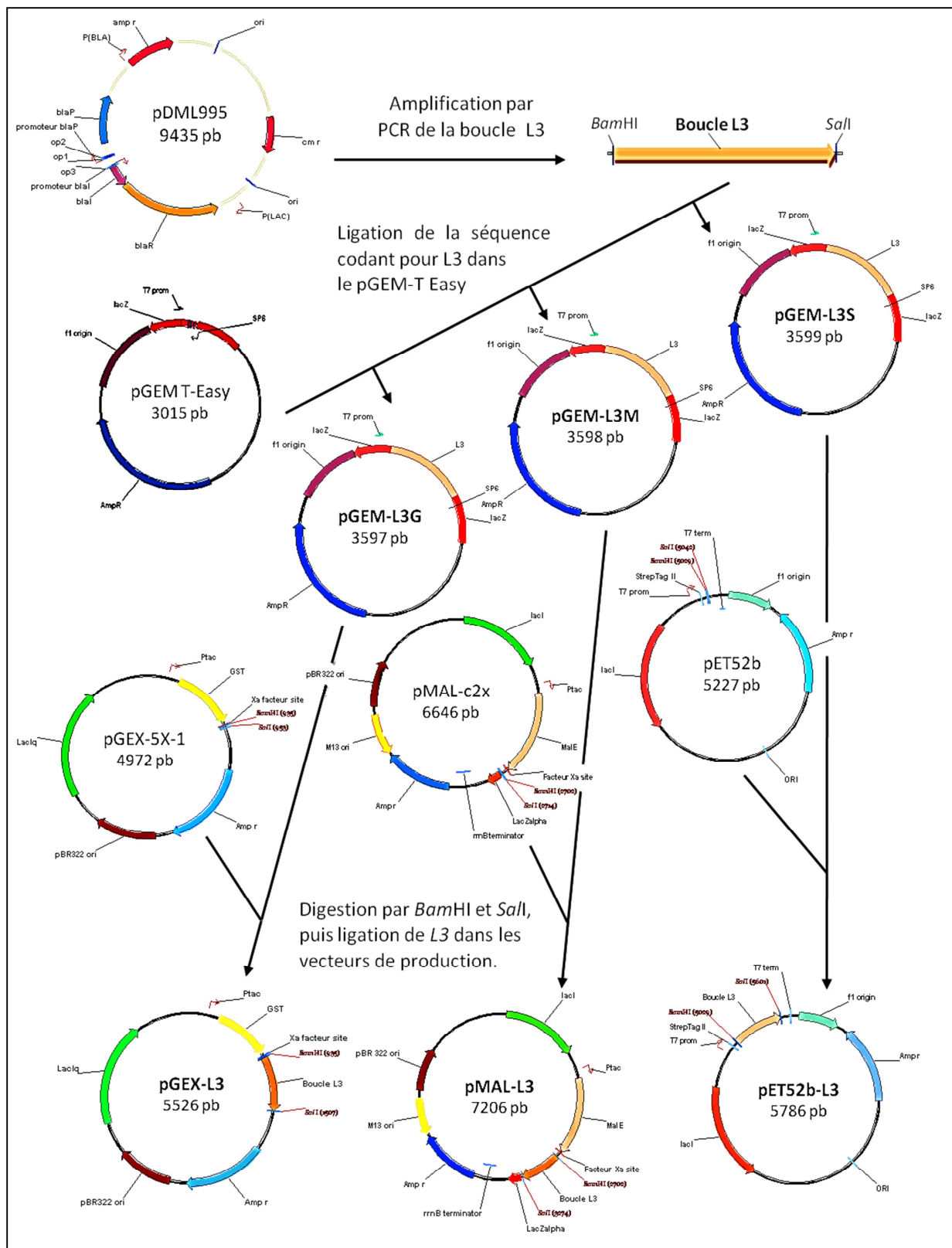
Une quatrième PCR L3 a été réalisée à l'aide d'oligonucléotides qui présentent à leur extrémité des séquences appelées « séquence EK/LIC » :

L3NusA5' : 5'-GACGACGACAAGATATATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'  
séquence EK/LIC 5'      début de la séquence de L3

L3NusA3' : 5'-GAGGAGAAGCCCGTTATTTGCCTTTAGCAAAGGTGAT-3'  
séquence EK/LIC 3'      Fin de la séquence de L3

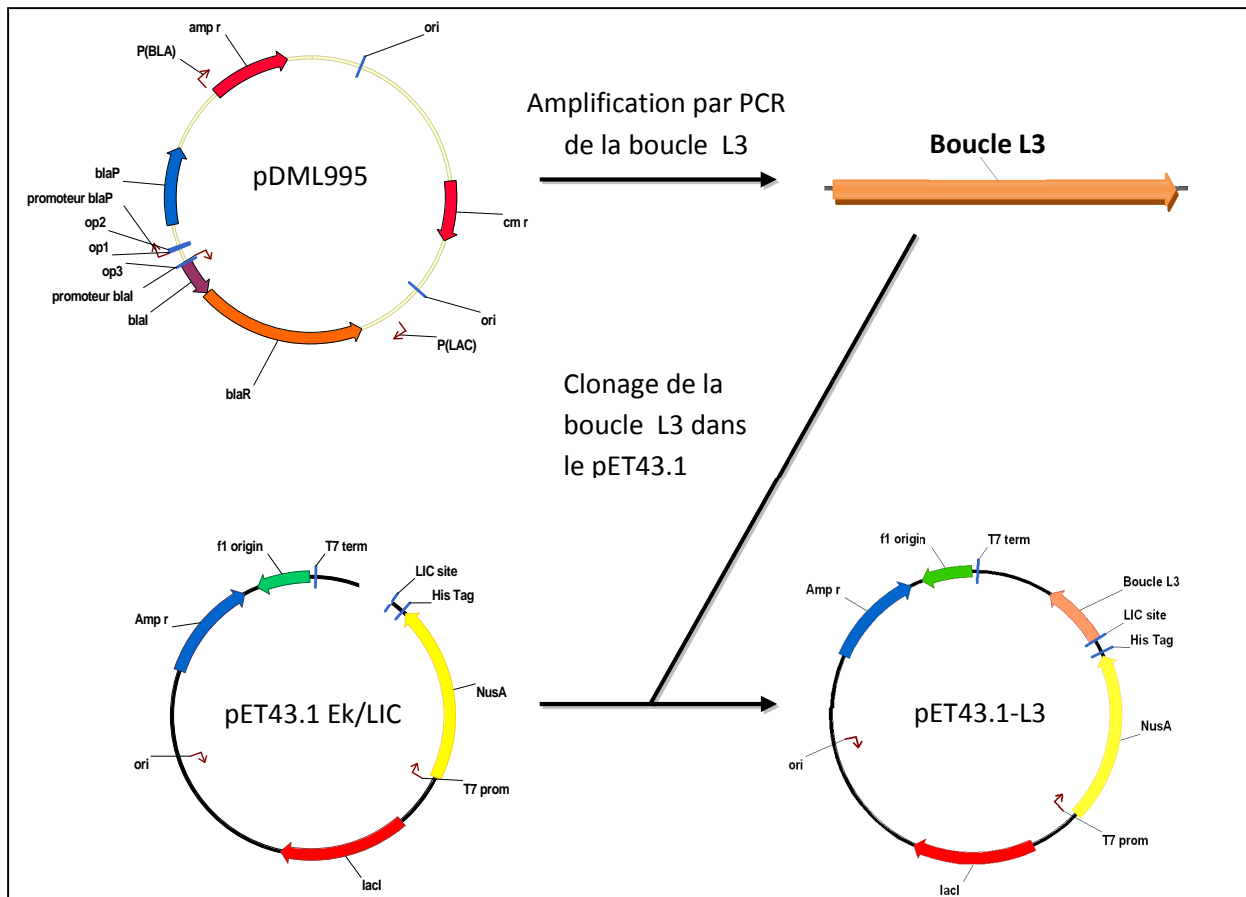
La séquence de la boucle L3 amplifiée à partir de ces oligonucléotides a été directement clonée dans le pET43.1 Ek/LIC grâce aux extrémités EK/LIC flottantes introduites. En effet ce plasmide commercial est linéarisé et possède des extrémités flottantes complémentaires aux séquences EK-LIC. Le plasmide obtenu a été nommé pET43.1-L3 et la séquence de l'insert a été vérifiée par séquençage (figure 2.9).





**Figure 2.8.** Schéma de la stratégie de construction des plasmides pGEX-L3, pMAL-L3 et pET52b-L3. La séquence nucléotidique de la boucle L3 a été amplifiée par PCR à l'aide de trois paires de nucléotides différentes puis introduite dans le pGEM T-Easy. Les trois vecteurs obtenus ont été digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Sal*I. Les séquences codant pour la boucle L3 ont ensuite été clonées dans les vecteurs de production préalablement digérés par les mêmes enzymes.

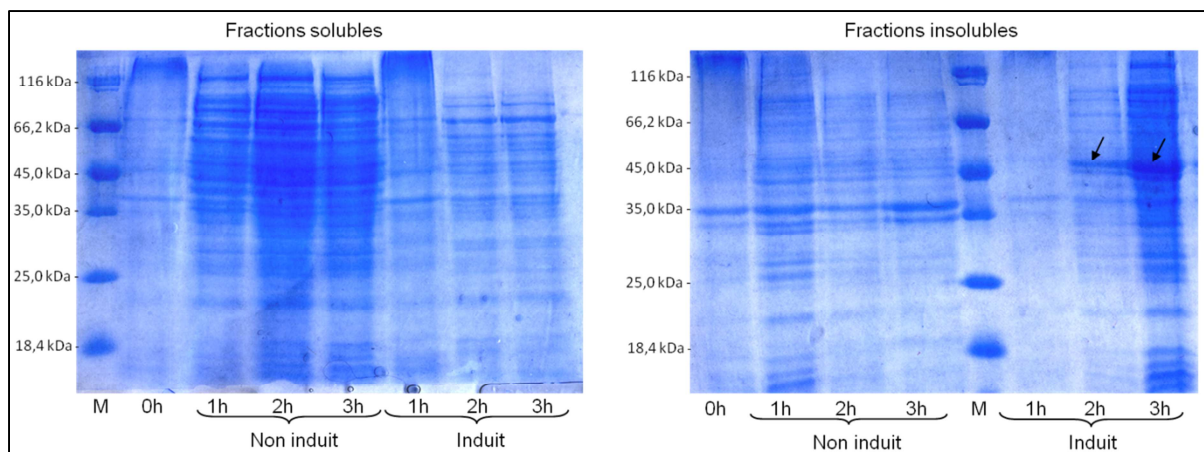




**Figure 2.9.** Schéma de la stratégie de clonage de la boucle L3 dans le pET43.1 Ek/LIC. La séquence nucléotidique codant pour la boucle L3 a été amplifiée puis directement clonée dans le pET43.1-EK/LIC grâce aux séquences EK-LIC introduites aux extrémités par les oligonucléotides.

### 2.2.1.2. Production de la boucle L3 en fusion avec la GST

Pour produire la protéine fusion GST-L3, nous avons utilisé la souche *E. coli* BL21 DE3 transformée par le pGEX-L3 et cultivée dans du milieu LB additionné d'ampicilline 100 µg/ml. 50 ml de milieu de culture ont été inoculés par 1 ml d'une préculture de 16 h et placés à 37°C. Lorsque l' $A^{600}$  a atteint la valeur de 0,8, la production a été induite par l'ajout d'IPTG (1mM final). Ensuite, l' $A^{600}$  a été mesurée et un échantillon a été prélevé après 1, 2, 3 et 24 heures d'induction. Tous les échantillons prélevés ont été centrifugés à 14000 g pendant 15 minutes pour récolter les cellules qui ont ensuite été remises en suspension dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7 par unité d' $A^{600}$ . Une lyse par sonication (3 fois 15 secondes) suivie d'une centrifugation de 15 minutes à 14000 g permet de séparer les fractions soluble et insoluble. La fraction insoluble a été resuspendue dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7 par unité d' $A^{600}$ . Les fractions solubles et insolubles des différents échantillons ont ensuite été analysées sur SDS-PAGE 12% (figure 2.10). L'analyse sur gel montre la présence de la protéine à sa taille attendue, c'est-à-dire environ 47 kDa, dans la fraction insoluble, probablement sous forme de corps d'inclusion.

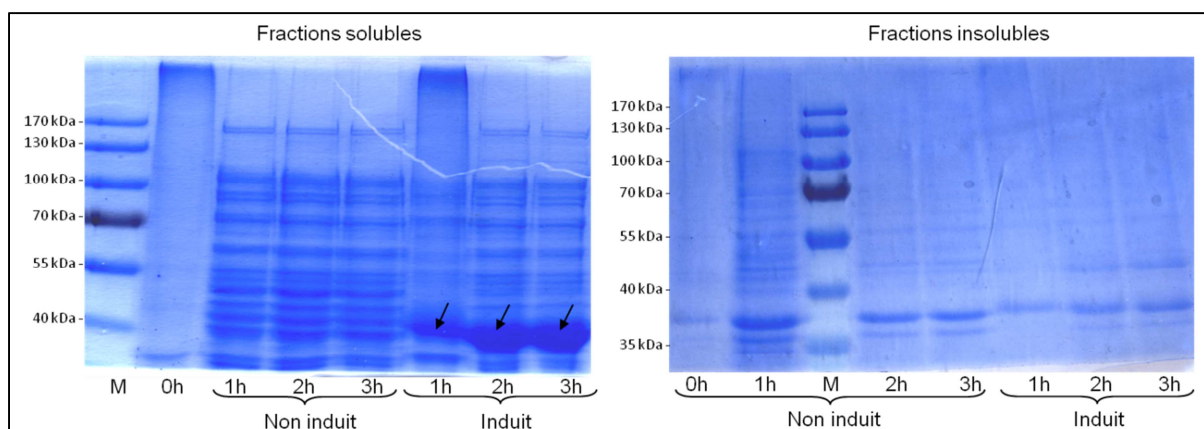


**Figure 2.10.** Analyses par SDS-PAGE 12% des différentes fractions solubles et insolubles récoltées après 0, 1, 2 et 3 heures d'induction à 37°C lors du test de production de la protéine fusion GST-L3. M : marqueur de masse moléculaire. Les flèches indiquent la bande protéique induite.

Nous avons ensuite réalisé un test de production de la protéine GST-L3 en abaissant la température de culture de 37°C à 18°C et en augmentant la durée d'induction de 3h à 24h, afin d'éviter la formation de corps d'inclusion. Malheureusement, nous avons obtenu les mêmes résultats à 18°C qu'à 37°C.

### 2.2.1.3. Production de la boucle L3 en fusion avec la MBP

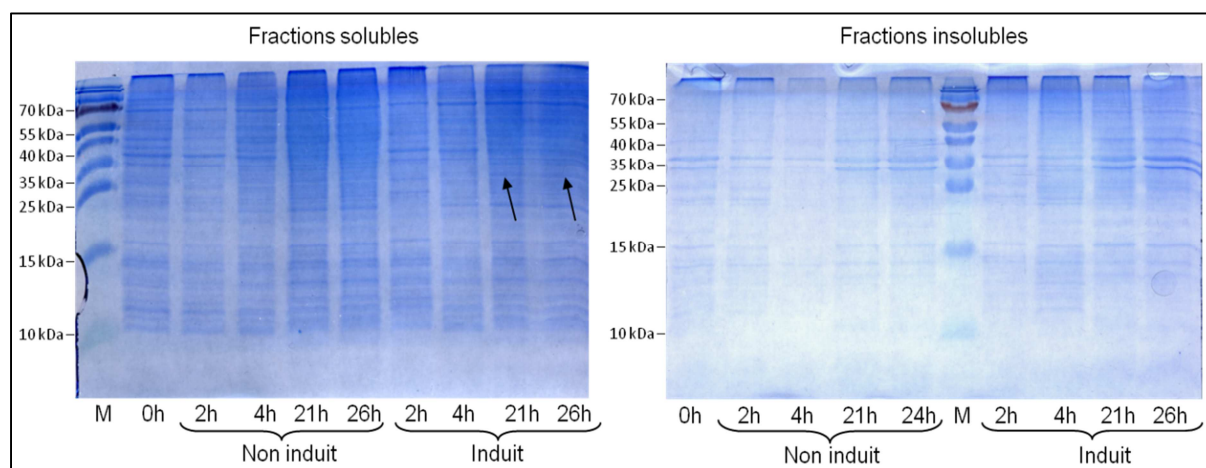
Un test de production de la protéine fusion MBP-L3 a été réalisé avec la souche *E. coli* BI21 DE3 transformée par le plasmide pMAL-L3 et cultivée dans un milieu LB additionné d'ampicilline 100 µg/ml. Le protocole est identique à celui du test de production de la fusion GST-L3 à 37°C. L'analyse par SDS-PAGE 12% des différentes fractions solubles et insolubles montre la surproduction d'une protéine d'une taille d'environ 40 kDa qui ne correspond pas à la taille attendue pour la protéine MBP-L3, c'est-à-dire 52 kDa. La protéine MBP-L3 subirait une protéolyse limitée après avoir été surproduite (figure 2.11).



**Figure 2.11.** Analyse par SDS-PAGE 12% des différentes fractions solubles et insolubles prélevées après 0, 1, 2 et 3 heures d'induction à 37°C, lors du test de production de la protéine fusion MBP-L3. M : marqueur de masse moléculaire. Les flèches indiquent la bande protéique induite.

#### 2.2.1.4. Production de la boucle L3 en fusion avec une StrepTag

La boucle L3 en fusion N-terminale avec une étiquette StrepTag a été produite chez *E. coli* BL21 DE3 transformée par le plasmide pET52b-L3 dans un milieu LB additionné d'ampicilline 100 µg/ml. Le protocole de production est le même que celui utilisé pour les autres tests de production de la boucle L3 en fusion avec un partenaire protéique. L'analyse par SDS-PAGE 15% des différentes fractions solubles et insolubles montre que la protéine surproduite est présente dans la fraction insoluble et migre à la taille attendue pour la boucle L3 en fusion avec une étiquette StrepTag, c'est-à-dire environ 25 kDa (résultats non illustrés). Par contre, un test de production à 18°C pendant 26h permet d'obtenir une faible surproduction à la taille attendue dans la fraction soluble (figure 2.12).



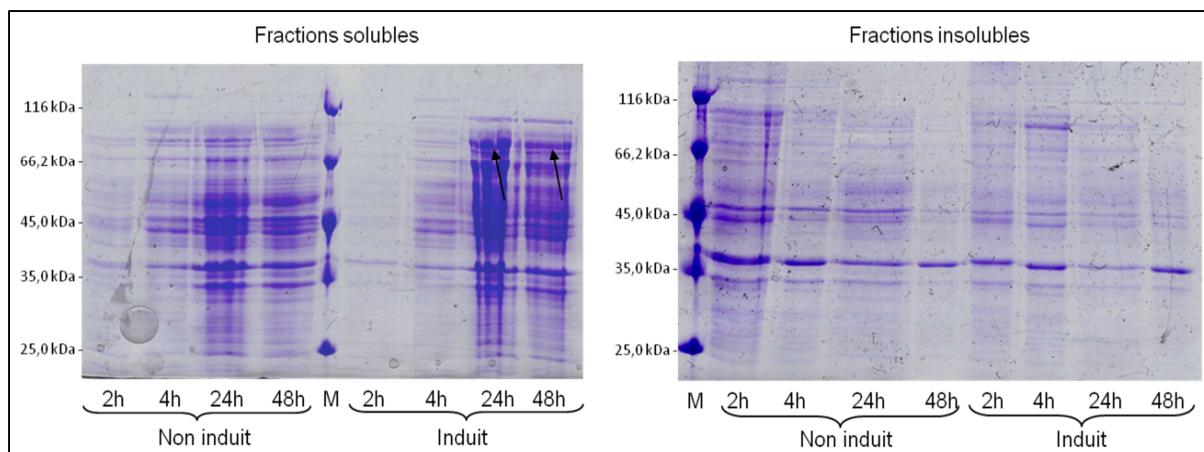
**Figure 2.12.** Analyse par SDS-PAGE 15% des différentes fractions solubles et insolubles prélevées après 0, 2, 4, 21 et 26 heures, lors du test de production à 18 °C de la boucle L3 avec une étiquette StrepTag à l'extrémité N-terminale. M : marqueur de masse moléculaire. Les flèches indiquent la bande protéique induite.

#### 2.2.1.5. Production de la boucle L3 en fusion avec NusA

Pour produire la boucle L3 en fusion avec la protéine NusA, nous avons utilisé des cellules *E. coli* BL21 DE3 transformées par le plasmide pET43.1-L3 et un milieu de culture LB additionné d'ampicilline 100 µg/ml.

Des tests de production réalisés dans les mêmes conditions que précédemment, ont montré que la protéine pouvait être surproduite en quantité satisfaisante dans la fraction soluble lorsque la température de culture était de 18°C, après une durée de 24 à 48h et avec une concentration d'inducteur (l'IPTG) de 1 mM (figure 2.13).

Nous avons ensuite réalisé une production de NusA-L3 dans 2 litres de milieu de culture inoculés par 50 ml d'une préculture de 16h à 37°C. La production a été induite à l'IPTG (1mM final) à 18°C pendant 24h. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation 10 minutes à 6000 g puis remises en suspension dans 240 ml de tampon Tris-HCl 20 mM pH8. La sonication (3 fois 3 minutes) suivie d'une centrifugation de 30 minutes à 39000 g, a permis de séparer les fractions solubles et insolubles.



**Figure 2.13.** Analyse par SDS-PAGE 12% des différentes fractions solubles et insolubles prélevées après 2, 4, 24 et 48 heures, lors du test de production à 18 °C de la protéine fusion NusA-L3. M : marqueur de masse moléculaire. Les flèches indiquent la bande protéique induite.

#### 2.2.1.6. Purification de la protéine fusion NusA-L3

Afin de purifier la protéine NusA-L3, nous avons utilisé une colonne Chelating Sepharose Fast Flow de 30 ml (Amersham Bioscience) sur laquelle ont été immobilisés des ions  $\text{Ni}^{2+}$ . En effet, une queue HisTag est présente dans la construction NusA-L3 au niveau du linker qui relie les deux partenaires protéiques.

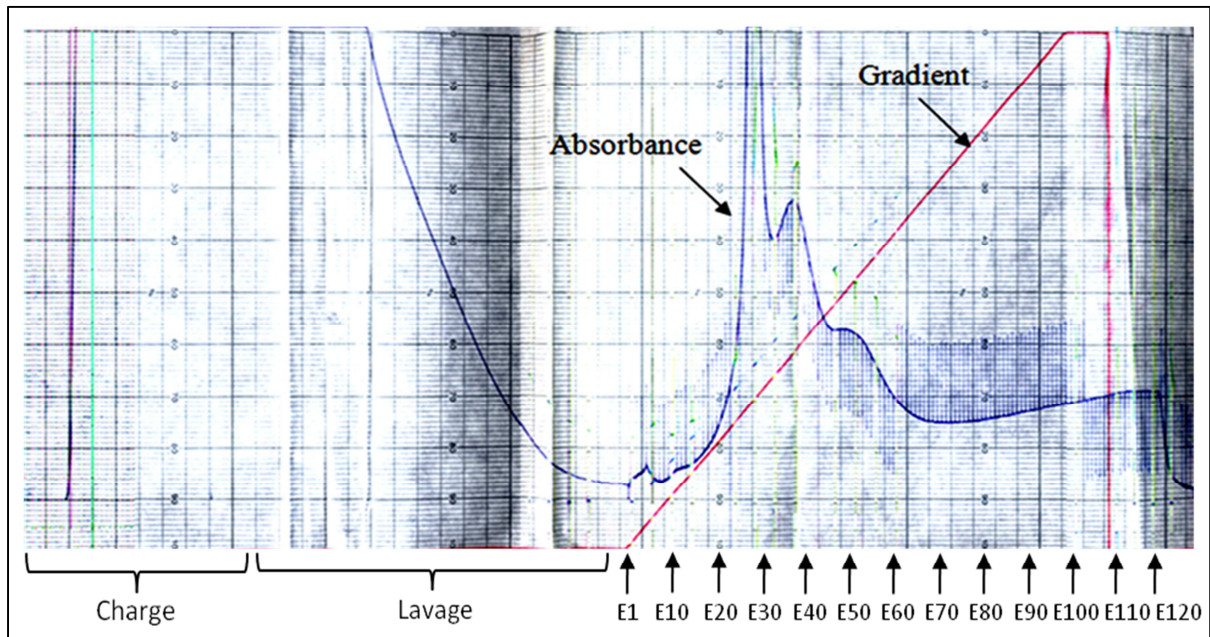
La chromatographie d'affinité a été réalisée de manière suivante :

- La colonne a été équilibrée avec 60 ml de tampon A (tampon A : Tris-HCl 20 mM pH 8) avec un débit de 3 ml/minute
- L'échantillon a été déposé sur la colonne avec un débit de 1,5 ml/minute
- La colonne a été lavée avec 60 ml de tampon A avec un débit de 3 ml/minute
- Un gradient de 0 à 100 % en tampon B (tampon B : Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 0,5 M, Imidazole 0,25 M) a été réalisé sur un volume de 300 ml, suivi d'un plateau à 100 % en tampon B sur un volume de 30 ml. Ensuite, l'élution passe de 100% à 0% en tampon B sur 1 ml, et pour finir, un volume de 60 ml à 0%. L'élution a été réalisée avec un débit de 3 ml/minutes

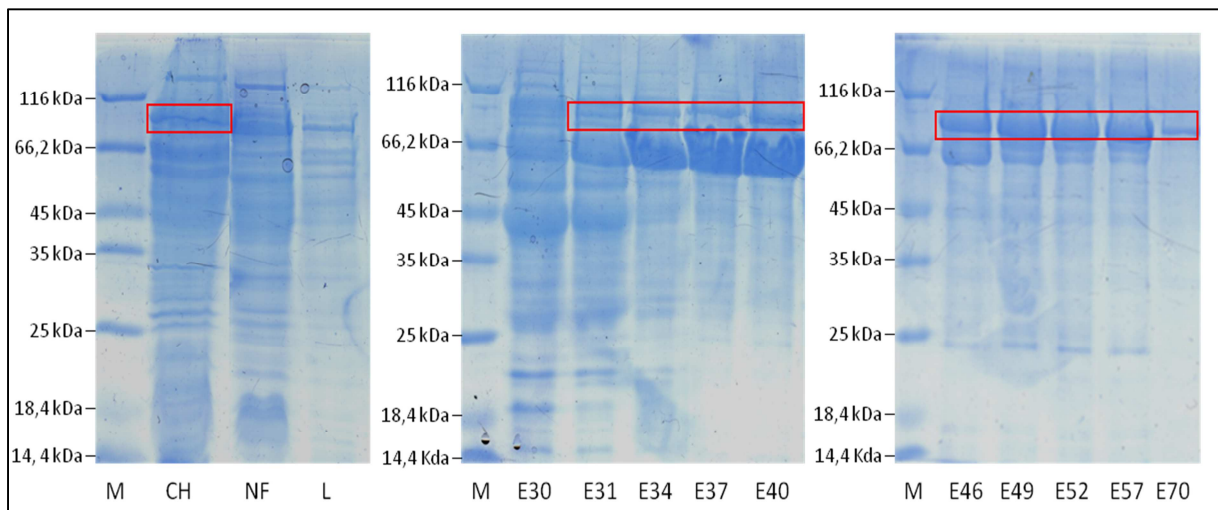
L'ensemble du processus chromatographique a été suivi par une mesure en continu de l'absorbance à 280 nm (figure 2.14). Les fractions récoltées, d'un volume de 3ml, ont ensuite été analysées par SDS-PAGE (figure 2.15).

La protéine NusA-L3 est visible dans les fractions E34 à E70. Dans les fractions E34 à E57, on remarque également la présence d'une protéine abondante de masse moléculaire d'environ 65 kDa. La séquence N-terminale de cette protéine a été déterminée et montre que cette bande correspond à la protéine NusA libre. Cette dégradation pourrait être due à l'activité protéolytique d'une enzyme cytoplasmique d'*E. coli* ou à l'activité métalloprotéasique de la boucle L3.





**Figure 2.14.** Profil chromatographique de la purification de la protéine fusion NusA-L3 sur colonne Ni-NTA. L'échantillon protéique a été déposé sur la colonne. Celle-ci a ensuite été lavée avec 60 ml de tampon Tris-HCl 20mM pH8. Un gradient de 0 à 100% d'un tampon contenant 0,25 M d'Imidazole a ensuite permis d'éluer les protéines adsorbées sur la colonne. E1 à E120 : fractions d'élution de 3 ml numérotée de 1 à 120.



**Figure 2.15.** Analyse par SDS-PAGE 12% des fractions récoltées lors de la chromatographie sur colonne Ni-NTA de la protéine fusion NusA-L3. M : marqueur de masse moléculaire ; CH : fraction de charge ; NF : protéines non adsorbées ; L : fraction de lavage ; E30-70 : fractions d'élution 30 à 70.

## 2.2.2. Production et purification de la protéine BlaR1

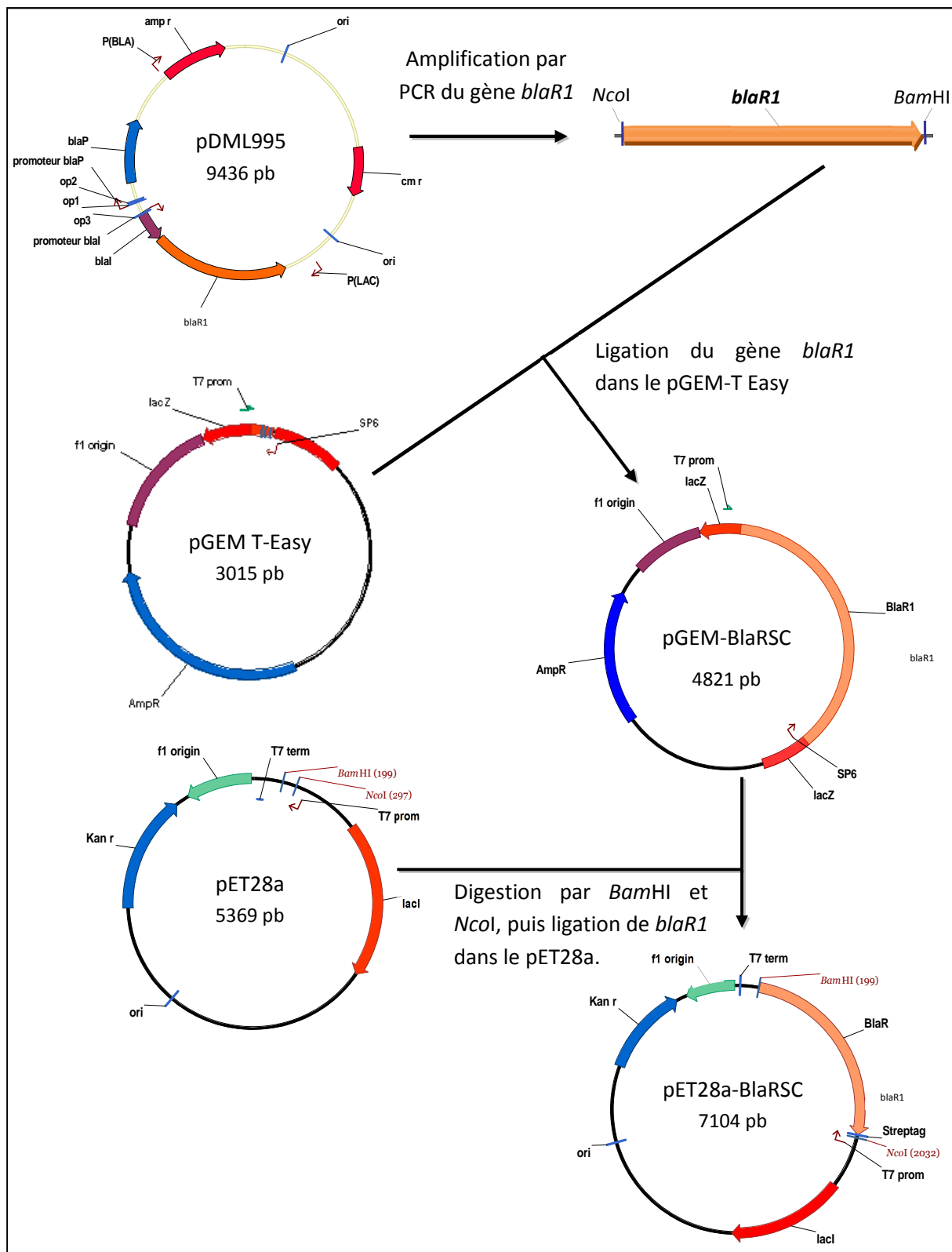
Des tests de production de la protéine membranaire BlaR1 entière effectués au laboratoire ont montré que lorsqu'elle est produite sous forme recombinante chez *E. coli*, la protéine est immédiatement clivée (V. Duval, communication personnelle). Dans le but d'identifier le site de clivage et de le muter afin d'obtenir une protéine entière, nous avons envisagé de produire la protéine BlaR1 en fusion C-terminale avec une étiquette StrepTag. Cette construction nous permettra d'isoler la partie C-terminale de la protéine clivée et le site de clivage pourra ensuite être déterminé par un séquençage NH<sub>2</sub> terminal du polypeptide. Nous avons ensuite envisagé plusieurs mutations afin de produire la protéine BlaR1 entière.

### 2.2.2.1. Constructions génétiques

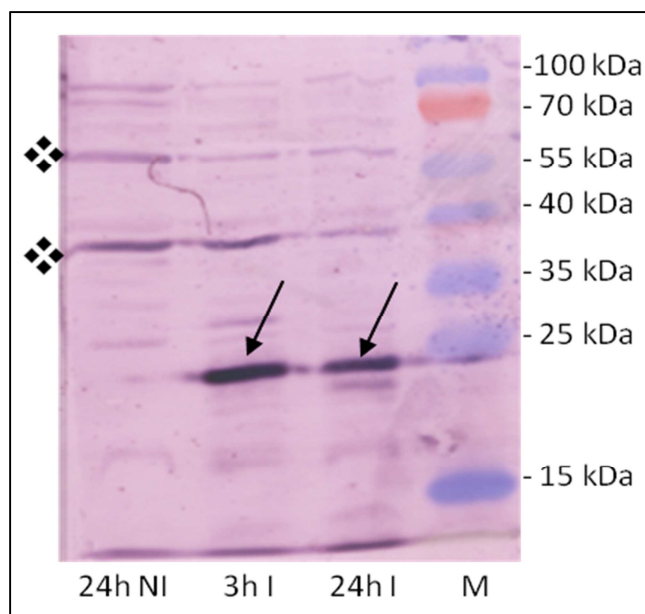
Dans une première étape, le gène codant pour le récepteur BlaR1 a été amplifié par PCR, à partir du pDML995. Les oligonucléotides utilisés, BlaRSCNcoI5' et BlaRSCBamHI3', permettent d'introduire les sites de restriction *NcoI* et *BamHI* (cf. § 4.7.2). De plus, l'oligonucléotide BlaRSCBamHI3' permet également d'introduire la séquence codant pour une étiquette StrepTag. Le produit de la PCR est ensuite inséré dans le pGEM T-Easy pour donner le vecteur pGEM-BlaRSC. La séquence nucléotidique de l'insert a été vérifiée par séquençage. L'insert a ensuite été purifié du pGEM par double digestion enzymatique et inséré dans le pET28a grâce aux sites de restriction *NcoI* et *BamHI*. Le vecteur ainsi obtenu a été appelé pET28a-BlaRSC (figure 2.16).

### 2.2.2.2. Production et purification de BlaR1 avec une étiquette StrepTag en fusion C-terminale

Dans le but de produire la protéine BlaR1 en fusion C-terminale avec une étiquette StrepTag (BlaRSC), la souche *E. coli* C41 DE3 a été transformée par le pET28a-BlaRSC. La souche recombinante a été cultivée dans un milieu de culture LB additionné de kanamycine 50 µg/ml. Afin de réaliser un test de production, une préculture de 16h a permis d'inoculer 50 ml de milieu de culture. Lorsque l'A<sup>600</sup> a atteint la valeur de 0,8, la production a été induite par l'ajout d'IPTG (1mM final). Ensuite, l'A<sup>600</sup> a été mesurée et un échantillon a été prélevé après 1, 2, 3 et 24 heures d'induction. Tous les échantillons prélevés ont été centrifugés à 14000 g pendant 15 minutes pour récolter les cellules qui ont ensuite été remises en suspension dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7 par unité d'A<sup>600</sup>. Une lyse par sonication (3 fois 15 secondes) suivie d'une centrifugation de 15 minutes à 14000 g a permis de séparer les fractions solubles et insolubles. La fraction insoluble de chaque échantillon a été resuspendue dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7 par unité d'A<sup>600</sup>. Les fractions solubles et insolubles des différents échantillons ont ensuite été analysées sur SDS-PAGE 12% (résultats non illustrés). L'analyse sur gel ne permet pas de mettre en évidence une surproduction de la protéine membranaire BlaR1. Afin de pouvoir détecter la production de la protéine, nous avons réalisé un Western blot avec des anticorps dirigés contre le domaine BlaR-CTD. Une protéine migrant à une taille d'un peu moins de 25 kDa a ainsi été mise en évidence (figure 2.17), ce qui signifie que la protéine BlaRSC a bien été produite et qu'elle a, en grande majorité, été clivée au minimum en deux fragments dont nous avons identifié la partie C-terminale grâce aux anticorps anti-BlaR-CTD et a été nommée BlaRSC\*.



**Figure 2.16.** Schéma de la stratégie de clonage du gène *blaR1* de *B. licheniformis* dans le pET28a. Le gène codant pour la protéine BlaR1 a été amplifié par PCR. L'oligonucléotide 3' utilisé pour cette PCR a également permis d'introduire la séquence codant pour une étiquette StrepTag à l'extrémité C-terminale du gène *blaR1*. Le produit de la PCR a ensuite été cloné dans le pGEM T-Easy pour donner le pGEM-BlaRSC. Ce dernier a été digéré par les enzymes *BamHI* et *NcoI*. Enfin, le produit de cette digestion a été cloné dans le pET-28a préalablement digéré par les mêmes enzymes. Le vecteur ainsi formé a été nommé pET28a-BlaR.

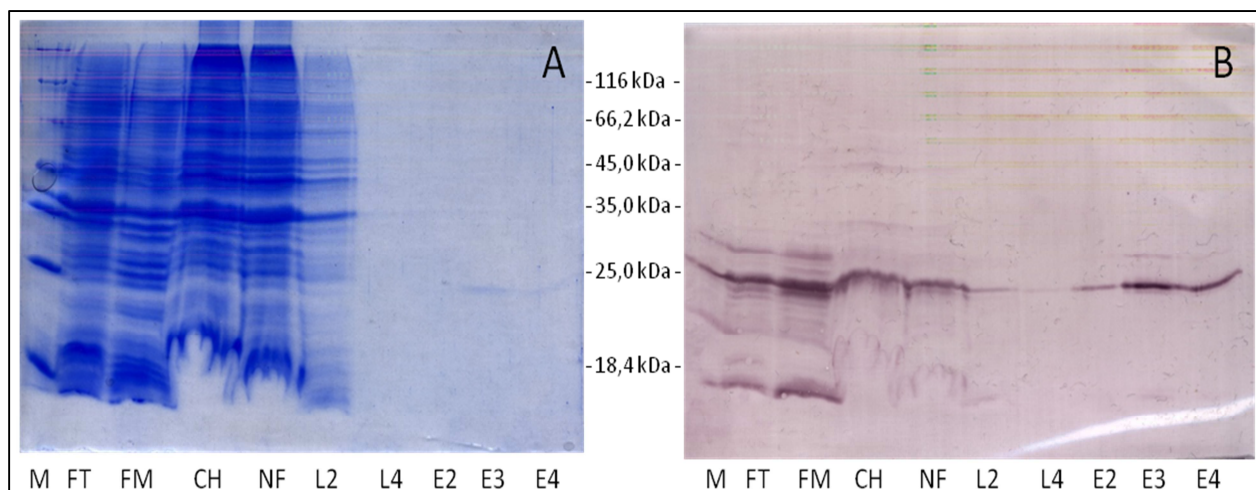


**Figure 2.17.** Analyse par Western blot des fractions insolubles des échantillons prélevés lors du test de production de la protéine recombinante BlarSC, en utilisant des anticorps anti-BlaR-CTD. Le symbole « ❖ » met en évidence des bandes intenses et non spécifiques. M : marqueur de masse moléculaire; NI : non induit; I : induit.

Pour permettre l'identification du site de clivage, une quantité plus importante de protéine était nécessaire, une production de la protéine BlarCS dans trois litres de milieu de culture a été entreprise. Après 3h d'induction, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 6000 g pendant 15 minutes puis remises en suspension dans 30 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,8, pour être ensuite lysées par sonication (2 pulses de 1 minute). L'échantillon a ensuite été centrifugé 15 minutes à 6000 g afin d'éliminer les cellules n'ayant pas été lysées. Le surnageant de cette centrifugation a subi une deuxième centrifugation à 39000 g pendant 1 heure. Le culot membranaire résultant a été remis en suspension dans 8 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,8, n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM) 2%. Cet échantillon a finalement été centrifugé pendant 30 minutes à 14000 g.

La protéine BlarSC\* a ensuite été purifiée à l'aide d'une colonne StrepTactin, grâce à l'affinité StrepTag-Streptavidine. En effet, l'étiquette StrepTag est un peptide synthétique de huit acides aminés (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) qui mime la poche de liaison à l'avidine de la biotine. Le surnageant résultant de la dernière étape de centrifugation a été déposé sur une colonne StrepTactin superflow de 5 ml (IBA BioTAGnology). Le lavage de la colonne et l'élution ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Les fractions récoltées lors de cette chromatographie ont été analysées par SDS-PAGE 12% et par Western blot (figure 2.18). Les résultats obtenus montrent que la protéine BlarCS\* a pu être purifiée en une étape.

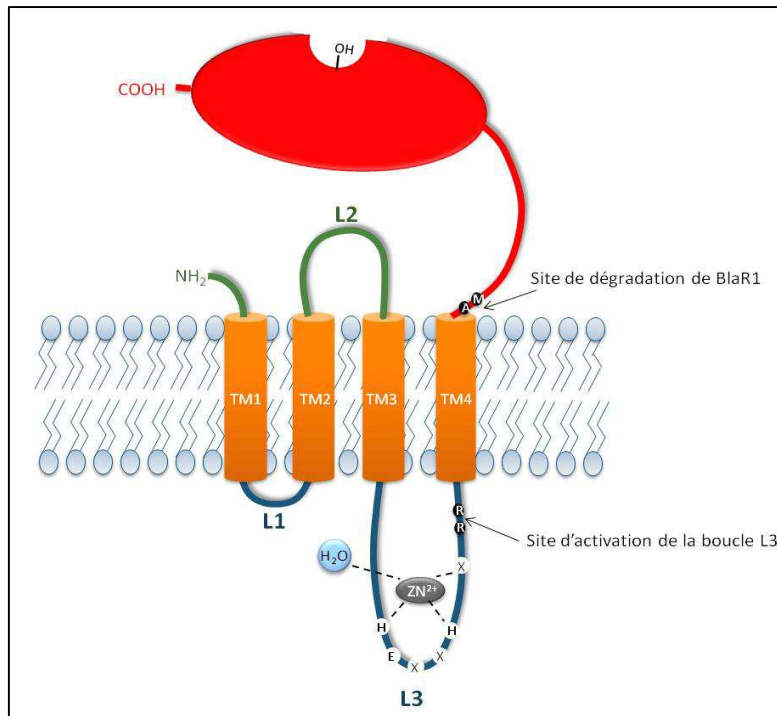




**Figure 2.18.** Analyse par SDS-PAGE 12% (A) et par Western blot à l'aide d'anticorps anti-BlaR-CTD (B) des fractions récoltées lors de la purification de la protéine recombinante BlaRSC\*. M : marqueur de masse moléculaire ; FT : fraction totale; FM : protéines membranaires ; CH : fraction de charge ; NF : fraction non adsorbée ; L : fractions de lavage ; E : fractions d'élution.

La liaison peptidique de la protéine BlaRSC qui est clivée lorsque la protéine est produite chez *E. coli*, a été identifiée par le séquençage NH<sub>2</sub>-terminal de BlaRSC\*. Les 5 premiers acides aminés sont M, Q, K, E et T. La protéine BlaRSC est donc clivée entre les résidus A<sup>345</sup> et M<sup>346</sup> (figure 2.19). Ce résultat est surprenant car ces résidus sont situés à l'extrémité N-terminale du domaine BlaR-CTD, exposé à l'extérieur de la membrane et dépourvu de segment transmembranaire. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'interaction entre les deux moitiés de la protéine BlaRSC, probablement entre BlaR-CTD et la boucle L2, permet à BlaRSC de rester associée à la membrane. Ainsi, la protéine n'est pas clivée au niveau de la liaison peptidique liant les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup>, le site d'activation de la boucle L3 (cf §2.1.2), comme on pourrait s'y attendre.

L'analyse de la séquence de la protéine BlaRSC\* à l'aide du programme SignalP (disponible sur le site [www.expasy.org](http://www.expasy.org)), montre que le site de clivage qui a été déterminé correspond à un site pouvant être reconnu par une peptidase signal. Ainsi, chez *E. coli*, la protéine BlaR1 pourrait être protéolysée par cette enzyme qui a pour fonction de libérer les protéines exprimées à l'extérieur de la cellule.



**Figure 2.19.** Représentation de la protéine BlaR1 montrant la position des sites de dégradation (entre les résidus A<sup>345</sup> et M<sup>346</sup>) et d'activation de la boucle L3 (entre les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup>).

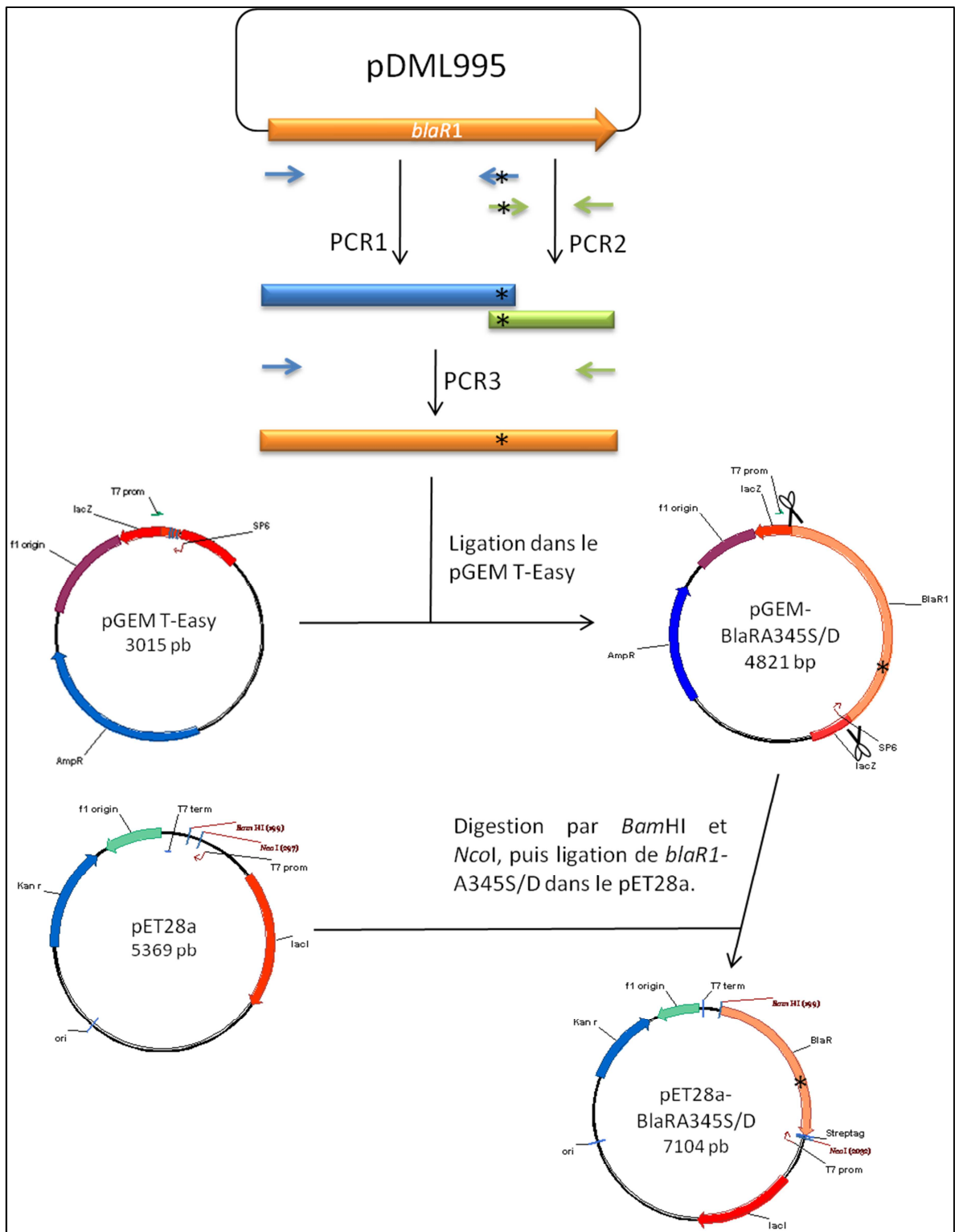
### 2.2.2.3. Mutagenèse du site de dégradation de la protéine BlaRSC

Afin d'éviter la protéolyse de la protéine BlaRSC, nous avons envisagé la mutation du site de dégradation qui a été identifié. Pour cela, une prédiction bioinformatique, à l'aide du programme signalP, a été réalisée afin de déterminer les mutations qui permettraient à la protéine BlaR1 de ne pas être dégradée. Cette prédiction a montré que le remplacement du résidu A<sup>345</sup> par un acide aspartique ou par une sérine devrait empêcher la reconnaissance du site par une peptidase signal.

Pour réaliser ces mutations, deux premières PCR ont tout d'abord permis d'amplifier les séquences situées de part et d'autre de la mutation (figure 2.20). Pour chaque PCR, un oligonucléotide portant la mutation souhaitée a été utilisé. Ensuite, les deux demi-séquences ont été assemblées au cours d'une troisième PCR. Ces PCR de mutagenèse ont été réalisées sur le plasmide pDML995 à l'aide des oligonucléotides suivants :

Mutation A <sup>345</sup> D	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR 1 : BlaR_A345D_UP et BlaRSCBamHI3'</li> <li>PCR 2 : BlaR_A345D_RP et BlaRSCNcoI5'</li> <li>PCR 3 : BlaRSCBamHI3' et BlaRSCNcoI5'</li> </ul>
Mutation A <sup>345</sup> S	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR 1 : BlaR_A345S_Up et BlaRSCBamHI3'</li> <li>PCR 2 : BlaR_A345S_Rp et BlaRSCNcoI5'</li> <li>PCR3 : BlaRSCBamHI3' et BlaRSCNcoI5'</li> </ul>

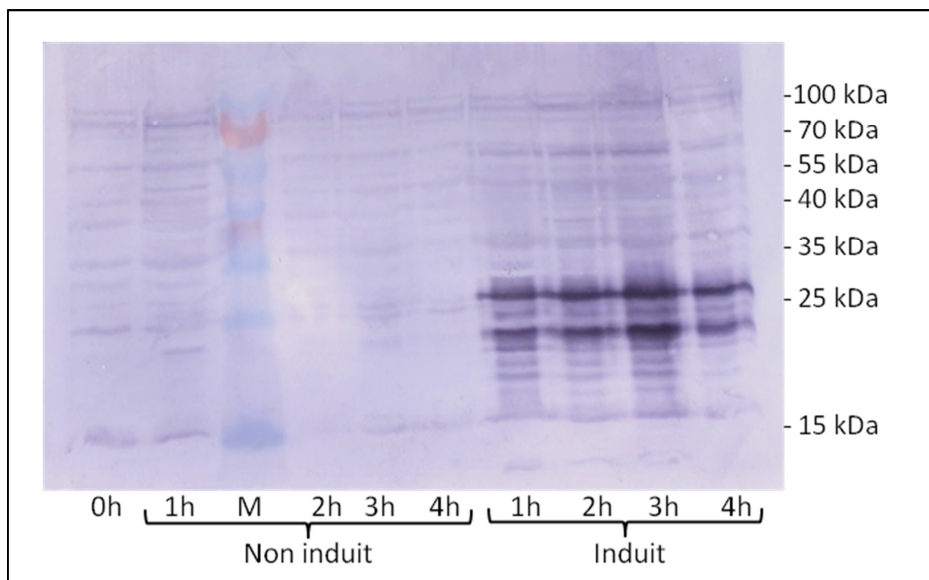
Les produits PCR ont ensuite été clonés dans le pGem-T-Easy. Ces constructions ont été vérifiées par séquençage. Les séquences codant pour BlaRSC portant la mutation A<sup>345</sup>S ou A<sup>345</sup>D ont ensuite été transférées dans le pET28a à l'aide des sites de restriction *Bam*HI et *Nco*I, introduits grâce aux oligonucléotides. Les vecteurs obtenus ont été nommés : pET28a-BlaRA345S et pET28a-A345D.



**Figure 2.20 :** Schéma de la stratégie de construction des vecteurs pET28a-BlaRA345D et pET28a-BlaRA345S permettant de produire la protéine BlaR1 portant les mutations A<sup>345</sup>D ou A<sup>345</sup>S, respectivement. La séquence codant pour la protéine BlaRSC a été amplifiée par deux triples PCR au cours desquelles chaque mutation a été introduite. Le produit de chaque PCR a été cloné dans le pGEM T-Easy qui a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Nco*I. Les fragments obtenus ont ensuite été insérés dans le pET28a digéré par les mêmes enzymes afin de produire les vecteurs pET28a-BlaRA345D et pET28a-BlaRA345S.

La production des mutants A<sup>345</sup>S et A<sup>345</sup>D a ensuite été réalisée à l'aide de la souche *E. coli* C41 DE3 transformée par le pET28a-BlaRA345S ou le pET28a-A345D. La production de ces mutants a été réalisée en suivant le même protocole que celui de la production de la protéine BlaRSC. L'analyse par SDS-PAGE des fractions solubles et insolubles n'a pas permis d'observer de surproduction, comme c'était le cas pour la protéine BlaRSC (résultats non illustrés). Nous avons tout de même entrepris la purification de ces protéines sur colonne StrepTactin de façon identique à celle utilisée pour la purification de BlaRSC. Après analyse par SDS-PAGE, aucun de ces deux mutants n'a pu être clairement observé dans les fractions d'éluion (résultats non illustrés).

Afin de déterminer si une petite quantité des protéines BlaR-A345S et BlaR-A345D a tout de même été produite, un Western blot avec des anti-corps dirigés contre le domaine BlaR-CTD, a été réalisé sur les fractions solubles et insolubles des échantillons des deux cultures (figure 2.21). Celui-ci a mis en évidence, pour les 2 mutants, une série de bandes dont la majorité se situe à une taille comprise entre 25 et 35 kDa. La mutation du résidu A<sup>345</sup> en acide aspartique ou en sérine n'empêche donc pas la dégradation de la protéine BlaRSC.



**Figure 2.21** : Analyse par Western blot de la production du mutant BlaRA345D. Des échantillons de cultures d'*E. coli* C41 DE3/pET28a-BlaRA345D induite (induit) ou non (non-induit) à l'IPTG 1 mM, ont été prélevés toutes les heures pendant 4h et analysés par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre BlaR-CTD. La production du mutant BlaRA345S a également été analysée par Western blot et donne les mêmes résultats. M : marqueur de masse moléculaire.

#### 2.2.2.4. Mutagénèse du site actif ou du site d'activation de la protéine BlaRSC

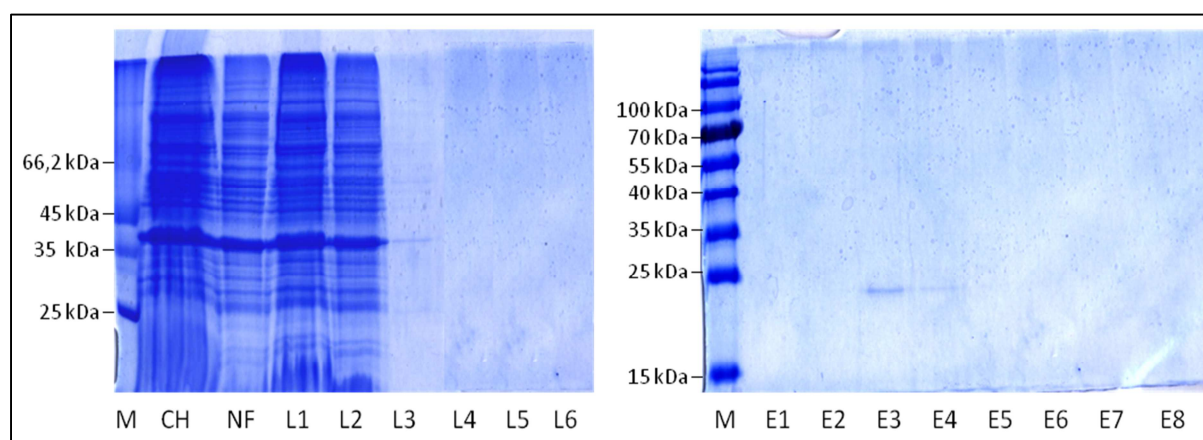
La protéine BlaR1 est une protéine ancrée dans la membrane via quatre segments transmembranaires. Comme décrit au paragraphe 2.1.2, lorsqu'elle est produite chez *Bacillus*, l'activité métalloprotéase de la boucle L3 est activée par l'autoclivage de la liaison peptidique liant les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup>. Ce clivage libère la partie C-terminale de la protéine qui consiste en un segment transmembranaire relié à un domaine extracellulaire.

Lorsque la protéine BlaRSC est produite chez *E. coli*, si on considère que la boucle L3 s'auto-clive, la partie C-terminale de la protéine pourrait être comparée à une protéine périplasmique qui est exposée à l'extérieur de la cellule grâce à une hélice  $\alpha$  transmembranaire et que cette protéine doit être libérée par l'activité d'une peptidase signal. Afin d'éviter le clivage de BlaRSC, la mutation du site de clivage d'activation ainsi que celle du résidu catalytique ont été envisagées.

#### 2.2.2.4.1. Mutation du site d'activation

Les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup> ont ainsi été remplacés par 2 résidus d'alanines (mutant R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A). Cette mutation a été réalisée à l'aide du kit « QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene). La PCR de mutagenèse a été réalisée sur le plasmide pGBlaRSC pour donner le pGBlaR-RRAA. La séquence codant pour BlaR-R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A a été vérifiée par séquençage avant d'être introduite dans le pET28a à l'aide des sites de restrictions *Bam*HI et *Nco*I. Le vecteur résultant a été nommé pET28a-BlaR-RRAA.

La production et la purification de la protéine BlaR1 portant la double mutation R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A ont été réalisées de la même façon que pour la protéine BlaRSC. Les fractions obtenues lors de la purification sur colonne Streptactin ont été analysées par SDS-PAGE 12% (figure 2.22). La protéine purifiée migre à environ 23 kDa, ce qui correspond à la taille de la partie C-terminale de la protéine BlaR1 sauvage lorsqu'elle est produite chez *E. coli*. La mutation des résidus considérés comme le site d'activation n'empêche donc pas le clivage de la protéine.



**Figure 2.22.** Analyse par SDS-PAGE 12% des fractions récoltées lors de la purification sur colonne Streptactin du mutant R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A de BlaRSC. M : marqueur de masse moléculaire ; CH : charge ; NF : non fixé ; L : fractions de lavage ; E : fractions d'élution.

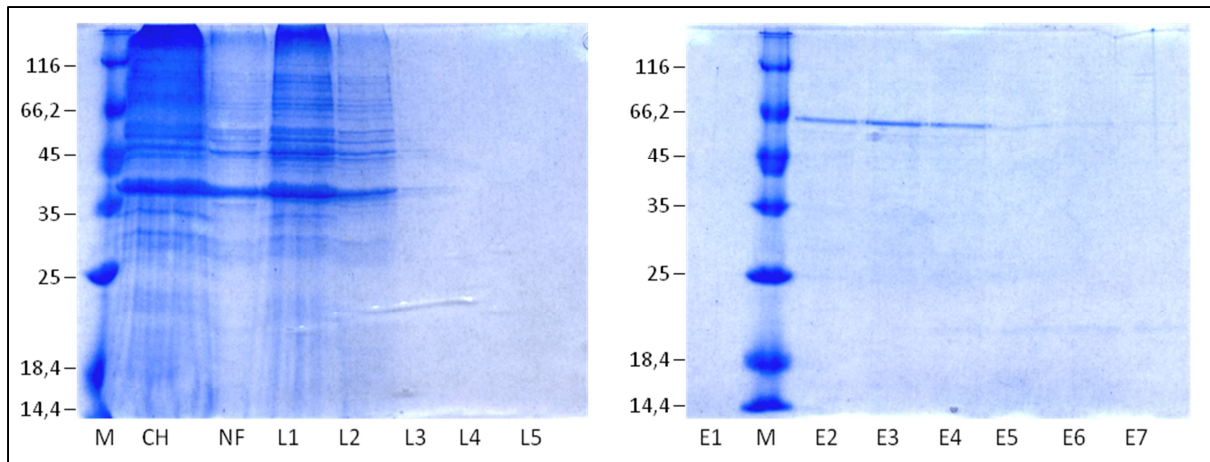
#### 2.2.2.4.2. Mutation du site actif

Le résidu catalytique, le E<sup>213</sup>, a été remplacé par différents résidus : une alanine (=mutant E<sup>213</sup>A), un acide aspartique (=mutant E<sup>213</sup>D) ou une glutamine (=mutant E<sup>213</sup>Q). Ces mutations ont été réalisées à l'aide du kit « QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene). Les PCR de mutagenèse ont été réalisées sur le plasmide pGBlaRSC à l'aide des oligonucléotides détaillés au chapitre 4.7.3. Les vecteurs obtenus ont été nommés pGBlaRE213A, pGBlaRE213D et pGBlaRE213Q



et la séquence du gène *blaR1* portant les différentes mutations a été vérifiée par séquençage. Les séquences codant pour les différents mutants ont ensuite été introduites dans le pET28a à l'aide des sites de restriction *Bam*HI et *Nco*I. Les différents vecteurs obtenus ont été nommés : pET28A-BlaRE213A, pET28A-BlaRE213D et pET28A-BlaRE213Q.

La première production réalisée est celle du mutant E<sup>213</sup>A. Le mode opératoire utilisé est identique à celui des autres mutants de BlaRSC. L'analyse par SDS-PAGE des fractions soluble et insoluble de la culture d'*E. coli* C41 DE3/pET28a-BlaRE213A ne montrait pas de surproduction de la protéine, comme lors de la production de BlaRSC. La protéine BlaR-E<sup>213</sup>A a tout de même été purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Streptactin en suivant le même protocole que celui utilisé précédemment. Les fractions récoltées lors de cette purification ont été analysées par SDS-PAGE 12% (figure 2.23). Une protéine migrant à une taille d'environ 65 kDa, qui est la taille attendue pour la protéine BlaRSC entière, a pu être mise en évidence. Ce résultat montre que la mutation de l'acide glutamique catalytique en alanine empêche le clivage de BlaRSC chez *E. coli*.



**Figure 2.23.** Analyse par SDS-PAGE 12% des fractions récoltées lors de la purification du mutant E<sup>213</sup>A de BlaRSC. M : marqueur de masse moléculaire ; CH : charge ; NF : non fixé ; L : fraction de lavage ; E : fractions d'élution.

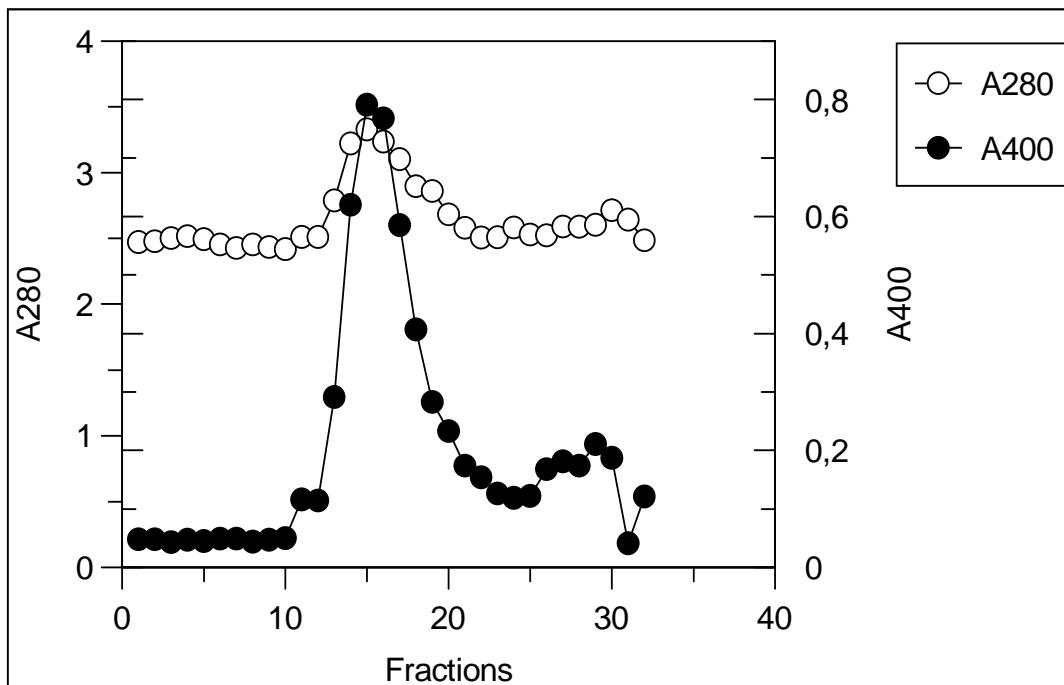
Les mutants E<sup>213</sup>D et E<sup>213</sup>Q ont également été produits et purifiés selon un protocole tout à fait identique au précédent. Les fractions d'élution ont été analysées sur SDS-PAGE. Les résultats obtenus sont tout à fait similaires à celui obtenu pour le mutant E<sup>213</sup>A et montrent que pour les mutants E<sup>213</sup>D et E<sup>213</sup>Q, la protéine purifiée migre à la taille attendue pour BlaRSC entier, c'est-à-dire environ 65 kDa.

### 2.2.3. Reconstitution du récepteur BlaR1 dans des liposomes

La protéine BlaR1 est une protéine membranaire qui, *in vivo*, est enchâssée dans une double couche lipidique. La protéine BlaRSC portant la mutation E213A a pu être purifiée et solubilisée en présence de n-Dodecyl-β-D-maltoside. Afin de permettre l'étude de la protéine dans un environnement plus proche de son environnement naturel, nous avons entrepris des expériences permettant sa réinsertion dans des liposomes.

Pour ces expériences, des extraits lipidiques polaires d'*E. coli* (Avanti), solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 20 mg/ml, ont été utilisés. La solution de lipide (300µl), placée dans un tube en verre de 5 ml, a été séchée par un flux d'azote afin de former un film lipidique. Ce dernier a été mis en présence d'une solution de n-Dodecyl-β-D-maltoside 0,1% contenant 0,5 mg de protéine (rapport lipide/protéine de 12/1). Le détergent a progressivement été éliminé à l'aide de Biobeads SM-2 Adsorbent (Bio-Rad). Le mélange lipide-protéine a ensuite été séparé sur un gradient de sucrose qui a été fractionné. Les différentes étapes de la préparation des protéoliposomes sont détaillées au paragraphe 4.10 du matériel et méthodes.

Les fractions récoltées lors du fractionnement du gradient de sucrose ont été analysées afin d'identifier celles qui contiennent les protéoliposomes (figure 2.24). L'absorbance à 400 nm (détection des lipides) et à 280 nm (détection des protéines) a été mesurée. Les fractions 13 à 19, qui absorbent à la fois à une longueur d'onde de 400 et de 280 nm, sont celles qui contiennent les protéoliposomes. Elles ont été regroupées et conservées à -70°C.



**Figure 2.24.** Analyse des fractions du mélange lipides-BlaRE213A séparées par centrifugation sur gradient de sucrose (5 à 30%). L'absorbance à 280 nm permet de mettre en évidence la présence de protéines et l'absorbance à 400 nm permet de révéler les lipides. Les fractions 13 à 19 contiennent la protéine insérée dans des liposomes.

En collaboration avec le laboratoire de Structure et Fonction des Membranes biologiques de l'ULB dirigé par E. Goormaghtigh, nous avons entrepris l'étude de la protéine BlaRE213A, ainsi reconstituée dans des liposomes, par spectrométrie FTIR (Fourier Transformed Infra-Red). Les expériences réalisées n'ont pas donné des résultats concluants.

#### 2.2.4. Discussion

Nous avons tenté de produire chez *E. coli* la protéine BlaR1 de *B. licheniformis* entière ainsi que la boucle L3 isolée.

Pour la production de la boucle L3, nous avons construit différents vecteurs permettant sa production en fusion avec différents partenaires protéiques. La seule construction qui a permis de produire la boucle L3 soluble et en quantité satisfaisante est celle de la protéine NusA-L3. Cette dernière consiste en une fusion de la boucle L3 à l'extrémité C-terminale de la protéine NusA. Environ 20 mg de protéine pure à plus de 80% par litre de culture ont été produits.

Malgré de nombreux essais antérieurs, aucune protéine membranaire de type BlaR1/MecR entière n'a pu être produite et purifiée. La protéine BlaR1, lorsqu'elle est produite sous forme recombinante chez *E. coli*, subit un clivage immédiat. Au cours de ce travail, nous avons déterminé que ce clivage a lieu entre les résidus A<sup>345</sup> et M<sup>346</sup>. Ce site pourrait être reconnu par une peptidase signal. C'est pourquoi, nous avons réalisé les mutations A<sup>345</sup>D et A<sup>345</sup>S qui devraient empêcher la peptidase signal de reconnaître cette partie de la protéine. Aucune de ces deux mutations n'a permis de produire la protéine BlaR1 entière. Nous avons également envisagé de produire la protéine BlaR1 portant la mutation E<sup>213</sup>A (mutation du résidu catalytique) ou R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A (mutation du site de clivage d'activation de la métalloprotéase de la boucle L3). La protéine portant la mutation R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A est également clivée mais, contre toute attente, la mutation E<sup>213</sup>A a permis d'obtenir une protéine BlaR1 non clivée. Grâce à son extrémité C-terminale fusionnée à une étiquette StrepTag, la protéine BlaR-E<sup>213</sup>A a pu être purifiée par un protocole simple (une seule étape de purification). Etant donné que le mutant du site de clivage d'activation ne permet pas de garder la protéine BlaR1 entière, une explication serait que la mutation E<sup>213</sup>A induise un léger changement conformationnel de la protéine qui empêcherait celle-ci de se faire dégrader par une protéase périplasmique.

Nous avons également mis au point un protocole de reconstitution de la protéine BlaR1 entière dans des liposomes. Pour cela, la protéine est solubilisée par du DDM (n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside), qui est ensuite échangé par des extraits de lipides polaires de *E. coli*. Les protéoliposomes obtenus ont été utilisés pour une étude préliminaire par spectroscopie FTIR afin de mettre en évidence les changements conformationnels du récepteur en présence de pénicilline. Ces travaux devront être continués.



## 2.3. Etude de l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 de BlaR1

Comme mentionné dans l'introduction, le coactivateur de BlaI est le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP. Ce composé est issu de la dégradation du peptidoglycane. Il a été proposé que c'est l'activité de BlaR1 qui convertit un pro-coactivateur en coactivateur et que le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP serait le substrat de la protéine BlaR1 activée. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'on trouve chez *Bacillus* toutes les enzymes autolytiques nécessaires à la dégradation du peptidoglycane excepté l'enzyme qui permet de cliver le lien L-Ala-D-Glu.

Dans le but d'étudier l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 du récepteur BlaR1, des membranes de *B. subtilis* enrichies en BlaR1, ainsi que la protéine fusion NusA-L3 ont été incubées avec le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys. Nous avons travaillé avec ce tripeptide plutôt que le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP car ce dernier n'est pas disponible commercialement.

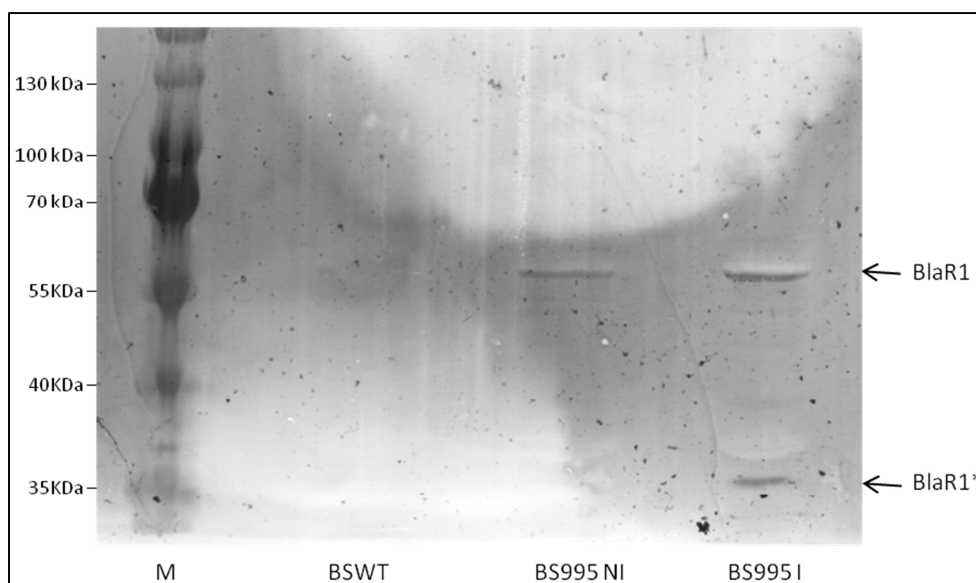
### 2.3.1. Préparation de membranes de *B. subtilis* enrichies en BlaR1

Pour préparer des membranes enrichies en BlaR1 activé, une culture de *B. subtilis* 168 transformé par le pDML995 (vecteur contenant le divergeon *bla* de *B. licheniformis*) a été réalisée dans du milieu 2xYT. Lorsque la culture a atteint une  $A^{600}$  de 0,6, de la céphalosporine C (2,5  $\mu$ g/ml) a été ajoutée afin d'induire la transcription des gènes *blaP*, *blaI* et *blaR1*. Après 1h30, les cellules ont été récoltées par centrifugation et resuspendues dans du tampon phosphate 50 mM pH7. Une culture de *B. subtilis* 168 transformé mais non induit ainsi qu'une de *B. subtilis* 168 non transformé et non induit ont également été réalisées afin d'obtenir des membranes contenant la protéine BlaR1 non activée et des membranes ne contenant pas de BlaR1. Après avoir lysé les cellules, la fraction membranaire de chaque culture a été isolée par centrifugation et resuspendue dans du tampon phosphate 50 mM pH7.

La concentration en protéines de chaque fraction membranaire a été déterminée à l'aide du test BCA (cf. § 4.9.5). Les résultats de ces dosages sont :

- Membranes de *B. subtilis* non transformé (=BSWT) :  $11,1 \pm 3,8$  mg/ml
- Membranes de *B. subtilis*/pDML995 non induit (=BS995 NI) :  $11,8 \pm 2,5$  mg/ml
- Membranes de *B. subtilis*/pDML995 et induit (=BS995 I) :  $16,3 \pm 5,3$  mg/ml

La présence de BlaR1 dans les membranes a été vérifiée par Western blot en utilisant des anticorps anti-BlaR-CTD et 20  $\mu$ g de protéines totales pour chaque échantillon. Dans les membranes de BSWT, aucune présence de BlaR1 n'a été détectée, comme attendu. Dans l'échantillon BS995 NI, une faible quantité de BlaR1 a été détectée par les anticorps, qui correspond à l'expression basale. Dans le troisième échantillon, deux bandes sont visibles, une à 65 kDa et l'autre à 33 kDa. La première correspond à la taille attendue pour la protéine BlaR1 entière et la seconde à la taille attendue pour la moitié C-terminale obtenue après le clivage d'activation de la métalloprotéase (figure 2.25).



**Figure 2.25.** Détection par Western blot de la présence de la protéine BlaR1 entière et de la protéine BlaR1 activée (BlaR1\*) dans les membranes de *B. subtilis* non transformé (BSWT) et de *B. subtilis* transformé par le pDML995 et cultivé en présence ou non de céphalosporine C (BS995 I et NI). Les anticorps utilisés sont dirigés contre BlaR-CTD. M : marqueur de masse moléculaire.

### 2.3.2. Test de l'activité de la boucle L3 du récepteur BlaR1

Afin de tester l'activité de la boucle L3, nous avons incubé 20 µg de protéines totales pour chaque type de membrane ou 10 µg de la protéine fusion NusA-L3 avec 5 pmoles de tripeptide L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys dans 100 µl de tampon phosphate pH 7 pendant 1 heure à 37°C. L'échantillon a ensuite été congelé puis lyophilisé et resuspendu dans du tampon borate pH 9,5.

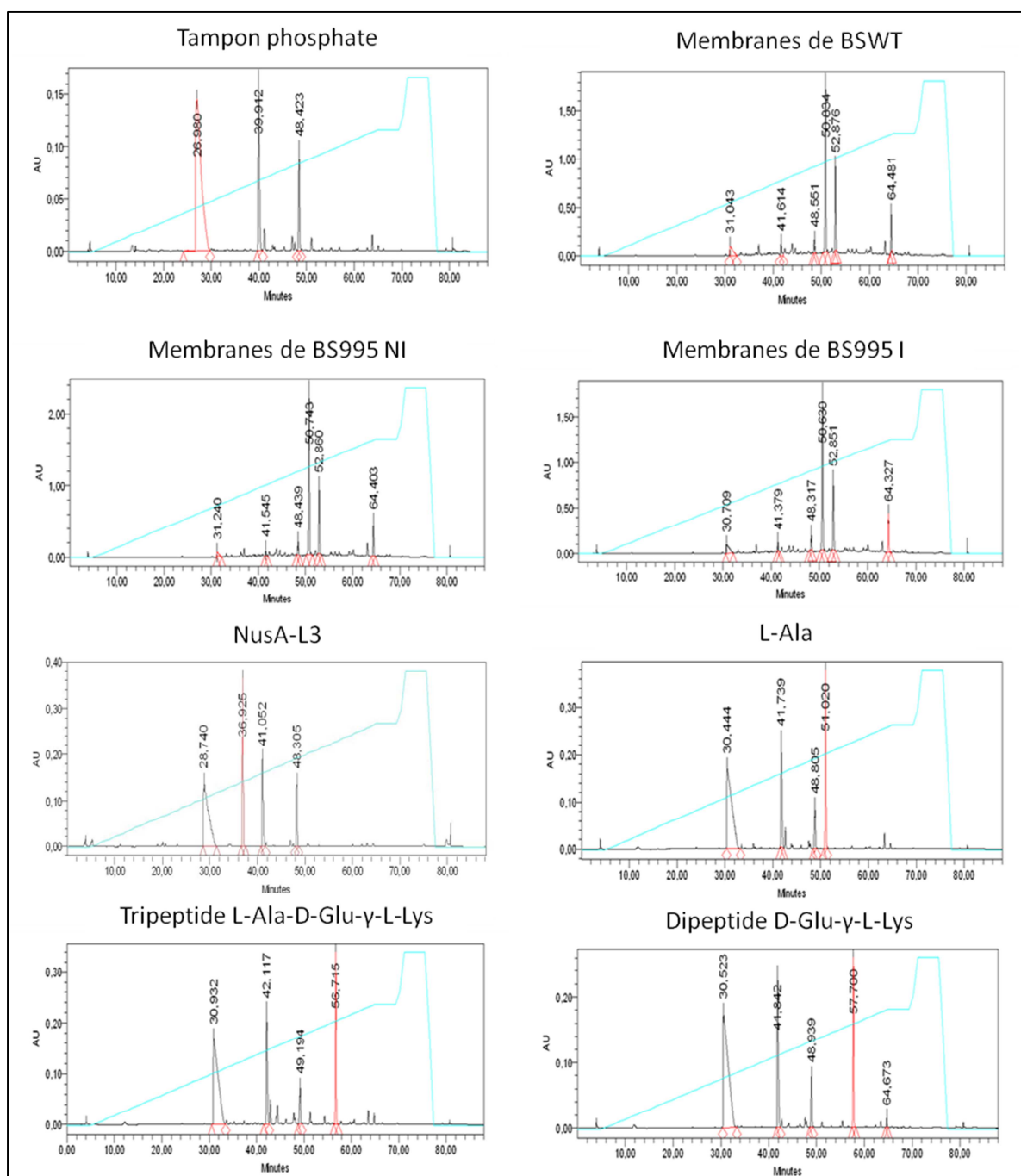
Afin d'analyser par HPLC les produits de la réaction entre la boucle L3 et le tripeptide, l'échantillon a été traité au TNBSA (2,4,6-TriNitroBenzene Sulfonic Acid) afin de marquer les amines primaires. Si le TNBSA n'est pas utilisé, les peptides, très polaires, sont élués très tôt de la colonne et ne sont pas ou difficilement détectables.

La colonne utilisée pour l'analyse HPLC est une colonne de phase inverse Nucléodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel). L'éluion est réalisée par un gradient d'acétonitrile (cf. § 4.11) et l'ensemble du processus chromatographique a été suivi par mesure d'absorbance à 335 nm, la longueur d'onde à laquelle est détecté le TNBSA couplé à des amines primaires.

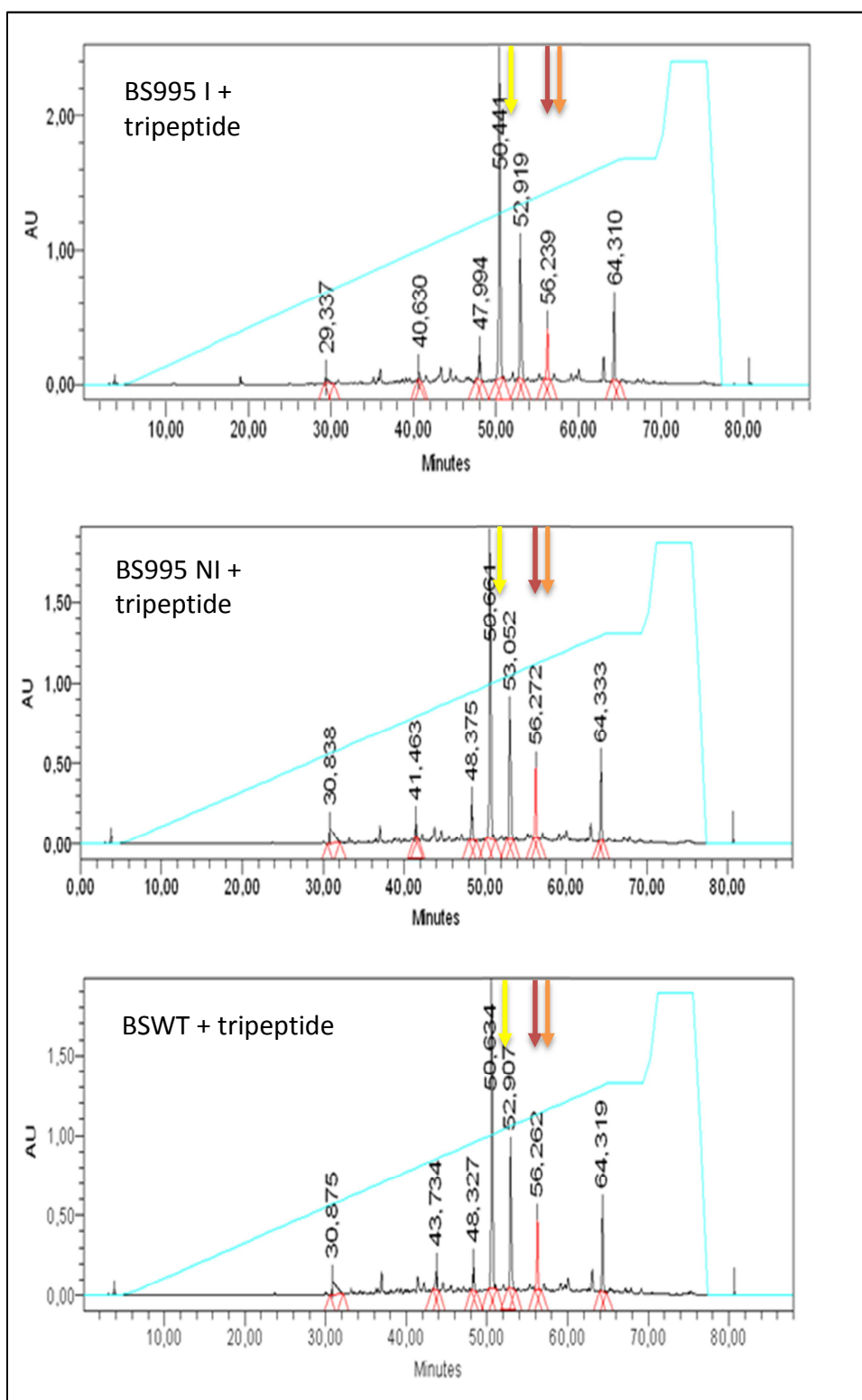
Les échantillons suivants ont été traités de la même façon que le mélange membranes/tripeptide comme témoins (Figure 2.26) :

- tampon phosphate
- les membranes de BSWT, BS995 NI et BS995 I seules
- la protéine NusA-L3 seule
- le tripeptide L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys seul
- le dipeptide γ-D-Glu-L-Lys seul
- le résidu L-Ala seul

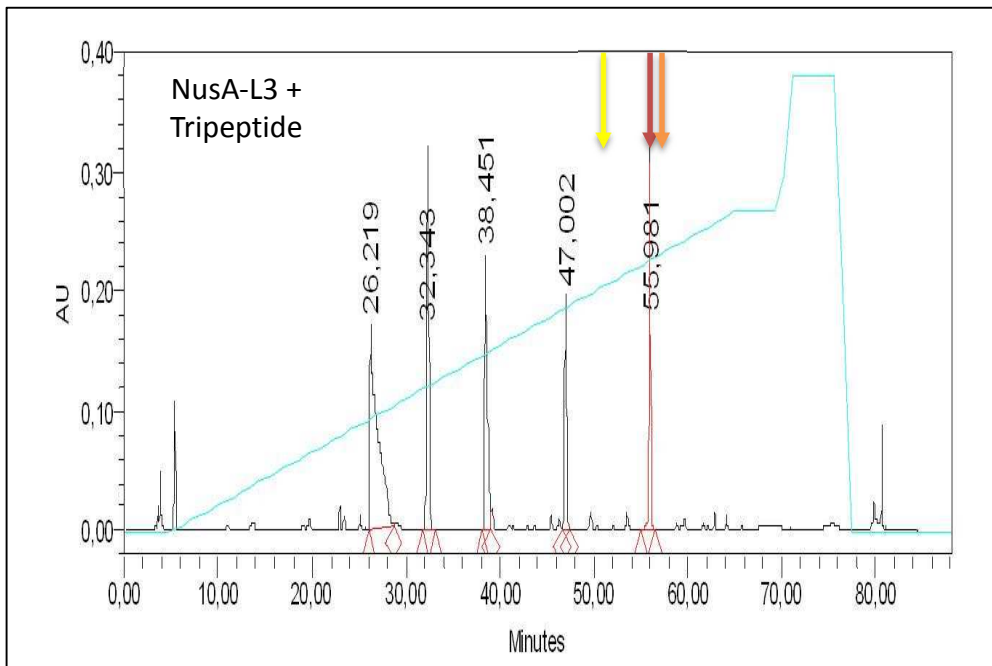
Comme on peut le constater en analysant les chromatogrammes représentés aux figures 2.27 et 2.28, aucune activité métalloprotéasique n'a pu être observée sur le tripeptide, ni avec les membranes enrichies en BlaR1, ni avec la protéine NusA-L3.



**Figure 2.26.** Chromatogramme des différents échantillons témoins négatifs traités au TNBSA et analysés par HPLC sur colonne Nucléodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel). BSWT = *B. subtilis* non transformé ; BS995 NI = *B. subtilis* transformé avec le pDML995 et cultivé sans céphalosporine C ; BS995 I = *B. subtilis* transformé avec le pDML995 et cultivé en présence de céphalosporine C.



**Figure 2.27.** Analyse par HPLC sur colonne Nucléodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel), après traitement au TNBSA, des solutions de membranes de *B. subtilis* incubées en présence du tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys. BS995 I = membranes de *B. subtilis* transformé avec le pDML995 et cultivé en présence de céphalosporine C (contenant la protéine BlaR1 activée) ; BS995 NI = membranes de *B. subtilis* transformé avec le pDML995 et cultivé sans céphalosporine C (contenant la protéine BlaR1 non activée) ; BSWT = membranes de *B. subtilis* non transformé (ne contenant pas la protéine BlaR1). Une flèche rouge indique la position du tripeptide, une orange celle du dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-L-Lys et une jaune celle du D-Ala.



**Figure 2.28.** Analyse par HPLC sur colonne Nucléodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel), après traitement au TNBSA, de la solution dans laquelle la protéine NusA-L3 a été incubée en présence du tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys. Une flèche rouge indique la position du tripeptide, une orange celle du dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-L-Lys et une jaune celle du D-Ala.

### 2.3.3. Discussion

Afin d'étudier l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 de BlaR1, deux approches ont été envisagées. La première était d'utiliser des membranes de *B. subtilis* enrichies en BlaR1. Pour cela, nous avons isolé la fraction membranaire d'une culture *B. subtilis*/pDML995 cultivée en présence d'antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, l'inducteur. La seconde option était d'utiliser la protéine NusA-L3 dans laquelle la boucle L3 de BlaR1 est fusionnée à la protéine NusA. Cette dernière est une protéine cytoplasmique d'*E. coli* qui n'a pas d'activité protéasique.

Nous avons analysé par HPLC le résultat de l'incubation du tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys, le substrat supposé de la boucle L3, avec les membranes enrichies en BlaR1 et avec la protéine fusion NusA-L3. Aucun clivage du tripeptide n'a pu être observé que ce soit en utilisant la protéine BlaR1 contenue dans les membranes ou la protéine NusA-L3. Cela ne signifie pas que la boucle L3 n'a pas d'activité métalloprotéasique sur le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys mais que cette réaction n'est pas possible dans les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons réalisé cette expérience.

## 2.4. Recherche de BlaR2

Comme mentionné dans l'introduction, le système d'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP devrait comporter d'autres protagonistes que le régulateur transcriptionnel Blal et le senseur/transducteur membranaire BlaR1. En effet, le mutant de *B. licheniformis*, appelé BlaR2<sup>-</sup>, est incapable d'induire la  $\beta$ -lactamase BlaP mais ne porte pas de mutation au niveau du divergeon *blaP-blaI-blaR*. Il est donc clair que le locus *blaR2* n'est pas lié aux gènes *blaP-blaI-blaR* mais sa nature et sa position n'ont pas encore été identifiées.

### 2.4.1. Identification du gène *BLO1303* en tant que nouveau membre du régulon de Blal chez *Bacillus licheniformis*

L'éventualité qu'un ou plusieurs nouveaux composants du système de résistance aux antibiotiques de *B. licheniformis* fassent partie du régulon Blal est un cas de figure envisageable. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, il a été montré que la protéine Blal régule trois locus nucléotidiques en plus des locus classiquement connus pour être impliqués dans la résistance aux antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame (Sala *et al.*, 2009). Deux de ces locus codent pour des protéines membranaires de fonction inconnue. Le troisième code pour une ATP synthase.

L'identification du gène en aval d'un nouvel élément *cis* potentiel de Blal ainsi que la déduction de sa fonction présumée permettra d'estimer si celui-ci peut effectivement jouer un rôle dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP. Le séquençage et l'annotation du génome de la souche *Bacillus licheniformis* DSM13 rendent la recherche de séquences similaires à celles reconnues par Blal possible. Au cas où la prédiction bioinformatique de nouveaux éléments *cis* de Blal identifie un site potentiel en amont d'un gène « prometteur », nous envisagerons de valider expérimentalement l'appartenance de ce nouveau gène au régulon Blal et effectuerons les expériences requises pour comprendre le rôle de ce nouvel élément dans notre modèle d'induction.

Pour prédire le régulon de Blal, nous avons utilisé le programme PREDetector (Prokaryotic Regulatory Elements Detector) développé au laboratoire par le Docteur S. Rigali (Hiard *et al.*, 2007). Ce programme permet l'identification de séquences similaires à celles reconnues - et déjà validées expérimentalement - par une protéine liant l'ADN sur base de la méthode des matrices de scores (cf § 4.20 du chapitre Matériel et méthodes).

#### 2.4.1.1. Création de la matrice de prédiction du régulon Blal

L'identification de nouvelles séquences potentiellement reconnues par Blal commence par la construction d'une matrice de scores à partir des trois séquences opératrices identifiées dans la région inter-génique entre les gènes *blaP* et *blaI*: OP1 (AAAGTATTACATATGTAAGATTTA) et OP2 (CAAATCTTACAAATGTAGTCTTTG) situées en amont de *blaP* et OP3 (AGAGTATTACATTTGTAAGT ATAG) en amont de l'opéron *blaI-blaR1* (Wittman & Wong, 1988). Une séquence consensus est déduite de l'alignement multiple: AAAGTATTACATATGTAAGCTTTG (les résidus en gras sont

strictement conservés). Cet alignement est converti en une matrice d'alignement qui pondère chaque nucléotide à chacune des positions de l'alignement, sur base de leur fréquence respective d'apparition à chacune des positions (figure 2.29). Enfin, la matrice d'alignement est convertie en matrice de score où celui-ci reflète, à chaque position  $j$  du site opérateur, la fréquence ( $f$ ) d'apparition d'un nucléotide  $i$  par rapport à sa distribution naturelle dans le génome de *B. licheniformis* ( $p_i$ , a priori). La formule de conversion est la suivante : score d'un nucléotide  $i$  en position  $j = \ln (f_{ij}/p_i)$ . A chaque séquence opératrice est donc attribué un score qui est la somme des scores de chaque nucléotide la composant, ce qui permet de chiffrer la divergence ou la similitude d'une séquence par rapport à la séquence consensus optimale. Les scores obtenus par les trois séquences utilisées pour générer la matrice sont respectivement 21.64 (OP1), 19.11 (OP2) et 20.18 (OP3). Ces scores sont fort proches du score de 22.5 obtenu par la séquence consensus. La procédure de création d'une matrice est plus amplement détaillée au § 4.20 du chapitre matériel et méthodes.

La matrice créée et nommée « Blal2010 » a ensuite été utilisée pour scanner le génome de *B. licheniformis* DSM13 dans le but d'identifier des séquences similaires.

Dans la session « Regulon Prediction » de PREDetector, les limites de la région régulatrice (région présumée contenir des éléments *cis* fonctionnels) et les limites de co-transcription peuvent être définies par l'utilisateur. Nous avons fixé les limites de la région régulatrice à -350 et +40 nucléotides par rapport au codon d'initiation de la traduction d'un gène. Les limites de co-transcription ont quant à elles été fixées à -10 et +100 nucléotides par rapport au codon *stop* d'un gène.



**A** Alignement multiple

Positions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	24	Scores
OP1	A	A	A	G	T	A	T	A	C	A	T	A	T	G	T	A	A	G	A	T	T	T	T	A	21,84
OP2	C	A	A	A	T	C	T	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	T	C	T	T	T	T	G	19,11
OP3	A	G	A	G	T	A	T	T	A	C	A	T	T	G	T	A	A	G	T	A	T	A	T	G	20,18
Consensus	A	A	A	G	T	A	T	T	A	C	A	T	A	T	G	T	A	A	G	C	T	T	T	G	22,50

**B** Matrice d'alignement

positions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	2	2	3	1	0	2	0	0	3	0	3	1	2	0	0	0	3	2	0	1	1	0	1	1
C	1	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
G	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0	0	2
T	0	0	0	0	3	0	3	3	0	0	0	2	1	3	0	3	0	0	1	1	2	3	2	0

Chaque ligne reprend le nombre de répétition de chaque nucléotide aux 24 positions. Les nombres ombrés correspondent aux nombres de répétition des nucléotides qui constituent la séquence consensus.

**C** Matrice de score « BlaI2010 »

positions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	0.74	0.74	1.11	0.16	-1.39	0.74	-1.39	-1.39	1.11	-1.39	1.11	0.16	0.74	-1.39	-1.39	-1.39	1.11	0.74	-1.39	0.16	0.16	-1.39	0.16	0.16
C	0.29	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	0.29	-1.39	-1.39	-1.39	1.26	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	0.29	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39
G	-1.39	0.29	-1.39	0.89	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	1.26	-1.39	-1.39	0.29	0.89	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	0.89
T	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	-1.39	1.11	-1.39	1.11	-1.39	-1.39	0.74	0.16	1.11	-1.39	1.11	-1.39	-1.39	0.16	0.74	1.11	0.74	1.11	0.74	-1.39

Chaque ligne reprend le score de chaque nucléotide aux 24 positions. Les valeurs ombrés correspondent aux scores des nucléotides qui constituent la séquence consensus.

**Figure 2.29.** Création de la matrice pour la prédiction du régulon Blal. A : Alignement multiple des 3 séquences opératrices du répresseur Blal situées entre les gènes *blaP* et *blaI* et séquence consensus obtenue sur base de cet échantillon de séquence. B : Matrice d'alignement qui reprend la fréquence d'apparition de chaque nucléotide à chaque position de l'alignement. C : Matrice de score Blal qui reprend le score attribué à chaque nucléotide de chaque position de l'alignement.



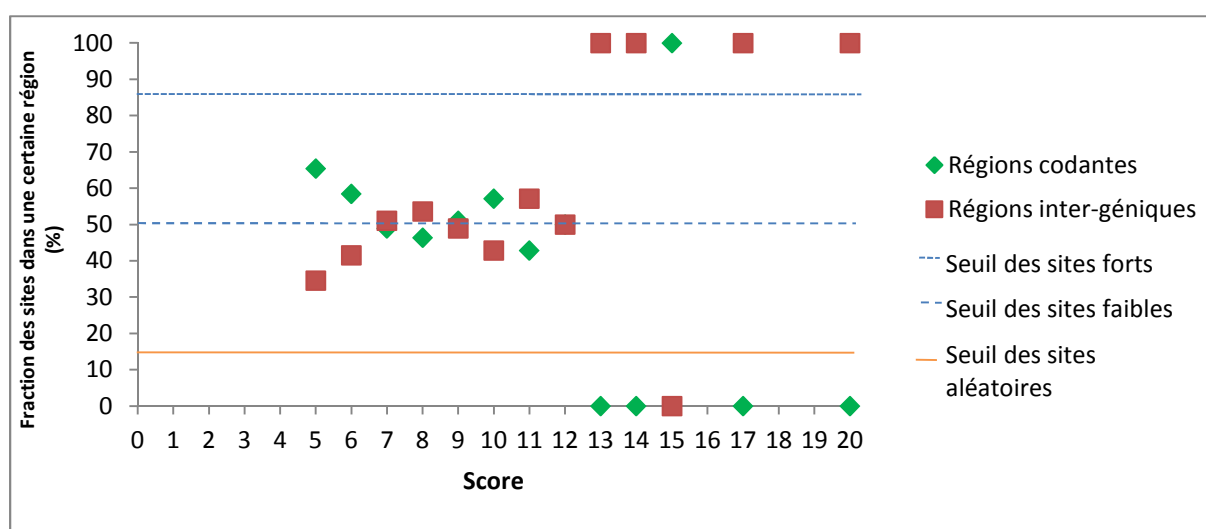
## 2.4.1.2. Analyse de la prédiction du régulon Blal chez *B. licheniformis*

### 2.4.1.2.1. Détermination de la fiabilité des prédictions

PREDetector génère des données statistiques sur la nature de la région du chromosome - codante ou inter-génique - où ont été identifiées des séquences similaires aux sites opérateurs de Blal. L'analyse de cette distribution est cruciale pour estimer la fiabilité de la prédiction car, en effet, la localisation des éléments *cis* fonctionnels est majoritairement inter-génique, et plus précisément dans la région amont d'un gène. Dès lors, il convient de déterminer à partir de quel score les séquences identifiées par la matrice Blal2010 seront biaisées vers ce type de région afin de limiter le nombre de faux positifs issus de notre prédiction.

La figure 2.30 montre la répartition des séquences similaires à OP1-3 jusqu'au score de 5, score fixé arbitrairement afin d'avoir une première estimation de la distribution des séquences de type opérateur de Blal en fonction de leur localisation 'inter-génique' ou 'codante'. Les pourcentages des régions codantes et non codantes chez *B. licheniformis* sont respectivement de 85% et 15%. Le seuil de détection des sites forts est donc fixé à un score où au moins 85% des séquences opératrices de Blal identifiées se situent dans des régions inter-géniques. Selon le graphique, la limite de détection des sites faibles, fixée par convention à un score auquel 50 % des sites identifiés sont localisés dans des régions intergéniques, se situe à un score de 7. Le seuil de détection des sites aléatoires est par contre fixé à un score auquel 15 % des sites sont localisés dans les régions inter-géniques.

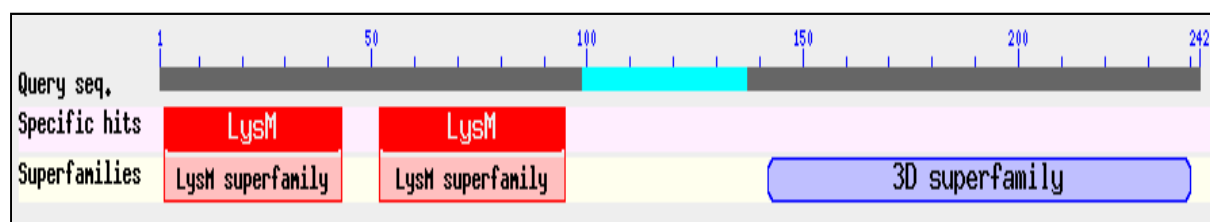
Jusqu'à un score de 13, la grande majorité des séquences identifiées par le programme se situent dans des régions inter-géniques. La probabilité que celles-ci soient effectivement fonctionnelles d'un point de vue régulation génique est donc statistiquement élevée. Notre prédiction se limitera donc à identifier les séquences ayant un score égal ou supérieur à 13.



**Figure 2.30.** Représentation graphique des statistiques reprenant le pourcentage des sites prédits localisés dans les régions codantes et non codantes et illustration de la détermination des seuils de détection des sites « forts » et « faibles » (du point de vue de leur potentialité d'être effectivement liés par Blal) et de distribution aléatoire (pas de préférence pour une région codante ou inter-génique).

#### 2.4.1.2.2. Identification du gène *BL01303* comme candidat potentiel du régulon Blal

Les résultats obtenus pour la prédiction du régulon de Blal chez *B. licheniformis* DSM13 sont présentés à la table 2.2. En parcourant la liste des gènes possédant dans leur région amont une séquence potentiellement reconnue par Blal, on constate que, outre les gènes du divergeon *blaP-blaI-Blar1*, un seul gène possède un élément *cis* (AAAATTTTACATATATAAAATTTTG) statistiquement considéré comme fiable (score supérieur ou égal à 13). Ce gène a été annoté *BL01303* et code pour une protéine annotée comme « peptidoglycan-binding protein ». Une recherche de similarité réalisée à l'aide du programme BlastP (disponible sur le site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), a montré que cette protéine est homologue à la protéine Yoch qui est une protéine présente chez plusieurs bactéries du genre *Bacillus*. On la retrouve notamment chez *Bacillus subtilis* (67% d'identité), *Bacillus pumilus* (65% d'identité), *Bacillus amyloliquefaciens* (62% d'identité), *Bacillus coagulans* (49 % d'identité) et *Lysinibacillus sphaericus* (43% d'identité). Pour cette raison, la protéine codée par le gène *BL01303* de *B. licheniformis* a été nommée « Yoch ». Le programme BlastP permet également de rechercher, sur base de la séquence en acides aminés, des motifs conservés (figure 2.31). Il a permis de mettre en évidence que la protéine Yoch de *B. licheniformis* possède deux motifs LysM dans sa partie N-terminale. Ce type de motif est habituellement retrouvé dans les enzymes bactériennes impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire (Joris *et al.*, 1992). Dans la partie C-terminale de la protéine, on retrouve un domaine contenant un motif avec trois résidus aspartates conservés. Un tel motif est notamment présent dans le domaine catalytique de la transglycosylase lytique de *E. coli*, MltA (van Straaten *et al.*, 2005). Ainsi, Yoch pourrait avoir un rôle à jouer dans la dégradation du peptidoglycane et il pourrait donc être impliqué dans la production du coactivateur de Blal.



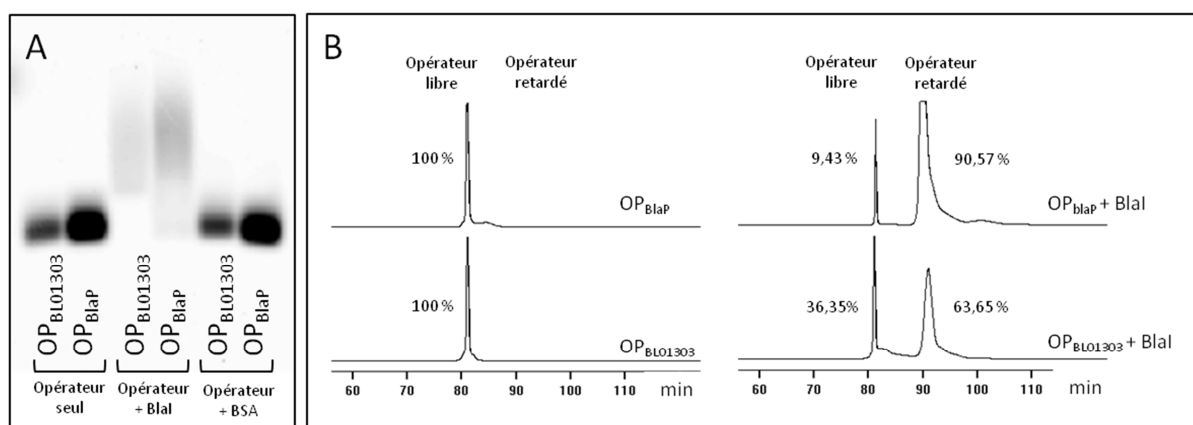
**Figure 2.31.** Représentation schématique des motifs conservés de la protéine Yoch de *B. licheniformis*.

#	Gene Name	Function	Sequence	Score	Position	Co-transcr. gene	Function
1	BL01789c, <i>blaI</i>	putative beta-lactamase repressor protein	ctataactacaaaatgtaatactt	20.63	-35	BL01788c, <i>blaR1</i>	Penicillin-binding protein, transpeptidase domain, Peptidase M56
2	BL01789c, <i>blaI</i>	putative beta-lactamase repressor protein	taaaaactacgtagtaatactt	17.01	-265 -182	-	Penicillin-binding protein, transpeptidase domain, Peptidase M56
	BL01642, <i>blaP</i>	beta-lactamase precursor					
3	BL01789c, <i>blaI</i>	putative beta-lactamase repressor protein	aaaagactacaccttgaagattt	14.7	-289 -158	BL01788c, <i>blaR1</i>	Penicillin-binding protein, transpeptidase domain, Peptidase M56
	BL01642, <i>blaP</i>	beta-lactamase precursor					
4	BL01303c	Peptidoglycan-binding protein	aaaaattttacataataaaatttt	14.58	-231	-	-
5	BL00246c, <i>ioIA</i>	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	taaaattttctttttgtaagattt	12.15	-307 -188	-	-
	BL00182, <i>ioIR</i>	transcriptional regulator (DeoR family)	taaaattttctttttgtaagattt				
6	BL01119c	transcriptional regulator	taaaaaatgaaaatgtaagatat	12.08	-63 -64	-	-
	BL02996c, <i>yhjG</i>	putative Flavoprotein monooxygenase	aaaaactacaaaatgaaaatttt				
8	BL03284, <i>groES</i>	class I heat-shock protein (chaperonin)	ctaaaaattacatatgaaaatatt	11.2	-38 -212	BL03283 BL05050c	class I heat-shock protein (chaperonin) Ydik
	BL05051c, <i>ydiL</i>	Aldo/keto reductase	ctaaaaattacatatgaaaatatt				

**Table 2.2 :** Tableau de résultats de la prédiction du régulon Blal chez *B. licheniformis* DSM13 affichant la liste des séquences cibles potentielles de Blal situées dans les régions régulatrices.

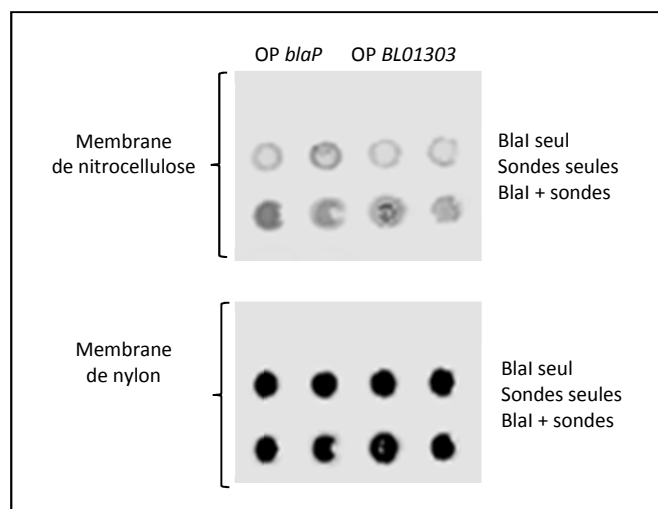
### 2.4.1.3. Blal lie la séquence identifiée en amont du gène *BL01303*

La capacité de Blal à lier la séquence identifiée en amont du gène *BL01303* a d'abord été évaluée par des expériences de retard de migration électrophorétique (ou EMSA pour Electrophoretic Migration Shift Assay) en utilisant la protéine Blal (produite et purifiée par V. Duval selon le protocole décrit par P. Filée et ses collaborateurs en 2002 (Filée *et al.*, 2002)) et une sonde d'ADN de 24 bp marquée au fluorophore Cy5 qui correspond à la séquence identifiée en amont du gène *BL01303* ( $OP_{BL01303}$ ). Lors de nos expériences d'interaction ADN-protéine nous avons utilisé la séquence opératrice OP1 située en amont du gène *blaP* (sonde ADN  $OP_{blaP}$  de 24 bp) comme contrôle positif. L'analyse du retard de migration sur gel agarose 1% montre que la protéine Blal est capable de retarder la séquence opératrice  $OP_{BL01303}$  tout comme  $OP_{blaP}$  (figure 2.32a). La faible résolution de cette technique nous a amené à envisager une analyse du retard de migration électrophorétique à l'aide d'un ALFexpress DNA sequencer (Filée *et al.*, 2001). Cette expérience confirme la liaison spécifique de Blal à cette séquence  $OP_{BL01303}$  et indique également une affinité environ 30 % plus faible que celle de la sonde contrôle correspondant à l'opérateur contrôle  $OP_{blaP}$  (figure 2.32b).



**Figure 2.32.** Validation par EMSA de l'interaction directe entre Blal et la séquence opératrice située en amont du gène *BL01303* codant pour la protéine YochH. A : Un mélange contenant l'opérateur (0,25  $\mu$ M) et la protéine (0,1 mg/ml) a été incubé 2 heures à 30°C puis analysé sur gel agarose 1%. La Bovine Serum Albumine (BSA) a été utilisée comme témoin négatif. B : Un mélange contenant l'opérateur ( $5 \cdot 10^{-9}$ M) et la protéine ( $5 \cdot 10^{-2}$  mg/ml) a été incubé 2 heures à 30°C puis analysé à l'aide d'un ALFexpress DNA sequencer.

L'interaction entre Blal et  $OP_{BL01303}$  a également été évaluée par des expériences de Dot-Blot. Pour cela, nous avons incubé séparément les sondes ADN  $OP_{BL01303}$  et  $OP_{blaP}$ , couplées au fluorophore Cy5, avec la protéine Blal avant de déposer ces mélanges sur deux membranes superposées : une en nitrocellulose, qui fixe les protéines, et une en nylon, qui fixe l'ADN. Ainsi, si une protéine se fixe sur une sonde marquée, un signal fluorescent sera détecté sur la membrane de nitrocellulose. La figure 2.33 montre que Blal fixe l'opérateur de *blaP* ainsi que la séquence identifiée en amont du gène *BL01303*.

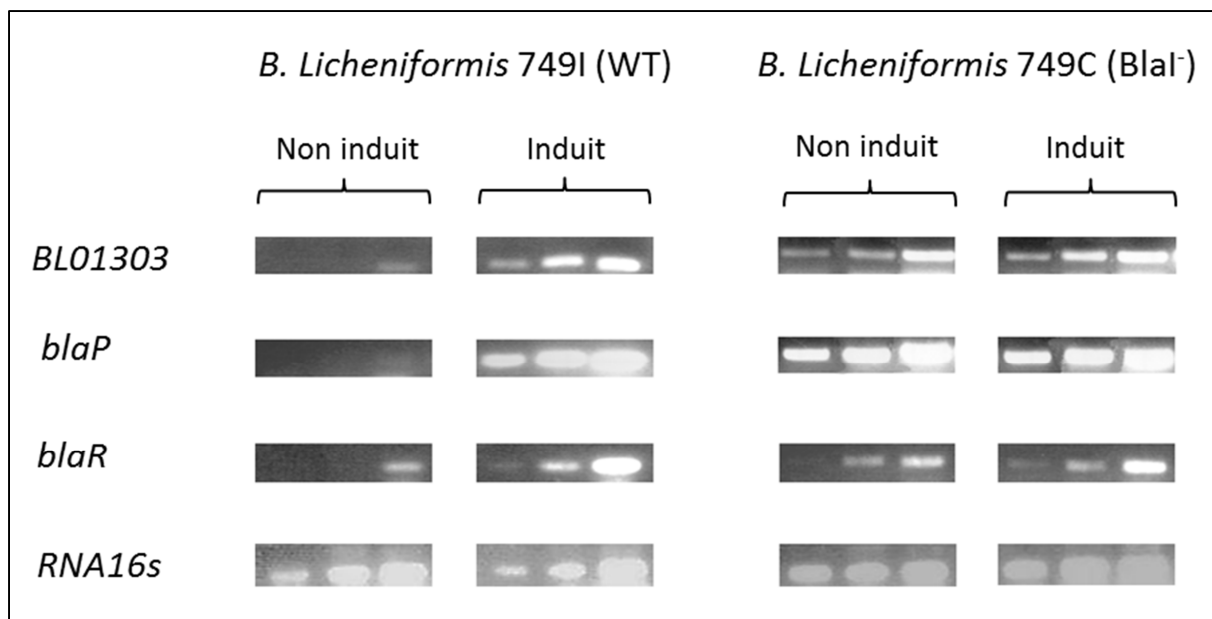


**Figure 2.33.** Analyse par Dot Blot de la liaison de la protéine Blal aux séquences opératrices présentes en amont des gènes *blaP* et *BL01303*. *OP blaP* = séquence opératrice en amont de *BlaP* (*OP1*) ; *OP BL01303* = séquence opératrice en amont de *BL01303*. Les concentrations utilisées pour les sondes nucléotidiques et les protéines sont respectivement 0,25  $\mu$ M et 0,1 mg/ml.

#### 2.4.1.4. Le gène *BL01303* est réprimé par Blal et induit par les antibiotiques à noyau $\beta$ -lactame

L'expression du gène *BL01303* a été évaluée par des expériences de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerization Chain Reaction) semi-quantitatives sur de l'ARN total de *B. licheniformis* cultivé en présence ou non de céphalosporine C. Comme expliqué au chapitre introduction §1.4.4, lorsqu'il n'y a pas d'antibiotique dans le milieu de culture, la protéine Blal peut se lier à ses séquences opératrices et réprimer l'expression du gène en aval de ces séquences *cis*. Par contre, en présence de l'inducteur (un antibiotique), Blal est inactivé par la liaison d'un coactivateur et ne peut plus jouer son rôle de répresseur.

Nous avons comparé l'expression de *BL01303* avec celles des gènes *blaP* et *blaR1*, tous deux également régulés par le répresseur Blal. De plus, deux souches de *B. licheniformis* ont été étudiées : la souche sauvage, *B. licheniformis* 749I et la souche 749C, dans laquelle le gène *blal* est inactivé par l'insertion d'un codon stop. Le gène codant pour l'ARN 16s a été choisi comme standard interne. La figure 2.34 montre que le gène *BL01303* est surexprimé lorsque *B. licheniformis* 749I est stressé en présence de  $\beta$ -lactamine tout comme les gènes *blaP* et *blaR1*. De plus, l'expression du gène *BL01303* dans *B. licheniformis* 749C est similaire en présence ou en absence d'antibiotique, ce qui démontre bien que le répresseur Blal est responsable de sa régulation transcriptionnelle (figure 2.34).



**Figure 2.34.** Validation par RT-PCR de la régulation par Blal de l'expression du gène *BL01303* ainsi que les gènes *blaP* et *blaR* (contrôles positifs). Les expériences de RT-PCR ont été réalisées à l'aide de RNA totaux extraits de la souche *B. licheniformis* 749I (souche sauvage, WT) et du mutant *blaI* (la souche *B. licheniformis* 749c) cultivés en milieu LB additionné (induit) ou non (non induit) de céphalosporine C. Le RNA 16s a été utilisé comme standard (gène non régulé par Blal et non induit par la présence de céphalosporine C). Pour chaque type d'ARN totaux, des échantillons ont été prélevés après 30, 35 et 40 cycles d'amplification, puis analysés sur gel agarose 1%.

#### 2.4.1.5. Discussion

A l'aide du programme PREDetector, nous avons réalisé une prédiction informatique du régulon de Blal sur base des séquences reconnues par ce régulateur et situées dans la région intergénique entre les gènes *blal* et *blaP*. Cette prédiction a permis de mettre en évidence le gène *BL01303* comme étant potentiellement régulé par Blal. Ce gène code pour une protéine homologue à la protéine Yoch de *B. subtilis*, une autolysine. Par analogie, la protéine de *B. licheniformis* a également été nommée Yoch.

Il est intéressant de constater que la séquence potentiellement reconnue par Blal en amont du gène *BL01303* n'a été retrouvée que chez *Bacillus licheniformis* et est donc absente des souches de *Bacillus* n'ayant pas d'orthologues de Blal. Ce constat est un premier élément en faveur d'une fonction de cet élément *cis* au sein du régulon Blal.

Plusieurs preuves expérimentales ont permis de valider cette prédiction. En effet, par des expériences de retard de migration électrophorétique et des expériences de dot blot, nous avons montré que la protéine Blal est capable de lier la séquence ADN identifiée en amont du gène *BL01303*, bien que cette liaison semble être plus faible de la liaison de Blal à son opérateur OP1 (situé devant le gène *blaP*). De plus, des expériences de RT-PCR ont montré que dans la souche sauvage *B. licheniformis* 749I, le gène *BL01303* est induit en présence d'antibiotiques à noyaux  $\beta$ -lactame dans le milieu de culture, tout comme les gènes *blaR1* et *blaP*. Par contre, pour la souche *B.*

*licheniformis* 749C, dans laquelle le gène *blal* a été muté, la présence d'antibiotiques n'a pas d'effet sur la transcription des gènes *blaP*, *blaR* et *BL01303*.

Notons que si la séquence de l'opérateur OP1 de *B. licheniformis* DSM13 est pratiquement identique à celle de l'opérateur OP1 de *B. licheniformis* 749I (23 résidus conservés sur 24), il n'en va pas de même pour les opérateurs OP2 et OP3. Les opérateurs OP2 des souches DSM13 et 749I ont 21 résidus en commun sur 24 et les opérateurs OP3 de ces deux souches ne conservent que 18 résidus sur 24. Ceci explique les scores attribués par le programme PREDetector pour chacune des séquences opératrices de la souche DSM13 : 20.63 pour OP1, 17.01 pour OP2 et 14.7 pour OP3. Les scores attribués à la souche DSM13 sont plus éloignés de la séquence consensus que ceux de *B. licheniformis* 749I. En effet, pour cette souche, les scores des éléments *cis* correspondant à OP1, OP2 et OP3 sont respectivement de 21.64, 19.11 et 20.18. La séquence identifiée en amont du gène *BL01303* de *B. licheniformis* DSM13 a obtenu un score de 14.58. Ce score est très proche du score de OP3, ce qui est en faveur d'un élément reconnu par Blal mais qui peut aussi expliquer pourquoi la liaison de Blal à OP<sub>BL01303</sub> est 30% plus faible que celle à OP<sub>BlalP</sub>.

Dans la littérature, il a été décrit que l'expression du gène *yocH* chez *B. subtilis* est spécifiquement activée par la protéine YycF (Howell *et al.*, 2003). Cette protéine forme avec la protéine histidine kinase YycG un système à 2 composants qui permet la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi cellulaire et la synthèse de protéines membranaires. A l'aide du programme BlastP, il a été montré que ces protéines sont également présentes chez *B. licheniformis* et pourraient également être impliquées dans la régulation de la protéine YocH dans cette souche.

Une prédiction du régulon de YycF chez *B. licheniformis* a été réalisée grâce au programme PREDetector. Pour cela, nous avons créé une matrice de scores sur base de 3 séquences reconnues par YycF de *B. subtilis* : une située devant le gène *ftsA* (TGTTACACACTTGTA AAA ; score = 13,49), une située devant le gène *yocH* (TGTAAGGAACTGTAAT ; score = 12,92) et une située devant le gène *yycF* (TGTTATATAGATGAAAT ; score = 13,07) (Howell *et al.*, 2003) (Shah & Dworkin, 2010). Parmi les résultats de la prédiction du régulon de YycF chez *B. licheniformis* (table 2.3), on remarque la présence d'une séquence en amont du gène *BL01303* avec un score de 10,82.

Chez *B. subtilis*, l'expression de la protéine YocH est également induite par la présence de muropeptides via un processus impliquant la Ser/Thr kinase membranaire PrkC (Shah & Dworkin, 2010). Le modèle proposé est que la protéine YocH, sécrétée dans le milieu extracellulaire, digérerait le peptidoglycane. Les muropeptides digérés se lieraient à la kinase membranaire PrkC. Cette liaison induirait le gène *yocH* via une voie inconnue qui pourrait avoir lieu en parallèle avec le système à deux composants YycFG et résulterait en une production additionnelle de la protéine YocH.

Au vu de nos résultats, chez *B. licheniformis*, le gène *yocH* serait réprimé par le régulateur Blal. Cela n'empêche pas qu'il pourrait également être induit par le système YycFG et/ou la protéine PrkC (également présents chez *B. licheniformis*).

#	Gene Name	Fonction	Sequence	Score	Position	Co-transcr. gene	Function
1	BL02250, ftsA	cell-division protein	tgttacacactgtgaaa	13.49	-89	BL02251	cell-division initiation protein
3	BL01793c, ycdA	putative lipoprotein	tgttatgtaaatgaaaa	11.93	-49	-	-
4	BL01685, chi	conserved protein, Glycoside Hydrolase Family 18	tgtaaaggagatgaaaa	11.78	-10	-	-
5	BL00125, yrhL	ABC transporter	tttacaactttgtaaca	11.76	-186	-	-
6	BL07003	hypothetical protein	attacattttgttaca	11.55	-9	-	-
7	BL01793c, ycdA	putative lipoprotein	atctcattatctaaca	11.34	-127	-	-
8	BL05215c	hypothetical protein	attacatttcttaact	11.18	-350	-	-
9	BL03162c, cspB	major cold-shock protein	attacaactgctaaaca	11.03	-163	-	-
12	BL01303c	Peptidoglycan-binding protein	attacagttgttttacg	10.82	-115	-	-
13	BL00908, lmrB	drug-export protein	tgaaatatacctgtaat	10.82	-330	-	-
18	BL00651c, sigX	RNA polymerase ECF(extracytoplasmic function)-type sigma factor (sigma-X)	attacaactatattacg	10.61	-78	-	-
20	BL01032, rplO	ribosomal protein L15	tgtaaagaactttaa	10.58	-46	BL01031	preprotein translocase subunit
25	BL00030c, rapA	response regulator aspartate phosphatase	attacatttatttaca	10.4	-208	-	-
27	BL02444, alsR	transcriptional regulator (LysR family)	tgtaaacgactgaaat	10.25	-43	-	-
	BL02480c, alsS	alpha-acetolactate synthase (pH6)	tgtaaacgactgaaat		-135	-	-
31	BL01620	hypothetical protein	tgttacacaattgataa	10.25	-268	-	-
	BL01633c, slp	small peptidoglycan-associated lipoprotein	tgttacacaattgataa		-125	-	-
32	BL05018c	hypothetical protein	tgtaagggatgtaaa	10.25	-115	-	-
35	BL01517c	LCI-like cystabiotic	atctcatttctatttca	10.04	-42	-	-
37	BL05018c	hypothetical protein	tgtaagttattgtaaa	10.04	-146	-	-
38	BL00839, pckA	phosphoenolpyruvate carboxykinase	tgttatacacattaaaa	10.01	-39	-	-

**Table 2.3.** Tableau de résultats de la prédiction du régulateur YycG chez *B. licheniformis* DSM13 affichant la liste des séquences cibles potentielles du régulateur YycF situées dans les régions régulatrices.



## 2.4.2. Etude de l'autolysine Yoch de *B. licheniformis*

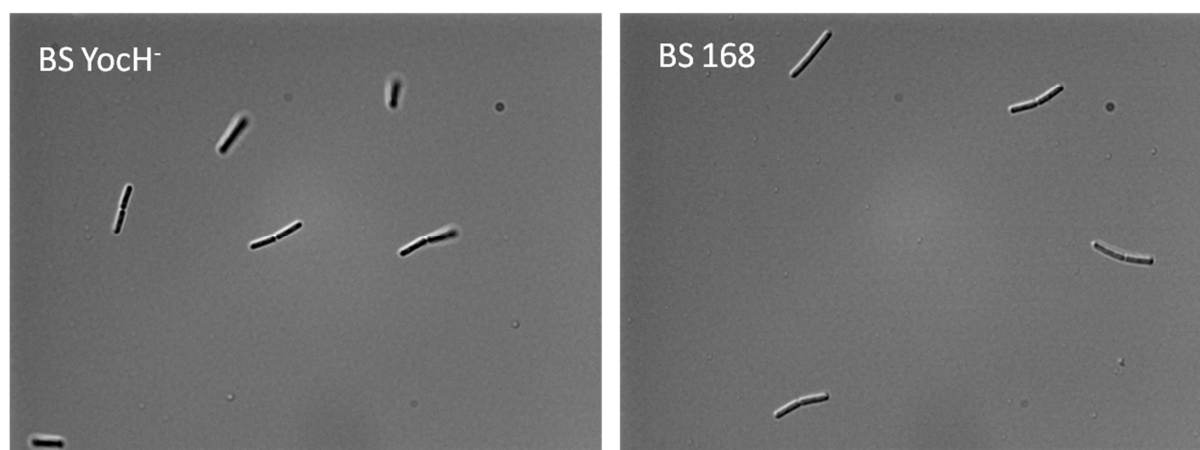
La protéine Yoch semble avoir un rôle à jouer dans la dégradation de la paroi bactérienne et pourrait donc avoir une activité d'autolysine. Comme nous l'avons montré, cette protéine pourrait être régulée par BlaI. Pour ces raisons, il est possible qu'elle soit impliquée dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP et plus particulièrement dans les premières étapes de la formation du pro-coactivateur de BlaI, c'est-à-dire le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-glu-*m*-DAP.

### 2.4.2.1. Comparaison de la séquence du gène *BL01303* de *B. licheniformis* 749I avec celle du mutant *BlaR2*<sup>-</sup>

Le gène *BL01303*, codant pour la protéine Yoch, n'est pas lié au divergeon *blaP-blaI-blaR* et représente donc un candidat potentiel pour être le locus *blaR2*. Nous avons donc amplifié par PCR le gène *BL01303* de la souche sauvage (*B. licheniformis* 749I) et de la souche mutante pour *BlaR2* à l'aide des oligonucléotides *BL01303\_UP* et *BL01303\_RP* (cf. §4.7.7). Nous avons fait séquencer ces amplifications et nous les avons comparées. Il s'est avéré que la séquence du gène *BL01303* est identique dans ces deux souches. Ce gène n'est donc pas le locus *blaR2*.

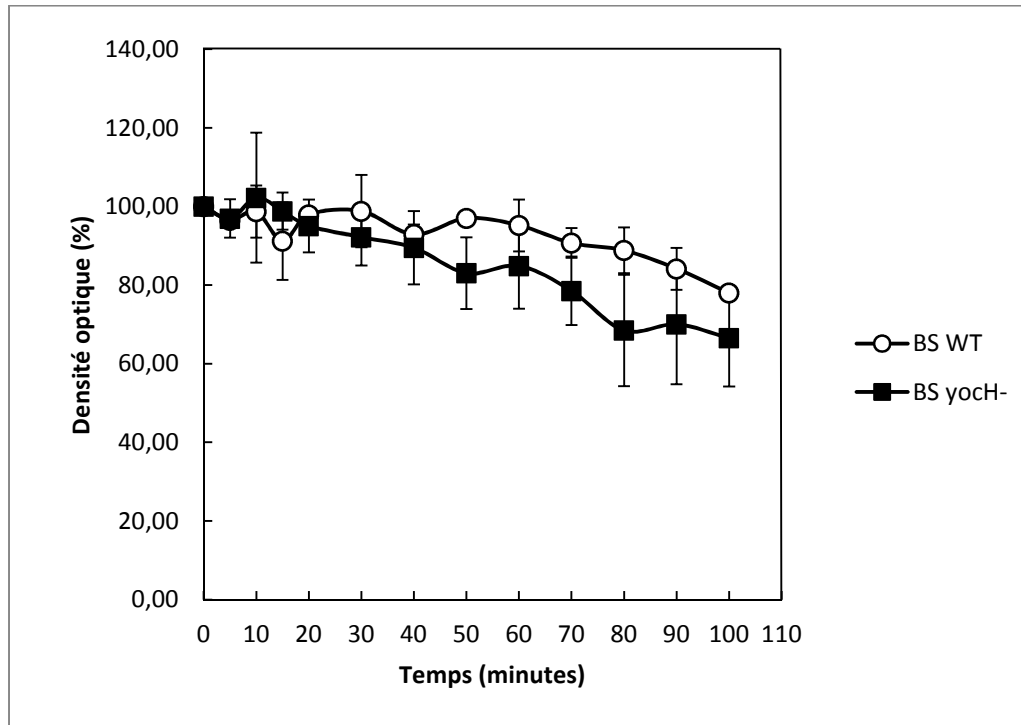
### 2.4.2.2. Phénotype du mutant *Yoch*<sup>-</sup>

Nous avons comparé les caractéristiques de la souche sauvage *B. subtilis* 168 avec celle de la souche mutante *B. subtilis* BFS673 qui est une souche dérivée de *B. subtilis* 168 dans laquelle le gène *BL01303* a été inactivé. Elle nous a été fournie par le laboratoire de M. Hecker de l'Université de Greifswald. Aucune différence n'a été observée entre ces deux souches pour le temps de génération lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu LB ou BH et aucun changement de morphologie n'a été observé par microscopie à contraste de phase (figure 2.35), ce qui indique que la protéine Yoch n'est pas essentielle pour la croissance cellulaire dans nos conditions expérimentales.



**Figure 2.35.** Photographie de *B. subtilis* 168 (BS 168) et *B. subtilis yoch*<sup>-</sup> (BS *yoch*<sup>-</sup>) observés par microscopie à contraste de phase.

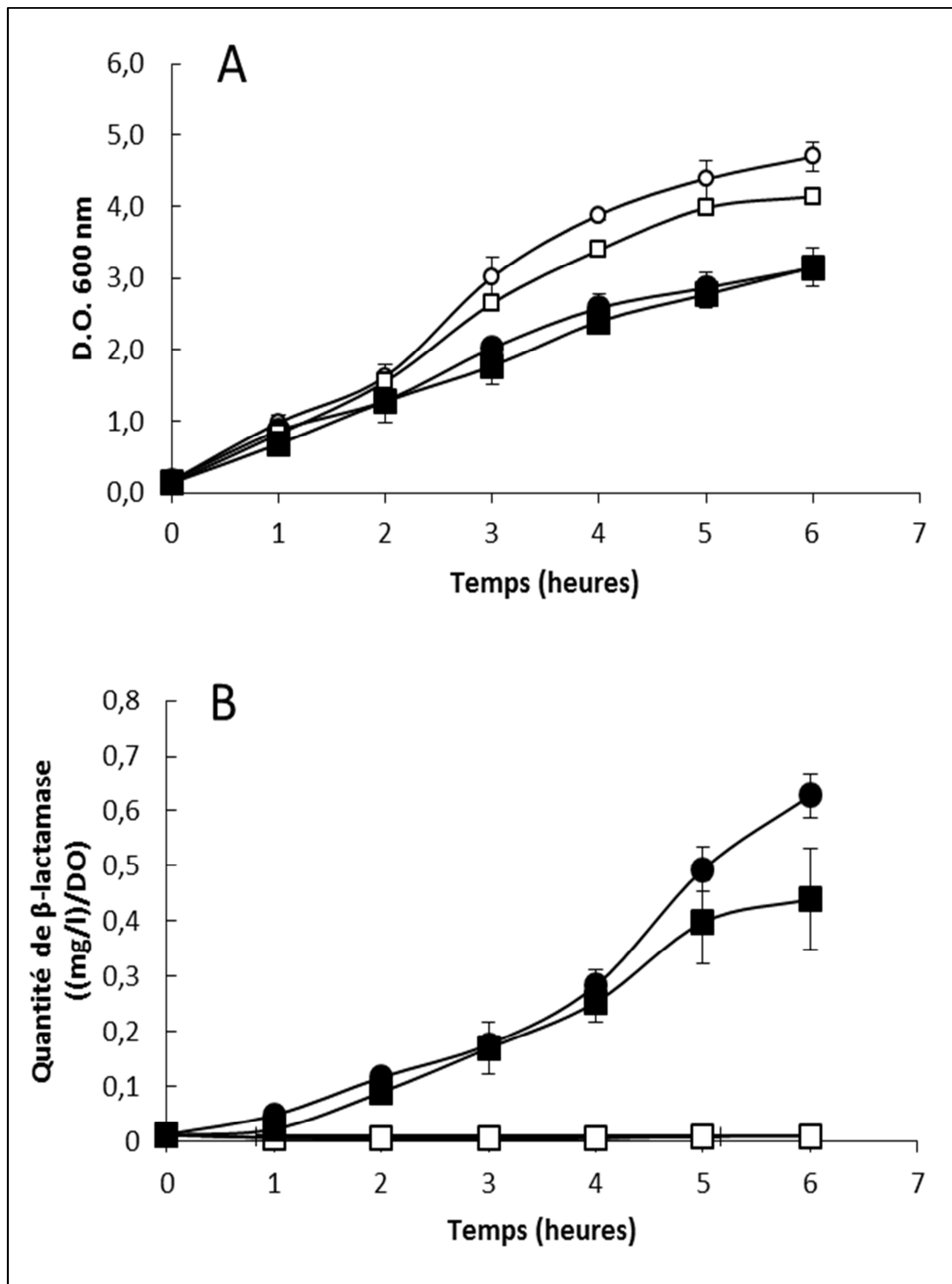
La vitesse d'autolyse, après que les cellules aient été centrifugées et resuspendues dans du tampon physiologique (NaCl 0,9 %), a été analysée pour le mutant *yocH* et la souche sauvage (figure 2.36). Il apparaît que l'inactivation du gène codant pour la protéine YocH n'affecte pas significativement le profil d'autolyse.



**Figure 2.36.** Vitesse d'autolyse de *B. subtilis yocH*<sup>-</sup> comparée à celle de *B. subtilis* 168.

#### 2.4.2.3. Effet de l'inactivation du gène *BL01303* sur l'induction de la $\beta$ -lactamase BlaP

La souche *B. subtilis* BFS673 (*yocH*) a été transformée par le pDML995 et la souche recombinante a été nommée BS995 *yocH*<sup>-</sup>. Sa capacité à induire la production de  $\beta$ -lactamases a ensuite été testée au cours du temps et comparée avec celle de la souche BS995 (*B. subtilis* 168 transformée par le pDML995). Comme le montre la figure 2.37, les courbes de croissance des deux souches sont semblables, que ce soit en présence ou non d'antibiotiques. La mutation du gène *BL01303* n'affecte que peu l'induction de BlaP mais l'effet semble s'intensifier après 5 heures d'induction.



**Figure 2.37.** Comparaison de la courbe de croissance (A) et de la quantité de  $\beta$ -lactamase produite par litre et par unité de densité cellulaire (B) pour la souche BS995  $yocH^-$  et la souche sauvage BS995. (○) BS995 non-induit; (●) BS995 induite ; (□) BS995  $yocH^-$  non induit ; (■) BS995  $yocH^-$  induit.

#### 2.4.2.5. Construction de vecteurs pour la production de la protéine Yoch

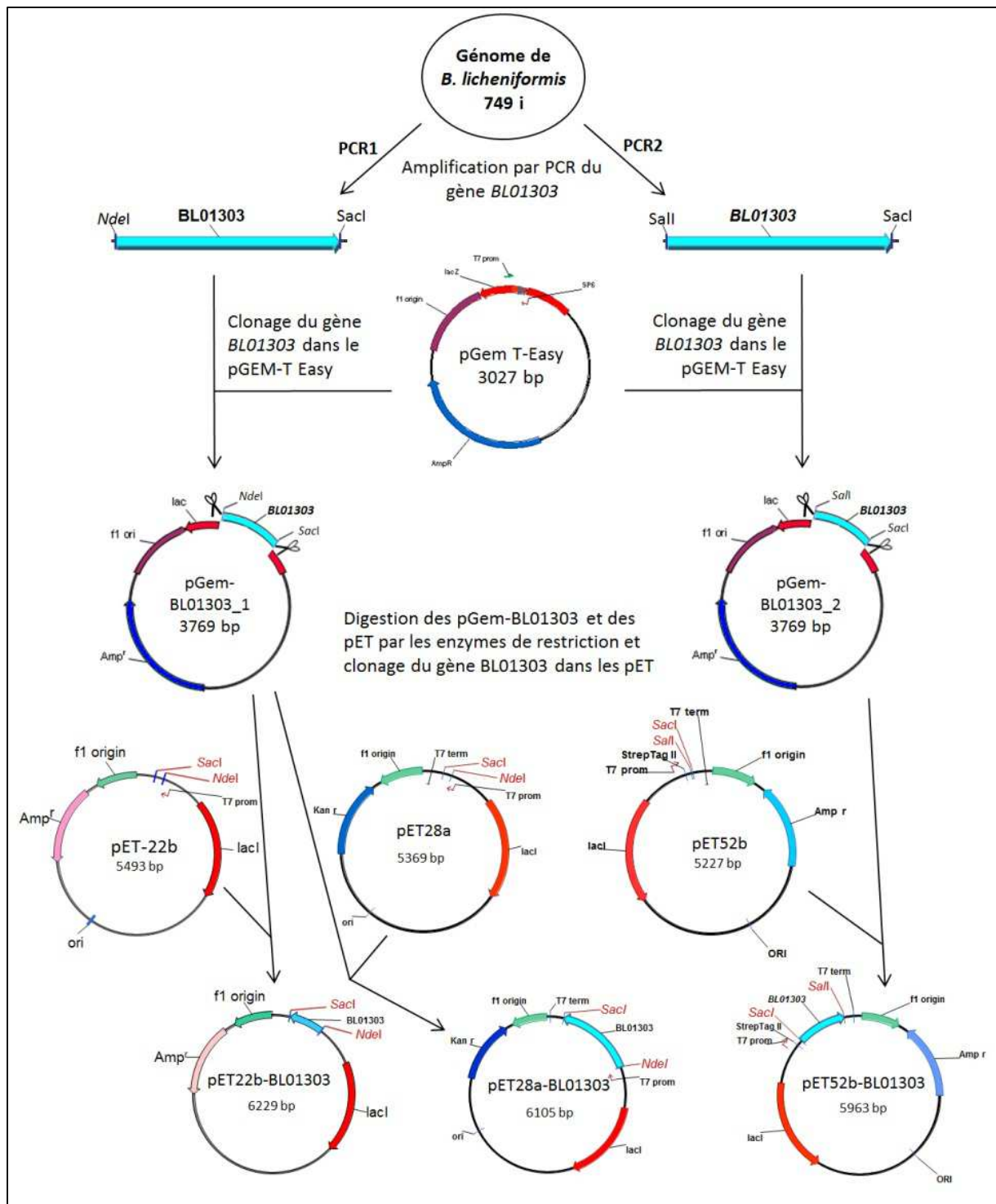
Dans le but de produire la protéine Yoch chez *E. coli*, nous avons construit trois vecteurs dérivés du pET. Le premier pourrait permettre de produire la protéine fusionnée à une étiquette HisTag à son extrémité C-terminale (le pET22b-BL01303). Le deuxième, le pET28a-BL01303, contient une séquence codante pour Yoch avec une étiquette HisTag à chacune de ses extrémités. Le dernier vecteur permettrait de produire la protéine avec une étiquette StrepTag à son extrémité N-terminale et une étiquette HisTag à son extrémité C-terminale (le pET52b-BL01303). Pour cela, le gène codant pour Yoch a tout d'abord été amplifié, à partir du génome de *B. licheniformis* à l'aide des paires d'oligonucléotides suivantes : BL01303Nde5' et BL01303Sacl3'open pour la première PCR et BL01303Sall5' et BL01303Sacl3'open pour la seconde PCR (cf § 4.7.8).

Le produit de la PCR 1 a été cloné dans le pGem T-Easy, puis transféré dans le pET28a ou dans le pET22b à l'aide des sites de restrictions *NdeI* et *SacI* introduits par les oligonucléotides. Les vecteurs résultants ont respectivement été nommés pET28a-BL01303 et pET22b-BL01303. Le produit de la seconde PCR, après avoir été cloné dans le pGem-T-Easy, a été transféré dans le pET52b grâce aux sites de restriction *Sall* et *SacI*. Ce vecteur de production a été appelé pET52b-BL01303 (figure 2.38). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

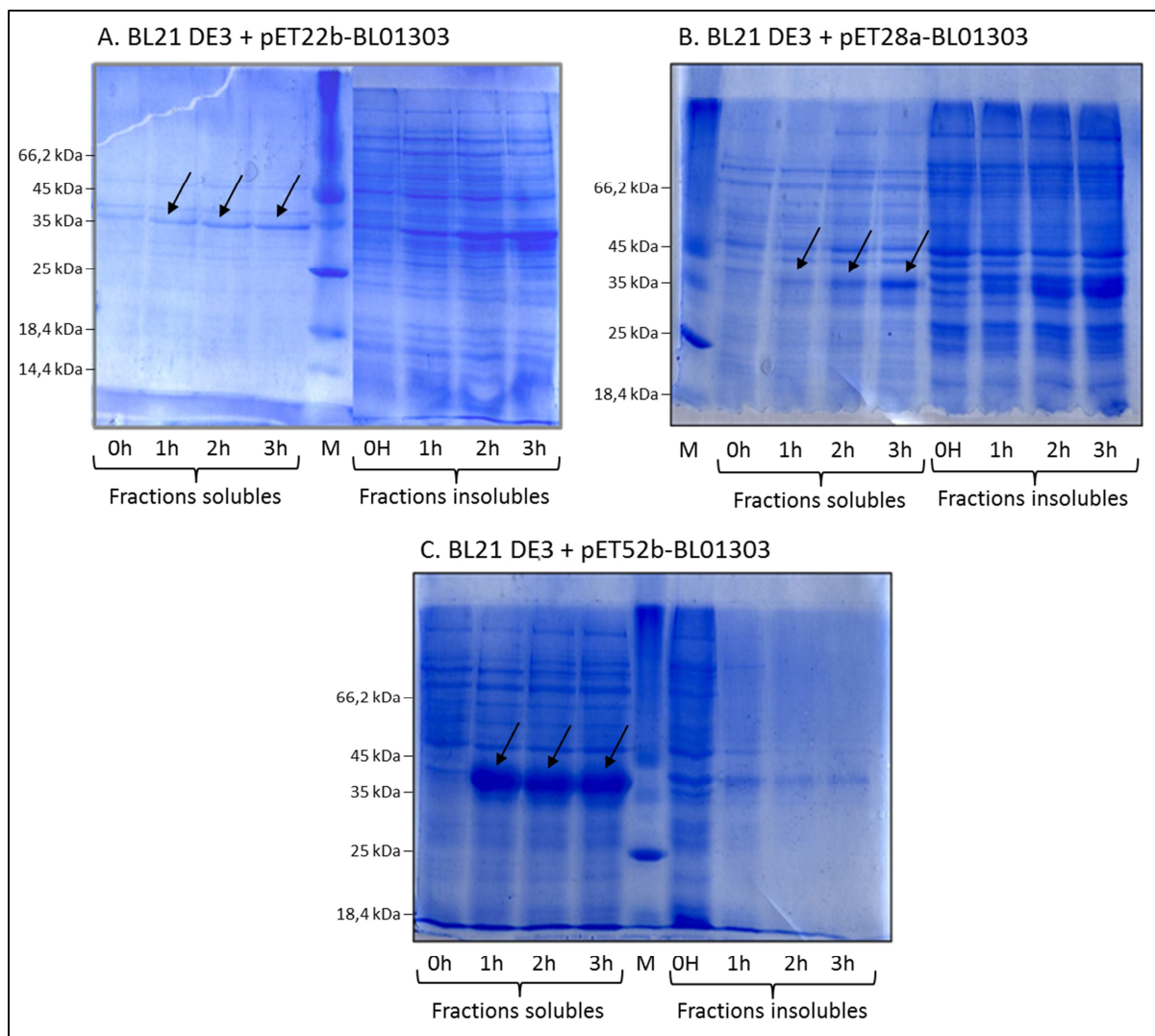
#### 2.4.2.6. Production et purification de Yoch

Pour produire la protéine Yoch, nous avons transformé la souche *E. coli* BL21 DE3 par le pET22b-BL01303, le pET28a-BL01303 ou le pET52b-BL01303. Ces souches transformées ont été cultivées à 37°C en milieu LB additionné de kanamycine 50 µg/ml (pET28a) ou d'ampicilline 100 µg/ml (pET22b et pET52b). Lorsque l' $A_{600}$  de chaque culture a atteint une valeur de 0,8, la production a été induite par l'ajout d'IPTG (1 mM final) et les cultures ont été placées à 37°C pendant trois heures supplémentaires. Les fractions solubles et insolubles d'échantillons prélevés toutes les heures ont été séparées par centrifugation (2 minutes à 6000 g) après une étape de sonication. L'analyse par SDS-PAGE 12% de ces échantillons montre que les souches transformées par le pET22b-BL01303 et le pET28a-BL01303 permettent une faible surproduction de la protéine Yoch, mais que la souche transformée par le pET52b-BL01303 a permis de produire une quantité importante de la protéine Yoch sous forme soluble (figure 2.39).

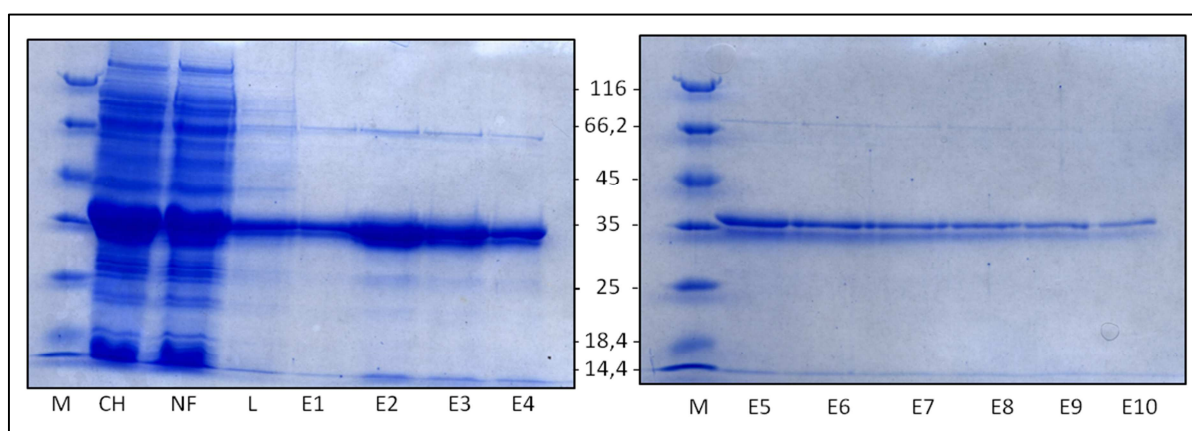
La protéine Yoch produite par la souche *E. coli* BL21/pET52b-BL01303 est fusionnée à une étiquette StrepTag à son extrémité N-terminale. La purification de cette protéine a donc été réalisée par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne Streptactin superflow de 5 ml (Novagen) (cf § 4.9.9). La fraction soluble de la culture a été chargée sur la colonne préalablement équilibrée par du tampon de lavage. La colonne a ensuite été lavée par 50 ml du même tampon. L'élution a été réalisée par 24 ml de tampon d'élution (12 fractions de 2 ml). Les fractions récoltées ont été analysées par SDS-PAGE 12% (figure 2.40). Le rendement de cette production/purification est de 20 mg de protéine pure à plus de 90 % par litre de culture. L'échantillon contenant la protéine Yoch purifiée a ensuite été dialysé contre un tampon Tris 100 mM pH 8 NaCl 150 mM EDTA 1 mM, afin d'éliminer la desthiobiotine contenue dans le tampon d'élution.



**Figure 2.38.** Stratégie de construction des vecteurs de production de la protéine Yoch dans *E. coli* : le pET22b-BL01303, le pET28a-BL01303 et le pET52b-BL01303. Le gène *BL01303*, codant pour la protéine Yoch, a été amplifié par PCR puis inséré dans le pGEM T-Easy. A l'aide des sites de restriction *SacI* et *NdeI* ou *SacI* et *Sall*. Le gène *BL01303* a été purifié du pGEM T-Easy et ensuite cloné dans un vecteur pET.



**Figure 2.39.** Analyse par SDS-PAGE 12 % des fractions solubles et insolubles des échantillons prélevés lors des tests de production de la protéine YochH par les souches de *E. coli* transformées par le pET22b-BL01303 (A), le pET28a-BL01303 (B) ou le pET52b-BL01303 (C). Chaque culture a été induite pour l'ajout d'IPTG (1 mM final). M : marqueur de masse moléculaire.



**Figure 2.40.** Analyse par SDS-PAGE 12% des fractions récoltées lors de la purification de YochH sur colonne StrepTactin. M : marqueur de masse moléculaire ; CH : charge ; NF : non fixé ; L : fraction de lavage ; E1 à 10 : fractions d'élution.

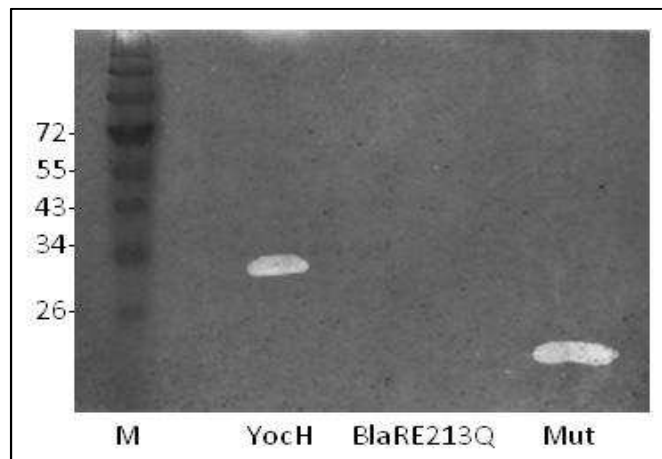


#### 2.4.2.7. Etude de l'activité de YochH

L'analyse bioinformatique de la séquence de la protéine YochH ayant montré qu'elle pourrait avoir une activité d'autolysine, nous avons tenté de le démontrer.

##### 2.4.2.7.1. Analyse de l'activité de YochH par zymogramme

La capacité de la protéine YochH à digérer le peptidoglycane a tout d'abord été testée à l'aide d'un gel SDS 12 % contenant du peptidoglycane. Le gel a été incubé dans une solution de renaturation puis coloré au bleu de méthylène et décoloré dans l'eau. Les parties du gel où le peptidoglycane a été dégradé sont décolorées alors que le reste du gel est bleu. La figure 2.41 montre qu'au niveau de la protéine YochH, le peptidoglycane a été digéré tout comme pour le contrôle positif (la mutanolysine) alors qu'au niveau du contrôle négatif (BlaRE213Q), on ne distingue pas de halo d'hydrolyse. La protéine YochH aurait donc une activité qui permet d'hydrolyser le peptidoglycane.



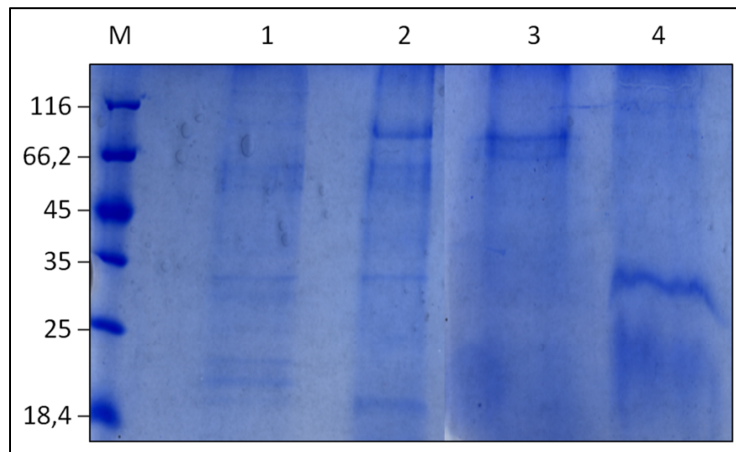
**Figure 2.41.** Analyse sur gel SDS-PAGE 12% contenant du peptidoglycane de l'activité de la protéine YochH de *B. licheniformis*. M : marqueur de masse moléculaire ; Mut : mutanolysine (contrôle positif) ; BlaRE213Q : protéine BlaR1 portant la mutation E213Q (contrôle négatif).

##### 2.4.2.7.2. Test de fixation de YochH au peptidoglycane

Sachant que la séquence de YochH présente deux motifs LysM, qui sont caractéristiques des protéines interagissant avec le peptidoglycane, nous voulions tester la capacité de la protéine à fixer le peptidoglycane. Pour cela, la protéine YochH a été incubée avec du peptidoglycane insoluble. Le peptidoglycane a ensuite été lavé successivement à l'eau milliQ, avec une solution de NaCl 5M, avec une solution de SDS 10% et a ensuite été dégradé par sonication accompagnée d'un traitement à la mutanolysine (cf § 4.16 du chapitre Matériel et méthodes). A chaque étape, un échantillon a été prélevé et analysé par SDS-PAGE afin de déterminer quelle condition libère la protéine YochH du peptidoglycane et d'estimer ainsi la liaison entre ces deux composés. Il apparaît que la protéine YochH



(environ 30 kDa) semble n'être libérée du peptidoglycane qu'après traitement au SDS et à la mutanolysine (figure 2.42). Cette protéine interagirait donc fortement avec le peptidoglycane.

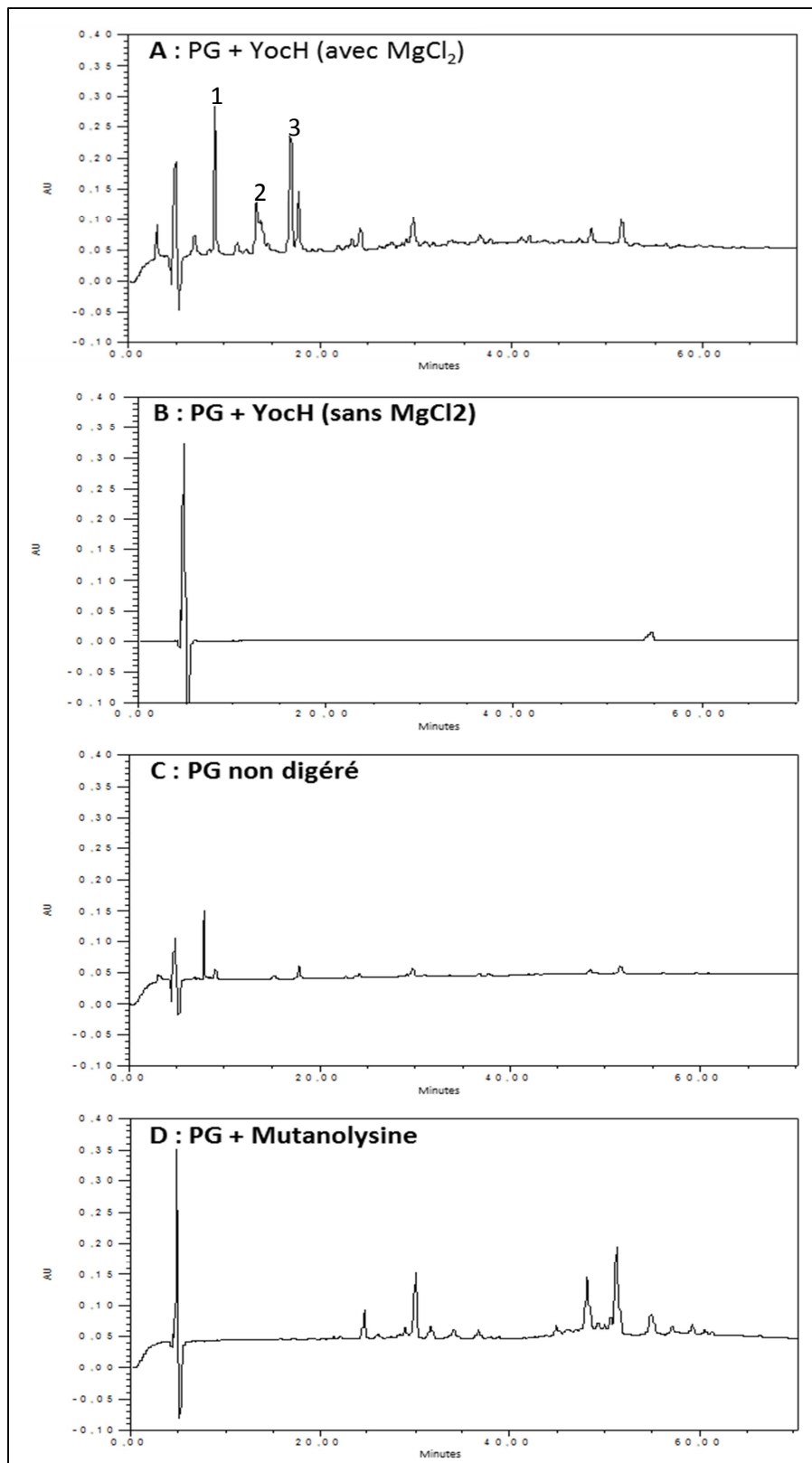


**Figure 2.42.** Test de fixation de YochH au peptidoglycane. Analyse par SDS-PAGE des fractions récoltées après lavage à l'eau milliQ (1), avec une solution de NaCl 5M (2), avec une solution de SDS 10% (3) et traitement par sonication accompagné d'un traitement à la mutanolysine (4) d'une solution contenant du peptidoglycane et la protéine YochH. M = marqueur de masse moléculaire.

#### 2.4.2.7.3. Analyse par HPLC des produits de la dégradation du peptidoglycane par YochH

L'activité de la protéine YochH a également été testée sur du peptidoglycane purifié insoluble remis en suspension dans un tampon phosphate 20 mM pH 6,8. Après une nuit d'incubation à 37°C, les produits de dégradation du peptidoglycane ont été analysés par HPLC sur une colonne Nucléosil 100-3 C18 (Macherey-Nagel) (cf § 4.17). L'ensemble du processus chromatographique a été suivi par mesure d'absorbance à 210 nm. La digestion du peptidoglycane par la mutanolysine a également été analysée dans les mêmes conditions en tant que témoin positif.

Il apparaît que la protéine YochH n'est capable de dégrader le peptidoglycane qu'en présence de  $MgCl_2$  (figure 2.43). Les produits de cette réaction sont élués avec une concentration en acétonitrile très faible, ce qui correspond à des produits de dégradation peu polaire et de petite taille. Le chromatogramme obtenu pour l'échantillon contenant YochH est nettement différent de celui obtenu pour l'échantillon contenant la mutanolysine. Ces deux enzymes n'ont donc pas la même spécificité.



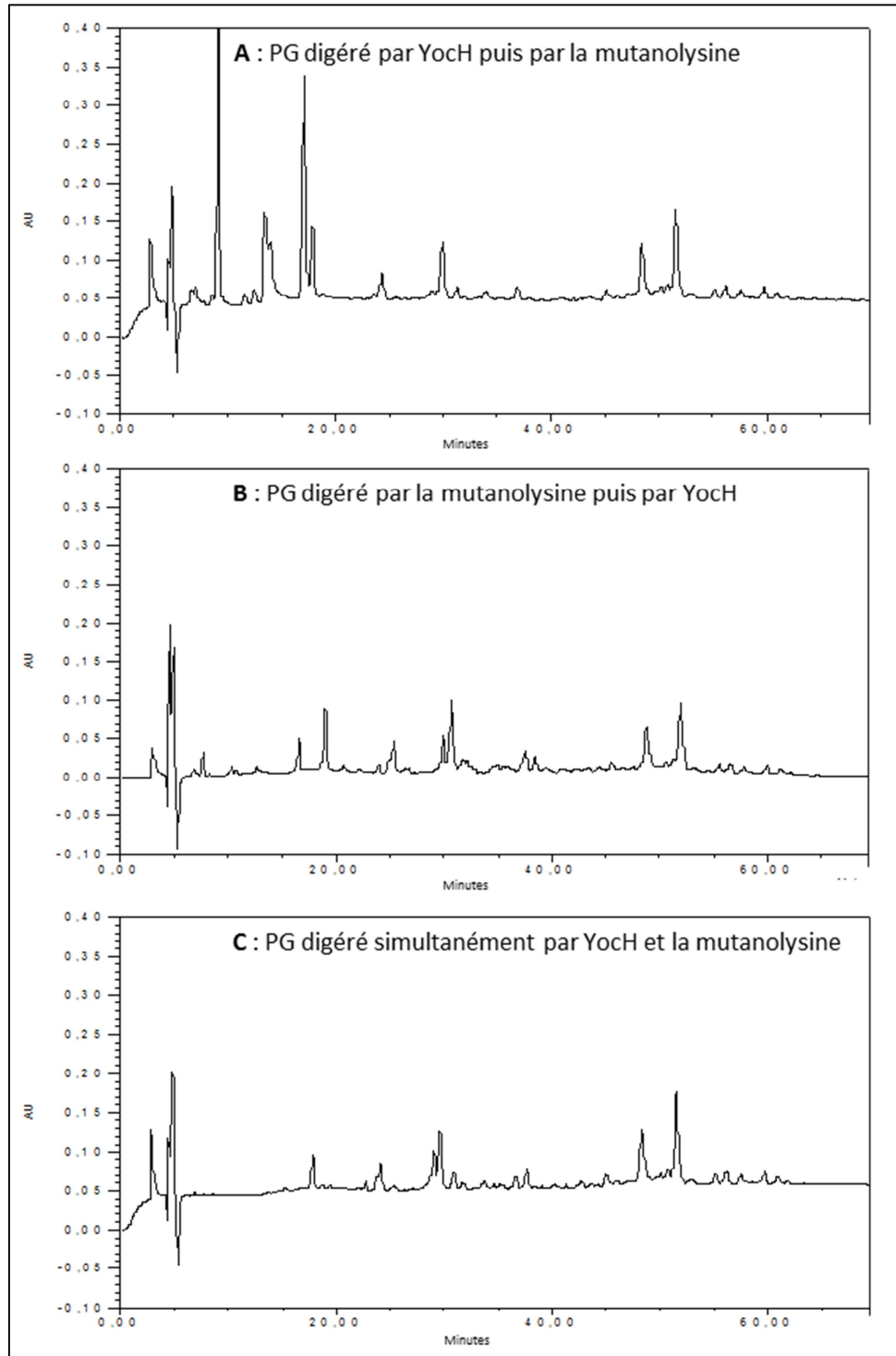
**Figure 2.43.** Analyse par HPLC de la dégradation du peptidoglycane par Yoch en présence (A) ou non de MgCl<sub>2</sub> (B). Le peptidoglycane insoluble non digéré a également été analysé comme témoin négatif (C) et la digestion du peptidoglycane par la mutanolysine a été analysée en tant que témoin positif (D). Les pics annotés 1, 2 et 3 sont ceux correspondant aux fractions qui ont été analysées par spectrométrie de masse.

De plus, si le peptidoglycane est tout d'abord digéré par YocH et que l'on ajoute au mélange réactionnel la mutanolysine, le chromatogramme obtenu après analyse HPLC est fort similaire à celui obtenu lors de la digestion par YocH seul (figure 2.44A). Les fragments de peptidoglycane générés par YocH ne sont donc pas des substrats de la mutanolysine. Inversement, une première digestion par la mutanolysine génère des fragments de peptidoglycane qui ne semblent pas être des substrats de YocH (figure 2.44b). La digestion du peptidoglycane simultanément par les deux enzymes donne un profil de substrat équivalent à celui de la mutanolysine (figure 2.44C). Cette dernière serait donc plus active que YocH dans nos conditions expérimentales.

Le contenu des pics 1, 2 et 3 (voir figure 2.43A) a été récolté et envoyé à D. Blanot au laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques de l'Université Paris-Sud pour une analyse de la composition en acides aminés et une analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Malheureusement, le spectre de masse montre beaucoup de bruit de fond et aucune information pertinente n'a pu en découler. L'analyse de la composition en acides aminés a donné les résultats suivants :

- Le pic 1 : Gly 297 pmol + bruit de fond d'acides aminés
- Le pic 2 : MurNAc 49 pmol, Glu 117 pmol, Ala 100 pmol, DAP 72 pmol, GlcNac 172 pmol (+ Gly 30 2pmol)
- Le pic 3 : MurNAc 23 pmol, Glu 83 pmol, Ala 99 pmol, DAP 74 pmol, GlcNac 103 pmol (+Gly 121 pmol)

Ces résultats confirment que la protéine YocH hydrolyse le peptidoglycane mais ne nous permettent pas de déterminer quelle liaison est clivée.



**Figure 2.44.** Analyse par HPLC de la dégradation du peptidoglycane par Yoch et/ou la mutanolysine. A : Digestion par Yoch puis par la mutanolysine ; B : Digestion par la mutanolysine puis par Yoch ; C : Digestion simultanément par Yoch et la mutanolysine.

#### 2.4.2.9. Discussion

Chez *B. licheniformis*, la protéine YocH, codée par le gène *BL01303*, semble faire partie du régulon de BlaI. Bien qu'elle ne soit pas la mystérieuse protéine BlaR2, elle pourrait intervenir dans le mécanisme d'induction de BlaP. Notre hypothèse était qu'elle pourrait être impliquée dans la production de fragments de peptidoglycane qui donneraient lieu au pro-coactivateur de BlaI.

Le fait que l'inactivation du gène *BL01303*, n'affecte que peu le phénotype d'induction de BlaP montre cependant que cette protéine ne serait pas la seule source de pro-coactivateur. Cependant, il est à noter que l'effet de l'inactivation de *BL01303* sur le phénotype d'induction de BlaP est croissant au court du temps. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la première source de fragments de peptidoglycane est celle obtenue par le turn over habituel de la cellule. Une fois cette source épuisée, c'est l'activité autolytique de YocH qui permettrait de dégrader le peptidoglycane.

Lors de ce travail, la protéine YocH de *B. licheniformis* a été produite et purifiée et son activité a été étudiée. Cette protéine est capable de se fixer au peptidoglycane et de libérer des mucopeptides à partir de celui-ci.

### 2.4.3. Etude de l'opéron ykfABCD

Lorsqu'un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame est présent dans le milieu extérieur, le répresseur Blal est inactivé afin de permettre la transcription de la  $\beta$ -lactamase BlaP. Cette inactivation serait due à la liaison du dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP (Amoroso *et al.*, 2012). Ce coactivateur de Blal pourrait être généré par l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 activée, à partir d'un fragment de peptidoglycane. Ce dernier pourrait être produit par l'action des autolysines qui hydrolysent le peptidoglycane de la paroi et qui sont plus actives lorsqu'il y a un stress cellulaire dû à la présence de l'antibiotique. Bien qu'il n'existe pas de mécanisme de recyclage du peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif, il n'est pas exclu que des fragments de peptidoglycane puissent entrer dans la cellule par l'intermédiaire des oligopeptides perméases et soient ainsi présents en faible concentration dans le cytoplasme. La recherche, dans le génome des souches de *B. subtilis* et *B. licheniformis*, de gènes de fonction inconnue et qui pourraient être homologues à des enzymes qui dégradent ou interagissent avec le peptidoglycane, a permis de mettre en évidence l'opéron *ykfABCD*. En effet, les gènes formant cet opéron pourraient intervenir dans la dégradation et le transport vers le cytoplasme de fragments de peptidoglycane. Le produit du gène *ykfA* (234 a.a.) est homologue à la L,D-carboxypeptidase LdcA de *E. coli* qui hydrolyse le térapeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala en L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP. Ykfb (326 a.a.) est une L-Ala-D/L-Glu isomérase (Schmidt *et al.*, 2001, Gulick *et al.*, 2001). La protéine Ykfc (296 a.a.) est une endopeptidase qui clive la liaison D-Glu-*m*-DAP (Schmidt *et al.*, 2001, Gulick *et al.*, 2001). Enfin, Ykfd (327 a.a.) contient les motifs caractéristiques d'un domaine ATPase d'un ABC transporteur.

#### 2.4.3.1. Comparaison de la séquence de l'opéron *ykfABCD* de *B. licheniformis* 749I avec celle du mutant BlaR2<sup>-</sup>

L'opéron *ykfABCD* pourrait être le locus contenant le gène *blaR2* non encore identifié. Afin de le déterminer, nous avons amplifié et séquencé la région codant pour cet opéron chez *B. licheniformis* 749I et chez la souche mutante BlaR2<sup>-</sup> et nous avons comparé les séquences obtenues pour chaque souche. Les oligonucléotides utilisés sont repris au paragraphe 4.7.4. Nous n'avons relevé aucune différence, ni dans un des 4 gènes qui constituent l'opéron, ni dans la région promotrice. Cet opéron ne contient pas le locus « *blaR2* ». Néanmoins, cela n'exclut pas que cet opéron pourrait interférer avec le mécanisme d'induction de la  $\beta$ -lactamase car il pourrait être impliqué dans la dégradation et/ou le transport du pro-coactivateur de Blal.

#### 2.4.3.2. Inactivation des gènes de l'opéron *ykfABCD* chez *B. subtilis*

Afin de savoir si l'opéron *ykfABCD* est important pour l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP, nous avons entrepris l'inactivation de ces gènes chez *B. subtilis*, souche permettant l'étude de l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP lorsqu'elle est transformée par le pDML995 contenant le divergeon *blaP-blaI-blaR1* de *B. licheniformis*.

Pour inactiver chaque gène de l'opéron, nous avons construit 4 vecteurs dérivés du pDML2523 (Brans *et al.*, 2004). Un schéma récapitulatif de l'inactivation est détaillé à la figure 2.45.

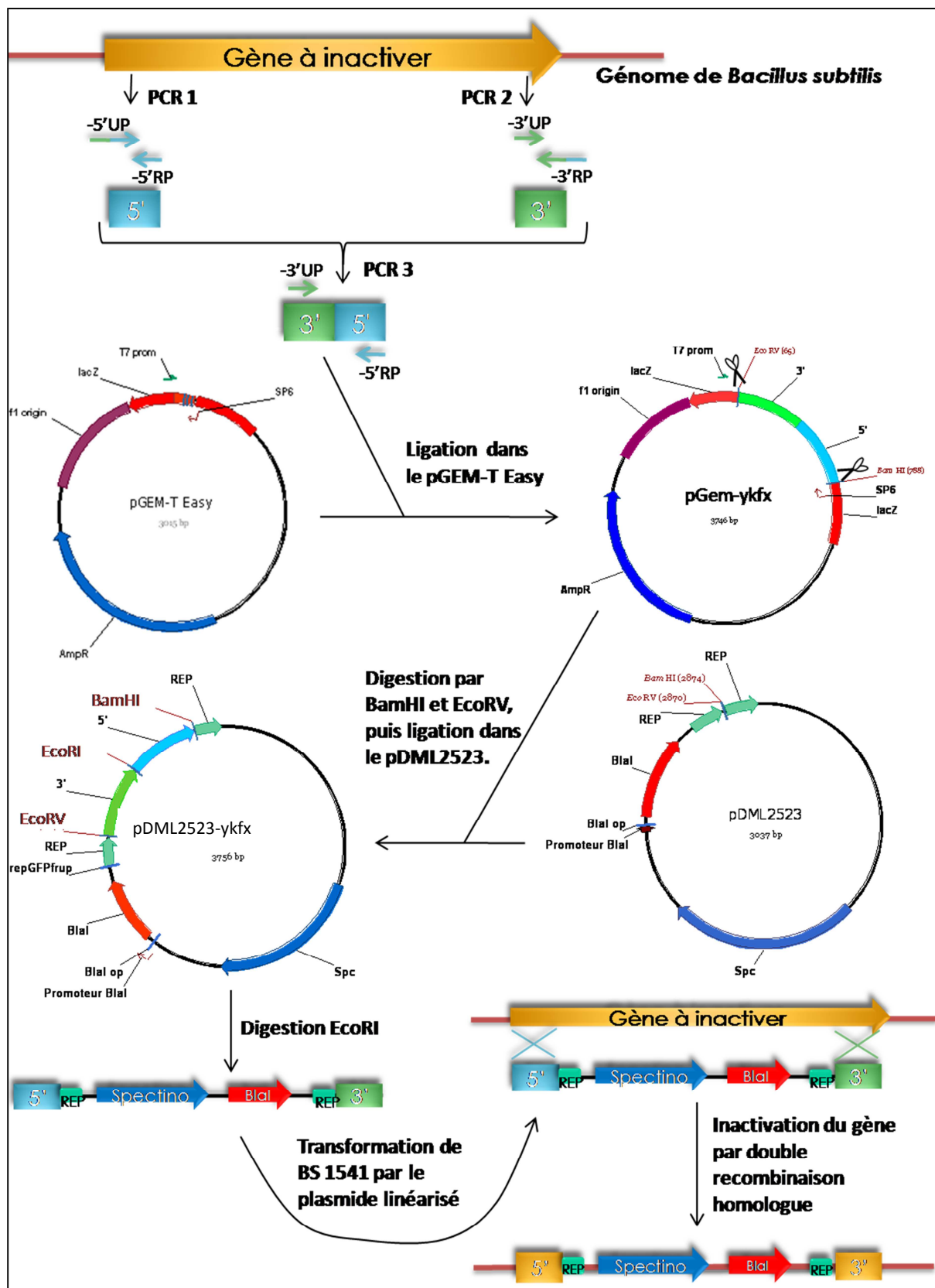


Figure 2.45. Schéma représentant la stratégie utilisée pour l'inactivation des gènes de l'opéron *ykfABCD* chez *B. subtilis*. Pour plus de détails, voir dans le texte.

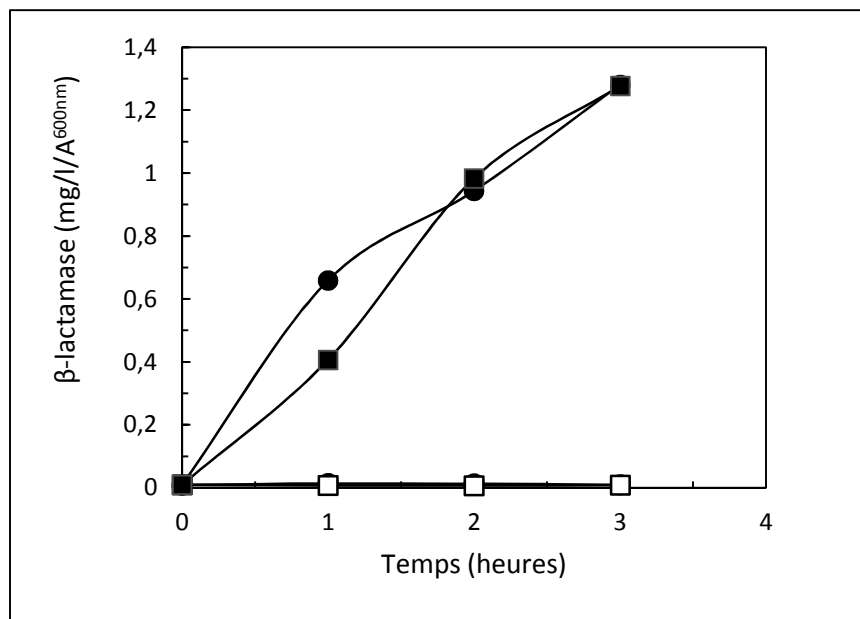


Tout d'abord, les extrémités 3' et 5' de chaque gène ont été amplifiées grâce aux oligonucléotides décrits dans le tableau des oligonucléotides synthétiques (cf § 4.7.5). Les oligonucléotides -5'UP et -3'RP possèdent une « queue flottante » et sont complémentaires, ce qui permet d'obtenir deux produits PCR avec des « bouts collants ». Ensuite, ces deux fragments sont assemblés par PCR en utilisant les oligonucléotides -3'UP et -5'RP (figures 2.45). Ce troisième produit PCR est ensuite cloné dans le pGEM-T Easy. Les sites *BamHI* et *EcoRV*, introduits grâce aux oligonucléotides -3'UP et -5'RP, permettent l'excision de l'insert du pGEM et son insertion dans le pDML2523. Un site de restriction *EcoRI* a été introduit, entre les parties 3' et 5' du produit PCR 3, grâce aux oligonucléotides -5'UP et -3'RP. Chaque vecteur obtenu est linéarisé en *EcoRI* et utilisé pour transformer la souche BS1541. Ces plasmides dérivés du pDML2523 contiennent une cassette composée du gène *blal*, du gène de résistance à la spectinomycine et de deux courtes séquences répétées inverses, chacune située aux extrémités de la cassette. La souche BS1541 est une souche dérivée de *B. subtilis* 168, où le promoteur du gène *lysA* a été remplacé par le promoteur du gène *blaP* de *B. licheniformis* (Brans *et al.*, 2004). Ainsi, après l'intégration d'un des plasmides construits dans le chromosome de cette souche par recombinaison homologue et sélection positive pour la résistance à la spectinomycine, cette souche devient auxotrophe pour la lysine. La cassette *Blal* peut être excisée par une simple recombinaison entre les deux séquences répétées inverses.

Malheureusement, seul le gène *ykfD* a pu être inactivé par cette méthode. La souche de *B. subtilis* dans laquelle le gène *ykfD* a été inactivé a été nommée BS1541ykd<sup>-</sup>.

#### 2.4.3.3. Effet de l'inactivation du gène *ykfD* sur l'induction de *BlaP*

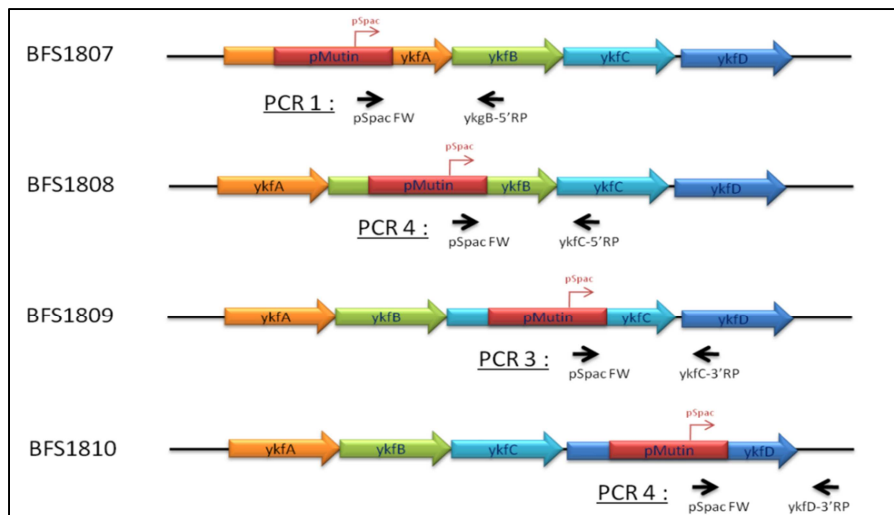
Afin de déterminer l'effet de l'inactivation du gène *ykfD* sur l'induction de la  $\beta$ -lactamase *BlaP*, la souche de *B. subtilis* BS1541ykd<sup>-</sup> a été transformée par le pDML995 afin d'y introduire le divergeon *blaP-blal-blaR1*. La production de  $\beta$ -lactamases de cette souche a été déterminée et comparée à celle de *B. subtilis* 168 transformée par le même plasmide (BS995) (Figure 2.46). Il apparaît que la souche, dans laquelle le gène *ykfD* a été inactivé, présente un retard d'environ une heure pour l'initiation de l'induction de la  $\beta$ -lactamase par rapport à la souche sauvage.



**Figure 2.46.** Comparaison de la quantité de  $\beta$ -lactamases produite par litre et par unité de densité cellulaire par la souche BS1541ykfD'995 avec celle produite par la souche sauvage BS995. (○) BS995 non-induit; (●) BS995 induite ; (□) BS1541ykfD'995 non-induit ; (■) BS1541ykfD'995 induit.

#### 2.4.3.4. Effet de l'inactivation des gènes de l'opéron ykfABCD sur l'induction de BlaP

Les souches de *B. subtilis* BFS1807, BFS1808, BFS1809 et BFS1810 dans lesquelles les gènes *ykfA*, *ykfB*, *ykfC* et *ykfD*, respectivement, ont été inactivés, nous ont été fournies par le laboratoire de Kevin Devin du Trinity College à Dublin. Dans ce cas-ci, l'inactivation des gènes a été réalisée par l'insertion d'un plasmide dérivé du pMutin2 contenant notamment une résistance à l'érythromycine et un promoteur Pspac inducible à l'IPTG. Avec cette méthode, le fragment inséré ne peut pas être retiré mais le promoteur introduit permet l'expression, en présence d'IPTG, des gènes de l'opéron en aval du gène interrompu (Vagner *et al.*, 1998). Ces souches ont été vérifiées par PCR en utilisant un oligonucléotide complémentaire au promoteur Pspac et un autre complémentaire à une séquence située en aval du gène inactivé (figure 2.47) (cf § 4.7.5).



**Figure 2.47.** Schéma représentant les oligonucléotides utilisés pour réaliser une PCR afin de vérifier l'inactivation des gènes *ykfA*, *ykfB*, *ykfC* ou *ykfD*, respectivement dans les souches BFS1807, BFS1808, BFS1809 et BFS1810.

Ces souches mutantes de *B. subtilis* ont été transformées par le pDML995 afin d'y introduire le divergeon *blaP-blaI-blaR1*. Ces souches transformées ont été nommées comme suit :

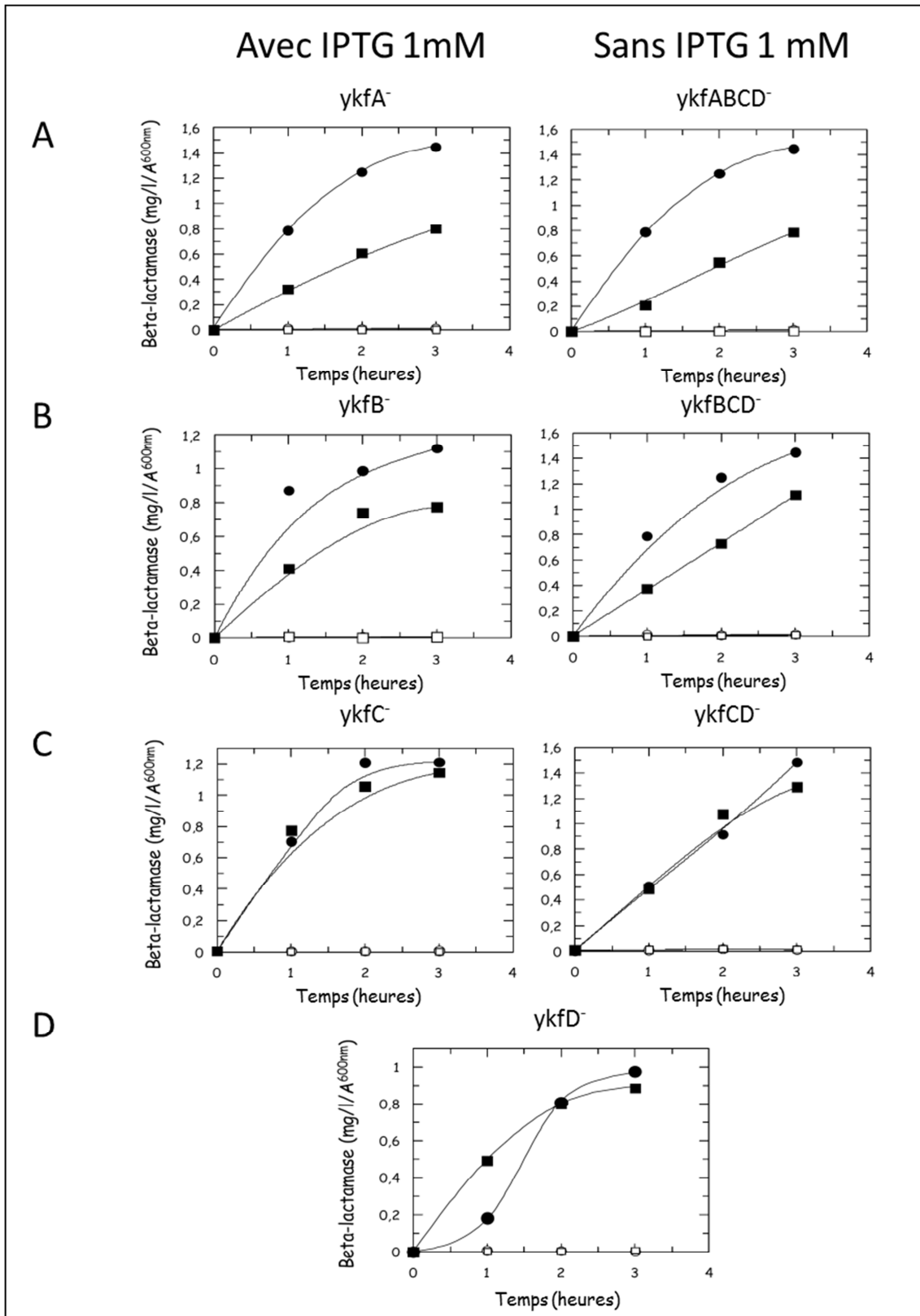
- BS995 *ykfA*<sup>-</sup> = souche BFS1807 (*ykfA*<sup>-</sup>) transformée par le pDML995
- BS995 *ykfB*<sup>-</sup> = Souche BFS1808 (*ykfB*<sup>-</sup>) transformée par le pDML995
- BS995 *ykfC*<sup>-</sup> = Souche BFS1809 (*ykfC*<sup>-</sup>) transformée par le pDML995
- BS995 *ykfD*<sup>-</sup> = Souche BFS1810 (*ykfD*<sup>-</sup>) transformée par le pDML995

Afin de déterminer l'effet de l'inactivation des gènes de l'opéron *ykfABCD* sur l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP, nous avons comparé la production de  $\beta$ -lactamases de ces souches avec celle de *B. subtilis* 168 transformée par le pDML995 (BS995).

Les cultures ont été réalisées en présence ou non d'IPTG. En présence d'IPTG, les gènes sous le contrôle du promoteur Pspac sont exprimés (*ykfA*<sup>-</sup>, *ykfB*<sup>-</sup>, *ykfC*<sup>-</sup>, *ykfD*<sup>-</sup>). Par contre, sans ajout d'IPTG dans le milieu de culture, les gènes sous le contrôle du Pspac sont réprimés (*ykfABCD*<sup>-</sup>, *ykfBCD*<sup>-</sup>, *ykfCD*<sup>-</sup>) (figure 2.48).

Les résultats obtenus montrent que l'inactivation de *ykfA* ou *ykfB* affecte l'induction de BlaP en réduisant la quantité de  $\beta$ -lactamases produite d'un facteur de 2 et 1,5 respectivement. L'effet négatif de l'inactivation de *ykfA* et *ykfB* confirme que ces enzymes impliquées dans la dégradation du peptidoglycane affectent l'induction de BlaP. L'inactivation de *ykfC* ne semble pas avoir d'effet sur le mécanisme d'induction alors que le mutant *ykfD*<sup>-</sup> présente un retard d'environ une heure pour l'initiation de l'induction de la  $\beta$ -lactamase. Le profil d'induction obtenu pour la souche BS995 *ykfD*<sup>-</sup> est comparable à celui obtenu pour la souche BS1541*ykfD*<sup>-</sup> transformée par le pDML995. Les deux méthodes d'inactivation semblent donc être équivalentes.

On n'observe pas de différence significative entre la quantité de  $\beta$ -lactamases produite par ces mutants en présence ou non d'IPTG. Ceci peut-être expliqué par le fait que le promoteur Pspac pourrait avoir des fuites et permettre une expression résiduelle même en absence d'IPTG (Vagner *et al.*, 1998) (Kobayashi *et al.*, 2003).



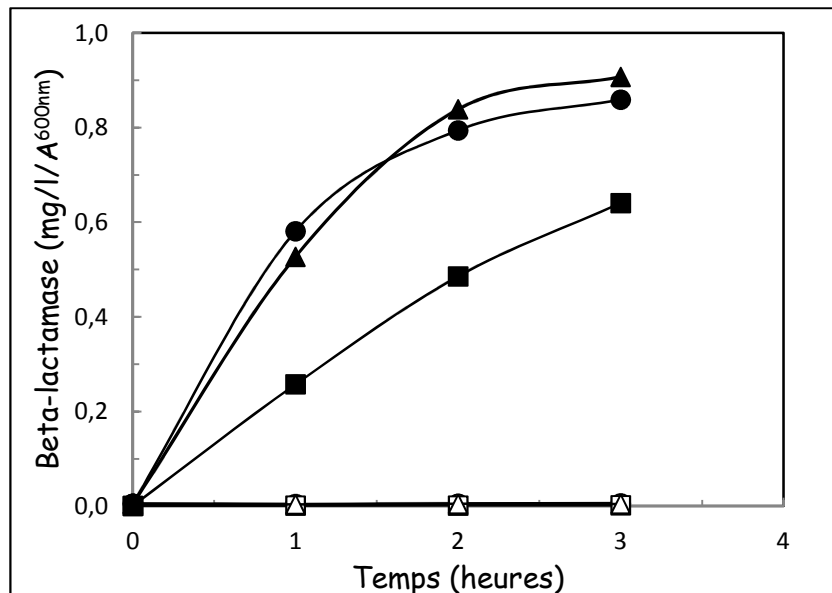
**Figure 2.48.** Comparaison avec la souche sauvage BS995 de la quantité de  $\beta$ -lactamases produite par litre et par unité de densité cellulaire des souches de *B. subtilis* dont les gènes de l'opéron *ykfABCD* ont été inactivés par insertion d'un pMutin. A : BS995 *ykfA*<sup>-</sup> ; B : BS995 *ykfB*<sup>-</sup> ; C : BS995 *ykfC*<sup>-</sup> ; D : BS995 *ykfD*<sup>-</sup>, en présence ou non d'IPTG. (○) BS995 non-induit ; (●) BS995 induite ; (□) mutant non induit ; (■) mutant induit.

#### 2.4.3.5. Complémentation du mutant ykfA-

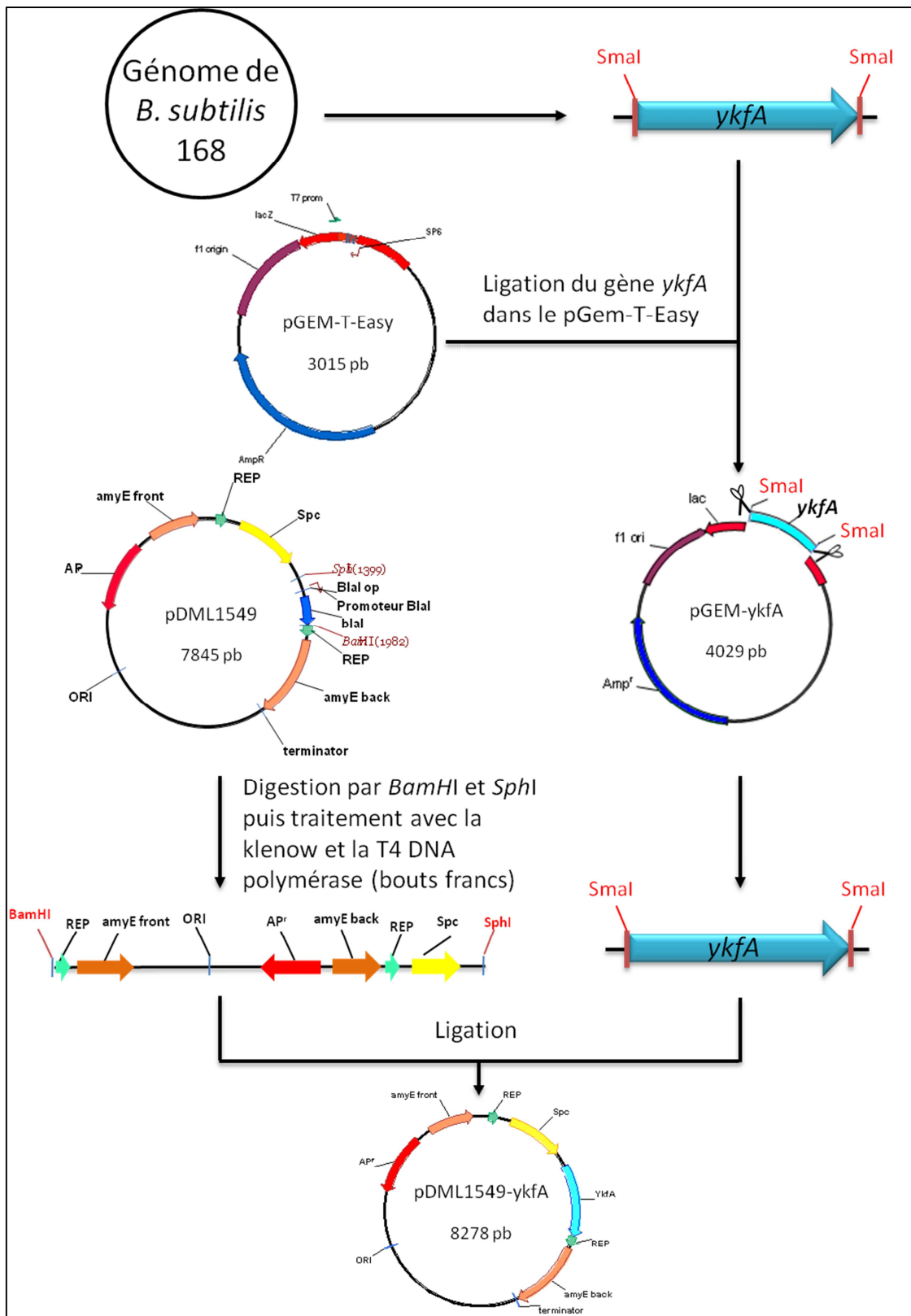
Afin de vérifier que l'effet observé sur l'induction est bien dû à l'inactivation du gène et pas à l'insertion d'une séquence génomique exogène dans le génome de la bactérie, nous avons entrepris la complémentation du gène *ykfA* dans la souche BFS1807. Pour cela, nous avons construit le plasmide pDML1549-ykfA, dérivé du pDML1549 (Brans *et al.*, 2004), qui permettra d'insérer le gène *ykfA* à la place du gène non essentiel *amyE* de *B. subtilis* qui code pour une  $\alpha$ -amylase (figure 2.50).

Le gène *ykfA* a été amplifié à partir du DNA génomique de *B. subtilis* 168 à l'aide des oligonucléotides ykfASma15' et ykfASma13' (cf § 4.7.5). Le produit PCR a ensuite été cloné dans le pGEM-T Easy. Les sites de restriction *SmaI*, introduits à chaque extrémité du gène grâce aux oligonucléotides, permettent l'excision de l'insert. Le pDML1549 a, quant à lui, été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Sph*I puis a été traité avec les enzymes Klenow et T4 DNA polymérase afin de rendre ses « bouts francs ». Le gène *ykfA* est ensuite inséré dans ce vecteur pour donner le pDML1549-ykfA.

Le pDML1549-ykfA a ensuite été transformé dans des cellules compétentes de la souche BFS1807 (*ykfA*<sup>-</sup>). Les clones ayant intégré le gène *ykfA* ont été sélectionnés sur milieu LB contenant de l'érythromycine (2  $\mu$ g/ml ; résistance introduite par le pMutin) et de la spectinomycine (100  $\mu$ g/ml ; résistance introduite par le pDML1549-ykfA). Les clones sélectionnés ont été vérifiés par PCR à l'aide des oligonucléotides amyEfront et amyEback (cf § 4.7.5). Cette souche, que nous avons nommée BSykfA<sup>+</sup>, a ensuite été transformée par le pDML995 pour donner la souche BS995 *ykfA*<sup>+</sup>. La production de la  $\beta$ -lactamase BlaP par celle-ci a été déterminée et comparée à celle de la souche sauvage BS995. Il apparaît que le phénotype de la souche complétementée est similaire à celui de la souche sauvage (figure 2.49). Ainsi, l'effet négatif observé sur l'induction de BlaP pour la souche BS995 *ykfA*<sup>-</sup> serait bien dû à l'inactivation du gène *ykfA*.



**Figure 2.49.** Comparaison de la quantité de  $\beta$ -lactamases produite par litre et par unité de densité cellulaire par la souche BS995 *ykfA*<sup>+</sup> avec celle produite par la souche BS995 *ykfA*<sup>-</sup> et la souche sauvage BS995. (○) BS995 non-induit ; (●) BS995 induite ; (□) BS995 *ykfA*<sup>-</sup> non induit ; (■) BS995 *ykfA*<sup>-</sup> induit ; (△) BS995 *ykfA*<sup>+</sup> non induit ; (▲) BS995 *ykfA*<sup>+</sup> induit.



**Figure 2.50.** Schéma de la stratégie de construction du pDML1549-ykfA. Le gène *ykfA* a été amplifié par PCR et cloné dans le pGEM T-Easy. Il a ensuite été purifié du pGEM à l'aide de deux sites de restriction *SmaI*. Le pDML1549 a été linéarisé puis traité avec les enzymes Klenow et T4 DNA polymérase afin d'obtenir des « bouts francs ». Le gène a ensuite été inséré dans le pDML1549 par ligation.

#### 2.4.3.6. Discussion

Il a été démontré que le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP joue le rôle de coactivateur de BlaI (Amoroso *et al.*, 2012). La question à laquelle il faut alors répondre est : comment ce dipeptide est-il généré ? Notre hypothèse de travail est que le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP serait généré par l'activité de la boucle L3 activée, sur un fragment de peptidoglycane : le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP. Ce fragment pourrait être produit par l'action des autolysines qui hydrolysent le peptidoglycane de la paroi et qui sont activées par le stress cellulaire dû à la présence d'antibiotique.

Dans toutes les eubactéries, le peptidoglycane est continuellement synthétisé et dégradé durant la croissance cellulaire (Park & Uehara, 2008). Les enzymes de dégradation impliquées dans ce turnover sont des enzymes autolytiques. Chez les *Enterobacteriaceae*, les fragments de peptidoglycane générés par cette activité catabolique sont transportés dans le cytoplasme et le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP, relâché durant ce processus, est recyclé efficacement, c'est-à-dire qu'il est réutilisé pour la synthèse de peptidoglycane de novo (Park & Uehara, 2008, Uehara & Park, 2008). Par contre, chez les bactéries Gram-positives, il n'a pas été démontré que les fragments de peptidoglycane générés par les enzymes autolytiques sont réinjectés dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane. Cependant, bien qu'il n'existe pas de mécanisme de recyclage du peptidoglycane chez ce groupe de bactéries, il n'est pas exclu que des fragments de peptidoglycane dégradés puissent entrer dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs de type « oligopeptides perméases » et être réutilisés pour produire d'autres molécules que des précurseur du peptidoglycane.

L'enzyme la plus susceptible de pouvoir générer le pro-coactivateur à partir du tetrapeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala est YkfA, une enzyme qui a une activité L,D-carboxypeptidase. L'inactivation du gène *ykfA* n'abolit pas le phénomène d'induction mais mène à la diminution de la production de  $\beta$ -lactamases. Ainsi, le produit du gène *ykfA* serait impliqué dans le mécanisme d'induction mais il n'est pas la seule source de pro-coactivateur, il doit y avoir une voie alternative pour sa production. La diminution de l'induction de la  $\beta$ -lactamase pour le mutant *ykfA*<sup>-</sup> peut s'expliquer par la diminution de la concentration intracellulaire du pro-coactivateur résultant en une concentration intracellulaire plus faible en coactivateur disponible pour l'inactivation de BlaI.

L'effet négatif inattendu de l'inactivation de *ykfB*, pour laquelle la concentration du dipeptide L-Ala-D-Glu dans le cytoplasme devrait augmenter, peut être expliqué par le fait que ce dipeptide pourrait agir comme inhibiteur compétitif de l'activité aminopeptidase de BlaR1.

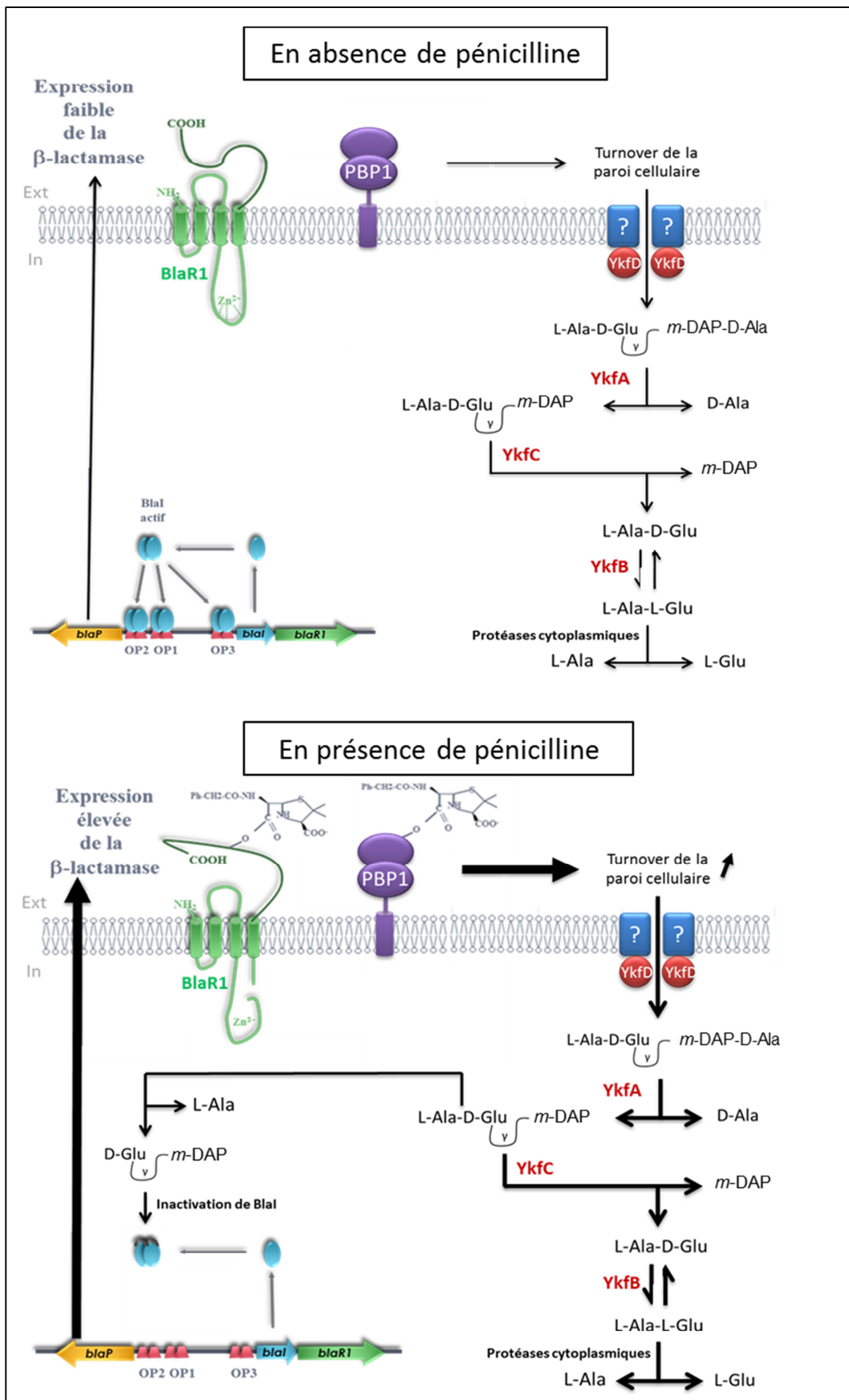
L'effet attendu pour le mutant *ykfC*<sup>-</sup> serait un phénotype hyper-inductible ou non affecté. En effet, la protéine *ykfC* et la boucle L3 ont le même substrat, le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP. Si le gène codant pour la protéine YkfC est muté, on peut imaginer que la quantité de tripeptide disponible pour la boucle L3 est plus importante, ce qui peut mener à une induction accrue. Par contre, si la boucle L3 a une plus grande affinité pour le substrat qu'YkfC, la mutation *ykfC*<sup>-</sup> n'aura pas d'effet sur l'induction de BlaP. Les expériences réalisées montrent que cette mutation n'affecte pas significativement l'induction de BlaP.

Le retard dans l'induction pour le mutant *ykfD*<sup>-</sup> est en accord avec l'inactivation d'une protéine impliquée dans un transport spécifique de métabolites. Si YkfD est un domaine d'un ABC transporteur spécifique au transport de fragments de peptidoglycane générés à l'extérieur de la



cellule, son inactivation signifierait l'absence de ces fragments dans le cytoplasme. Le retard observé dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase suggère un mécanisme de transport alternatif qui serait assuré par un ABC transporteur d'efficacité moindre. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'accumulation du pro-coactivateur, requise pour permettre l'induction de BlaP, prend plus de temps pour être atteinte.

Ces résultats nous ont permis d'apporter un complément au modèle d'induction de BlaP et de confirmer le lien entre l'induction et le catabolisme du peptidoglycane. Dans ce modèle complété (figure 2.51), deux signaux générés par l'action de l'inducteur sont combinés : l'activation de BlaR1 et un stress cellulaire à la pénicilline. L'évènement déclencheur pour la génération de ces 2 signaux serait l'acylation de BlaR1 et de un ou plusieurs PBP(s) par l'antibiotique (Duval *et al.*, 2003). L'acylation de PBPs (comme le PBP1 qui est impliqué dans la dernière étape de biosynthèse du peptidoglycane) provoquerait leur inactivation. La biosynthèse de la paroi cellulaire serait alors perturbée, ce qui activerait de façon anarchique les enzymes autolytiques, et qui, à terme, permettrait l'accumulation de fragments de la paroi cellulaire dans le cytoplasme via un ABC transporteur dont YkfD serait le domaine ATPase. L'acylation du domaine C-terminal de BlaR1 aurait pour résultat l'activation de la boucle cytoplasmique L3. Celle-ci pourrait alors hydrolyser le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP (le pro-coactivateur), résultant de l'activité de YkfA, pour générer le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP (le coactivateur). Ce dernier inactiverait le répresseur Blal et la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP serait alors induite.



**Figure 2.51.** Modèle proposé pour l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP chez *B. licheniformis* faisant intervenir les protéines codées par l'opéron *ykfABCD*.

La présence de pénicilline dans le milieu extérieur induit, chez *B. licheniformis* 749I, la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP. Ce mécanisme d'induction est similaire à celui de la  $\beta$ -lactamase BlaZ et du PBP2a résistant de *S. aureus*. Il débute par l'acylation du récepteur membranaire BlaR1/MecR, lequel transmet ensuite l'information de la présence d'antibiotiques vers le cytoplasme, avec pour conséquence l'inactivation du répresseur Blal/MecI et la dépression du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase. La protéine BlaR1 est une protéine bifonctionnelle possédant deux domaines : le domaine C-terminal exposé à l'extérieur de la cellule qui a un rôle de senseur et le domaine N-terminal ancré dans la membrane cytoplasmique via quatre segments transmembranaires qui délimitent trois boucles. La boucle cytoplasmique L3 possède le motif H<sup>212</sup>ExxH caractéristique des métalloprotéases à zinc.

Le premier objectif de ce travail était de déterminer comment le récepteur BlaR1 de *B. licheniformis* transmet le signal de la présence d'antibiotiques dans le cytoplasme. Par des expériences de Western Blot, nous avons montré que l'acylation du récepteur par un antibiotique implique un clivage. Celui-ci a lieu au niveau du motif K<sup>303</sup>R<sup>↓</sup>R (« ↓ » indique la liaison peptidique clivée) qui est situé dans la boucle L3 (figure 2.19). En effet, le mutant R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A ne subit pas de clivage. Ce mutant présente une capacité réduite (environ 20% de la quantité produite par la souche contenant la protéine sauvage) d'induire l'expression de la  $\beta$ -lactamase BlaP. Ainsi, le clivage est nécessaire à l'activation de la boucle L3. Nous avons également montré que le mutant H(E<sup>213</sup>A)xxH, ne subit pas non plus de protéolyse et a également un phénotype non-inductible pour la  $\beta$ -lactamase. Ces résultats sont en accord avec le fait que le résidu d'acide glutamique agit en tant que résidu catalytique. Ces expériences de mutagenèse nous ont permis de démontrer que l'activation de BlaR1 est autoprotéolytique et que la boucle L3 possède une activité peptidasique (Publication n°1 : Berzigotti *et al.*, 2012 ; voir annexe). L'analyse par Western blot de différents mutants des résidus conservés de la boucle L3, combinée à l'étude de la capacité de ces mêmes mutants à induire la production de  $\beta$ -lactamase et à des expériences de zinc-blot (Berzigotti *et al.*, 2012), a permis de démontrer que la boucle L3 est une gluzincine et qu'elle est un nouveau membre de la superfamille des TLPs (pour Thermolysin-like proteinases).

Le mutant du site de clivage R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A qui donne lieu à une légère induction de la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP nous a permis de proposer une nouvelle étape dans le mécanisme de transmission du signal par BlaR1 activé. Ainsi, le récepteur BlaR-R<sup>304</sup>A/R<sup>305</sup>A acylé possède une boucle L3 non clivée mais active. En effet, l'activité résiduelle de cette boucle L3 mutée semble être capable de produire une quantité suffisante de coactivateur pour inactiver partiellement Blal et permettre l'expression du gène *blaP*. Chez ce mutant, nous aurions dissocié l'activation de la boucle L3 due à l'acylation de BlaR-CTD de celle causée par l'autoprotéolyse de L3. Il serait donc nécessaire que l'acylation de BlaR-CTD active légèrement la boucle L3 pour permettre sa propre protéolyse et son activation complète.

La deuxième partie de ce travail avait pour objet la production de la protéine membranaire BlaR1. Lorsqu'elle est produite sous forme recombinante chez *E. coli*, cette protéine est clivée en deux fragments. La liaison peptidique clivée a été identifiée comme celle reliant les résidus A<sup>345</sup> et M<sup>346</sup>. Afin d'obtenir une protéine intacte, nous avons réalisé la mutation de ce site de clivage mais les protéines portant les mutations A<sup>345</sup>S ou A<sup>345</sup>D subissent également un clivage. Le fait de muter les résidus R<sup>304</sup> et R<sup>305</sup> (résidus du site d'activation de la métalloprotéase) en alanine ne permet pas non plus d'éviter à la protéine d'être dégradée. Par contre, la mutation du résidu catalytique (E<sup>213</sup>), que ça

soit en alanine, en acide aspartique ou en glutamine, permet d'obtenir la protéine BlaR1 entière. La construction utilisée pour cette production permet également de fusionner une StrepTag à l'extrémité C-terminale de la protéine. Grâce à cette étiquette, la protéine a pu être purifiée, via un protocole simple, en une seule étape à l'aide d'une colonne StrepTactin. Nous avons également mis au point un protocole de réinsertion de la protéine BlaR-E213A purifiée dans des liposomes.

Afin d'analyser les changements conformationnels éventuels subis par le récepteur membranaire BlaR1 lorsqu'il est acylé par un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame, nous avons entrepris des expériences de spectroscopie FTIR sur des protéoliposomes contenant la protéine BlaR-E213A en présence ou non de pénicilline. Ces expériences n'ont pas donné de résultats concluants. L'amélioration des conditions expérimentales, notamment en produisant des protéoliposomes plus concentrés en protéines, devra être envisagée avant de réaliser les expériences de FTIR permettant de mettre en évidence des changements conformationnels résultants de l'acylation du récepteur par la  $\beta$ -lactamase. D'autre part, l'obtention de la protéine BlaR-E213A purifiée permet d'envisager des essais de cristallogénèse afin de déterminer la structure tridimensionnelle de BlaR1.

La boucle L3 isolée du reste de la protéine a également fait l'objet de tests de production. Différents partenaires protéiques ont été envisagés afin d'obtenir une protéine soluble. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la production de la protéine fusion NusA-L3. A l'aide de son étiquette His-Tag, cette protéine a pu être purifiée sur une colonne Ni-NTA. Le protocole de production et/ou de purification pourrait cependant être amélioré. En effet, lors de la purification, une quantité importante de la protéine NusA seule a été observée dans les fractions d'éluion (figure 2.15). Afin d'éviter cette protéolyse, différentes mutations pourraient être réalisées, par exemple au niveau du linker qui relie la protéine NusA à la boucle L3. Pour éviter une éventuelle implication de l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 dans cette dégradation, la mutation du site catalytique de la boucle L3 pourrait également être envisagée.

A l'aide de la protéine fusion NusA-L3 ainsi que de membranes de *B. subtilis* enrichies en protéines BlaR1, nous avons tenté d'étudier l'activité protéasique de la boucle L3. L'hypothèse est que la boucle L3 cliverait un procoactivateur en coactivateur capable d'inactiver le répresseur Blal. Il a été montré que le coactivateur de Blal chez *B. licheniformis* est le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP (Amoroso *et al.*, 2012). Celui-ci est obligatoirement un produit de dégradation du peptidoglycane. La protéine NusA-L3 ou les membranes de *B. subtilis* enrichies en BlaR1 ont donc été incubées avec un fragment de peptidoglycane et les produits éventuels de la réaction ont été analysés par HPLC. Dans nos conditions expérimentales, aucune activité protéasique n'a pu être mise en évidence.

Le deuxième objectif du travail s'inscrivait dans la recherche du locus BlaR2. L'existence de ce dernier repose sur l'observation d'un mutant de *B. licheniformis* obtenu par mutagénèse chimique et qui a perdu la propriété d'induire la production de la  $\beta$ -lactamase BlaP mais qui ne présente aucune mutation au niveau du divergeon *blaP-blaI-blaR1* (Sherratt & Collins, 1973). Deux approches ont été envisagées pour identifier le ou les gènes responsables de ce phénotype mutant.

La première approche a été la recherche, dans le génome de *B. licheniformis*, de gènes potentiellement régulés par la protéine Blal. Pour cela, nous avons utilisé le programme PREDetector qui a permis de rechercher des séquences similaires aux séquences opératrices situées entre les gènes *blaP* et *blaI*. Cette recherche a permis de mettre en évidence une séquence potentiellement reconnue par Blal devant le gène *BL01303*. Ce dernier code pour la protéine Yoch, qui pourrait être

une autolysine au vu de sa séquence en acides aminés. Par des expériences de retards de migrations électrophorétiques et de dot blot, nous avons montré que le répresseur BlaI reconnaît la séquence en amont du gène *BL01303*. De plus, des expériences de RT-PCR ont montré que la production de Yoch serait régulée par BlaI. La protéine Yoch a été produite et purifiée au cours de ce travail. Nous avons ensuite pu confirmer qu'elle est capable de dégrader le peptidoglycane en muropeptides. Il reste toutefois à déterminer avec précision la liaison clivée par cette enzyme. Notre hypothèse était qu'elle pourrait être impliquée dans la production de fragments de peptidoglycane qui donneraient lieu au pro-coactivateur de BlaI. Cependant, l'inactivation du gène *BL01303* n'affecte que peu le phénotype d'induction de BlaP, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que cette protéine ne serait pas la seule source de pro-coactivateur. Il est toutefois à noter que l'effet de l'inactivation de *BL01303* sur le phénotype d'induction de BlaP est croissant au court du temps. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la première source de fragments de peptidoglycane est celle obtenue par le turn over habituel de la cellule. Une fois cette source épuisée, c'est l'activité autolytique de Yoch qui permettrait de dégrader le peptidoglycane.

La deuxième approche envisagée par notre équipe pour mettre en évidence le locus *BlaR2* a été la recherche de gènes codant pour des protéines qui pourraient dégrader ou interagir avec le peptidoglycane et qui pourraient donc être impliquées dans la formation du pro-coactivateur. Etant donné que l'insertion des gènes *blaP*, *blal* et *blaR1*, via le pDML995, dans *B. subtilis* est suffisante pour permettre l'induction de BlaP, les gènes recherchés doivent être présents sur le génome de *B. licheniformis* et de *B. subtilis*. L'opéron *ykfABCD*, présent dans les deux souches, est composé de quatre gènes présentant les caractéristiques recherchées. Le gène *ykfA* code pour une protéine homologue à la L,D-carboxypeptidase LdcA de *E. coli* qui hydrolyse le térapeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala en L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP. La protéine YkfB est une L-Ala-D/L-Glu isomérase, la protéine YkfC est une endopeptidase qui clive la liaison D-Glu-*m*-DAP et la protéine YkfD contient les motifs caractéristiques d'un domaine ATPase d'un ABC transporteur.

L'effet de l'inactivation de chacun de ces gènes sur l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP a été étudié (Publication n°2 : Amoroso *et al.*, 2012 ; voir annexe). L'inactivation du gène *ykfA* n'abolit pas le phénomène d'induction mais mène à la diminution significative de la production de  $\beta$ -lactamases. Le produit du gène *ykfA* est une enzyme qui aurait une activité L,D-carboxypeptidase et donc pourrait générer le pro-coactivateur à partir du térapeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala. La diminution de l'induction de la  $\beta$ -lactamase pour le mutant *ykfA*<sup>-</sup> peut s'expliquer par la diminution de la concentration intracellulaire du pro-coactivateur résultant en une concentration intracellulaire plus faible en coactivateur disponible pour l'inactivation de BlaI. YkfA ne serait pas la seule source de pro-coactivateur, il doit y avoir une voie alternative pour sa production. L'inactivation de *ykfB* a un léger effet négatif qui peut s'expliquer par le fait que le dipeptide L-Ala-D-Glu, généré par l'activité de *ykfB*, pourrait agir comme inhibiteur compétitif de l'activité aminopeptidasique de BlaR1. Le mutant *ykfC*<sup>-</sup> présente un phénotype d'induction similaire à la souche sauvage. Le gène *ykfD*, pourrait coder pour un domaine d'un ABC transporteur spécifique au transport de fragments de peptidoglycane générés à l'extérieur de la cellule. Sa mutation a pour effet un retard dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase, ce qui suggère un mécanisme de transport alternatif qui serait assuré par un ABC transporteur d'efficacité moindre. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'accumulation du pro-coactivateur, requise pour permettre l'induction de BlaP, prend plus de temps pour être atteinte.

Les régions codant pour le gène BL01303 et pour l'opéron *ykfABCD* ont été amplifiées et séquencées pour *B. licheniformis* 749I, la souche sauvage, et pour la souche mutante *BlaR2*<sup>-</sup>. La comparaison de ces séquences a montré que ces deux locus sont identiques dans les deux souches.

Bien que nous n'ayons pas pu identifier le mystérieux locus *blaR2*, sa recherche nous a permis de mettre en évidence des protéines impliquées dans l'induction de la  $\beta$ -lactamase *BlaP* et de proposer un modèle d'induction complété faisant intervenir les protéines codées par l'opéron *ykfABCD* ainsi que la protéine *Yoch* (figure 3.1). Dans ce modèle, deux signaux générés par la présence d'antibiotiques sont combinés: l'activation de *BlaR1* et un stress cellulaire à la pénicilline. L'évènement déclencheur pour la génération de ces 2 signaux serait l'acylation de *BlaR1* et de un ou plusieurs PBP(s) par l'antibiotique (Duval *et al.*, 2003). L'acylation de PBPs (comme le PBP1 qui est impliqué dans la dernière étape de biosynthèse du peptidoglycane) provoquerait leur inactivation. La biosynthèse de la paroi cellulaire serait alors perturbée, ce qui activerait les enzymes autolytiques, et qui, à terme, permettrait l'accumulation de fragments de la paroi cellulaire dans le cytoplasme via un ABC transporteur dont *YkfD* serait le domaine ATPase. L'acylation du domaine C-terminal de *BlaR1* aurait pour résultat l'auto-protéolyse de la boucle L3, ainsi activée. Celle-ci pourrait alors hydrolyser le tripeptide L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP (le pro-coactivateur), résultant de l'activité de *YkfA*, pour générer le dipeptide  $\gamma$ -D-Glu-*m*-DAP (le coactivateur). Ce dernier inactiverait le répresseur *BlaI*, l'empêchant de réprimer les gènes *blaP*, *blaI*, *blaR1* et *yoch*. La protéine *Yoch* pourrait avoir un rôle amplificateur de l'induction puisque son activité pourrait augmenter la quantité de produit de dégradation du peptidoglycane et donc indirectement de pro-coactivateur.

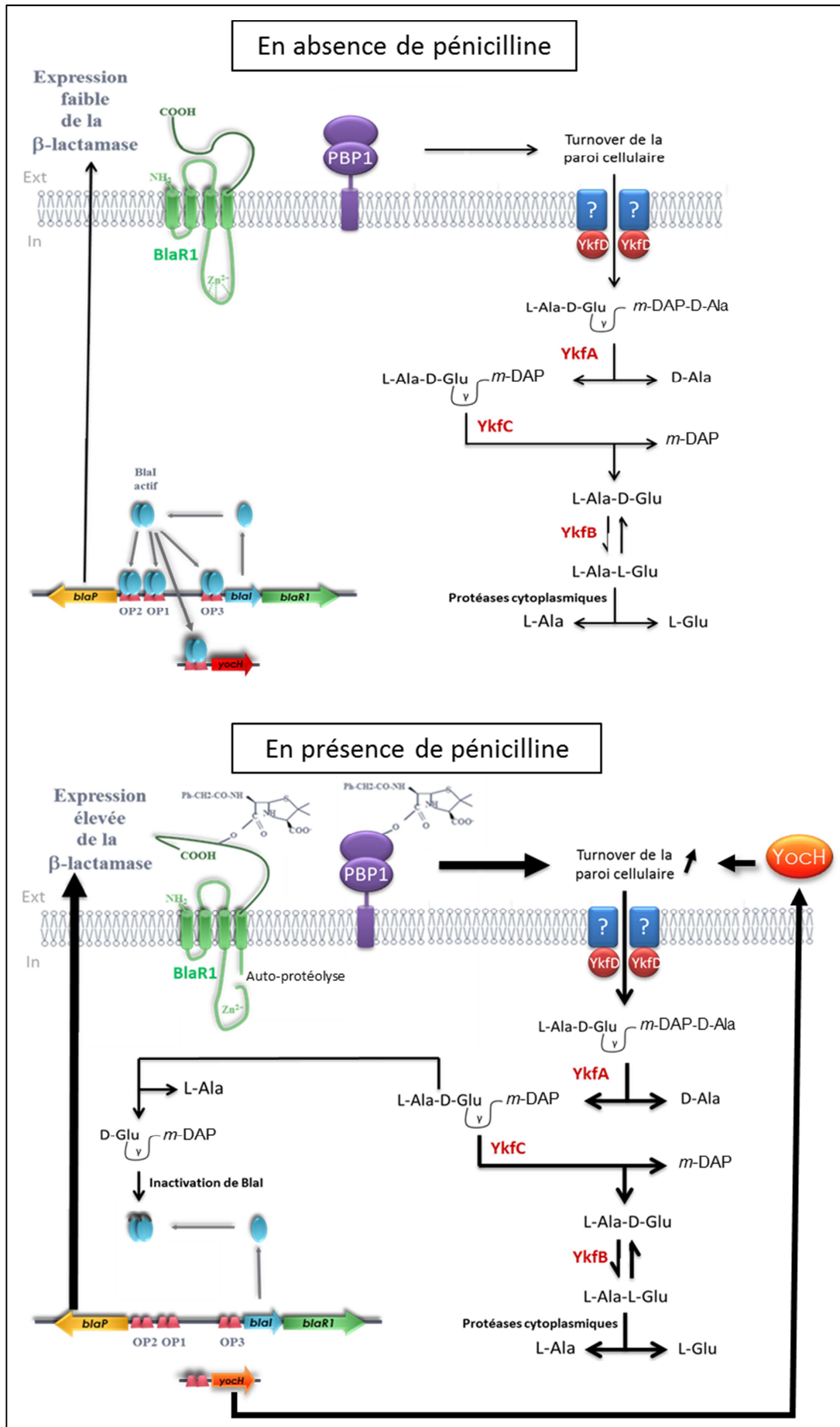


Figure 3.1. Modèle complété proposé pour l'induction de la  $\beta$ -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*.



#### 4.1. Souches bactériennes

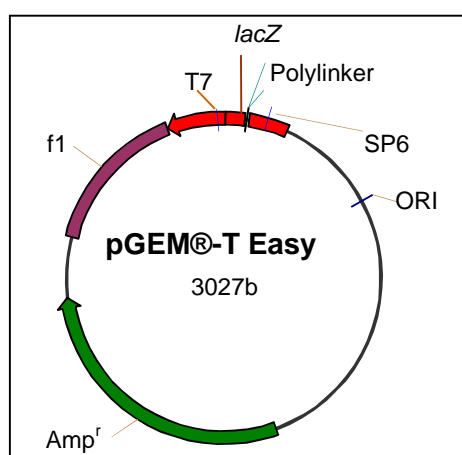
Souches	Génotype	Utilisation et caractéristiques
<b><i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b> (Gibco BRL)	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), phoA, supE44, $\lambda$ <sup>-</sup> , thi-1, gyrA9, relA1	Souche utilisée pour le clonage de fragments d'ADN et la préparation des plasmides.
<b><i>E. coli</i> BL21 DE3</b> (Novagen)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)	Souche utilisée pour l'expression d'un gène sous le contrôle de la T7 RNA polymérase.
<b><i>E. coli</i> C41 DE3</b> (OverExpress)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)	Souche utilisée pour l'expression d'un gène sous le contrôle de la T7 RNA polymérase codant pour une protéine membranaire.
<b><i>B. licheniformis</i> 749I</b>	<i>blaP</i> <sup>+</sup> , <i>blaI</i> <sup>+</sup> , <i>blaR1</i> <sup>+</sup>	Souche sauvage qui produit une $\beta$ -lactamase de manière inductible en présence d'antibiotiques à noyau $\beta$ -lactame dans le milieu.
<b><i>B. licheniformis</i> 749C</b>	<i>blaP</i> <sup>+</sup> , <i>blaI</i> <sup>-</sup> , <i>blaR1</i> <sup>+</sup>	Mutant chimique produisant la $\beta$ -lactamase de manière magno-constitutive, suite à l'inactivation du gène <i>blaI</i> .
<b><i>B. licheniformis</i> 749/Pen27</b>	<i>blaP</i> <sup>+</sup> , <i>blaI</i> <sup>+</sup> , <i>blaR1</i> <sup>+</sup> , <i>blaR2</i> <sup>-</sup>	Mutant chimique non-inductible, suite à l'inactivation du gène <i>blaR2</i> , encore inconnu.
<b><i>B. subtilis</i> 168</b>	trpC <sup>-</sup>	Souche phylogénétiquement très proche de <i>B. licheniformis</i> mais ne contenant pas les gènes <i>blaP</i> , <i>blaI</i> et <i>blaR1</i> .
<b><i>B. subtilis</i> 1541</b>	trpC <sup>-</sup> , P <sub>blaP</sub> lysA	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le promoteur du gène <i>lysA</i> a été remplacé par celui du gène <i>BlaP</i> de <i>B. licheniformis</i> .
<b><i>B. subtilis</i> BFS1807</b>	trpC <sup>-</sup> , YkfA <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfA</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS1808</b>	trpC <sup>-</sup> , YkfB <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfB</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS1809</b>	trpC <sup>-</sup> , YkfC <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfC</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS1810</b>	trpC <sup>-</sup> , YkfD <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>ykfD</i> a été inactivé.
<b><i>B. subtilis</i> BFS673</b>	trpC <sup>-</sup> , Yoch <sup>-</sup>	Souche dérivée de <i>B. subtilis</i> 168 où le gène <i>yoch</i> a été inactivé.

Les souches sont conservées à -70°C dans un mélange LB-Glycérol 40%.

## 4.2. Vecteurs d'expression et de clonage

### 4.2.1. Le pGEM-T Easy

Ce plasmide, commercialisé par la société Promega, permet l'insertion directe d'un produit PCR dans le plasmide. Le vecteur est prélinéarisé par l'enzyme de restriction *EcoRV* et une thymidine a été ajoutée aux extrémités 3' du fragment linéarisé. L'ajout d'adénine au fragment PCR permet l'insertion de celui-ci dans le plasmide. Le pGEM-T Easy possède le gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène *lacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase (Figure 4.1). L'insertion du fragment PCR dans ce plasmide inactive le gène *lacZ*, la bactérie est alors incapable de produire de la  $\beta$ -galactosidase. Les colonies qui produisent cette enzyme prennent une couleur bleue en présence de X-Gal alors que les non-productrices sont blanches. La sélection des clones recombinants s'effectue sur milieu LB-agar additionné d'ampicilline 100  $\mu$ g/ml.



**Figure 4.1.** Le pGEM T-Easy. *lacZ* : gène du peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase ; *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline.

### 4.2.2. Les vecteurs d'expression pET

Les plasmides pET (Novagen) permettent l'expression de protéines recombinantes chez *E. coli*. Dans ces vecteurs, le gène d'intérêt est sous le contrôle de l'ARN polymérase du phage T7 (Figure 4.2). Les souches *E. coli* « DE3 » possèdent, dans leur génome, le gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*. En absence d'IPTG, la transcription du gène d'intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur *LacI* sur les opérateurs *lac*. L'ajout d'IPTG (0,5 à 2 mM) dans le milieu de culture induit la transcription de l'ARN polymérase du phage T7 à partir du promoteur *lac* par l'ARN polymérase d'*E. coli*. L'ARN polymérase du phage T7 transcrit ensuite le gène d'intérêt à partir du promoteur T7. Les pET22b, pET28a, pET43.1 Ek/LIC et pET52b ont été utilisés lors de ce travail. (Figures 4.3 à 4.6).

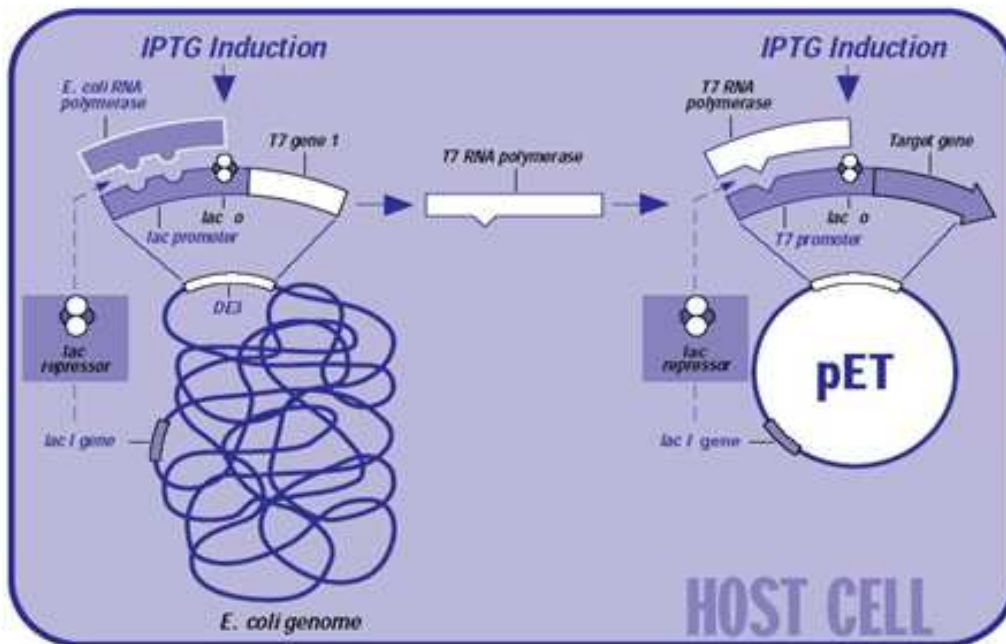


Figure 4.2. Principe des vecteurs d'expression pET

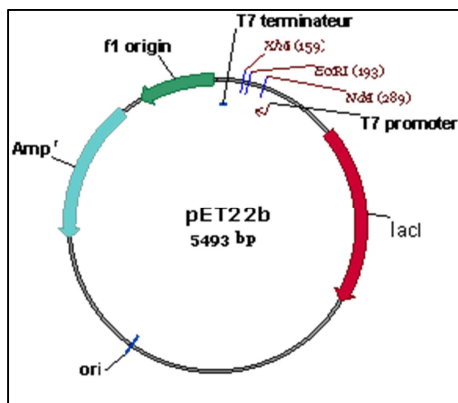


Figure 4.3. Le pET22b. *amp<sup>r</sup>*: gène de résistance à l'ampiciline ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 promoter : promoteur pour la polymérase du phage T7 ; T7 terminator : terminateur pour la polymérase du phage T7

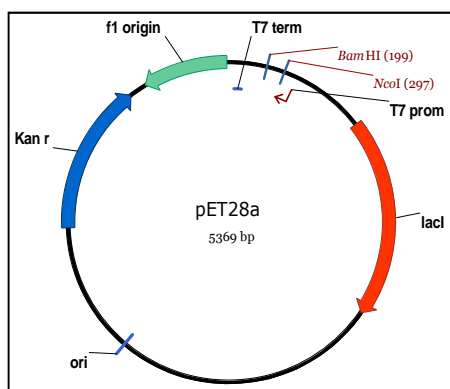
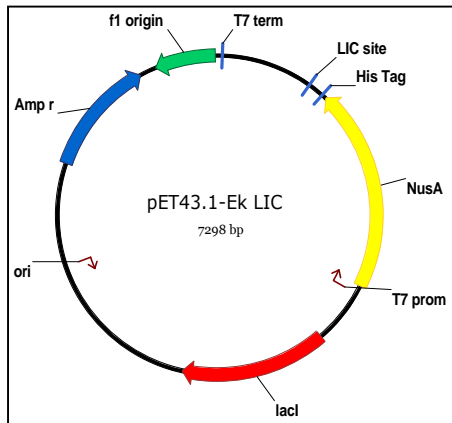
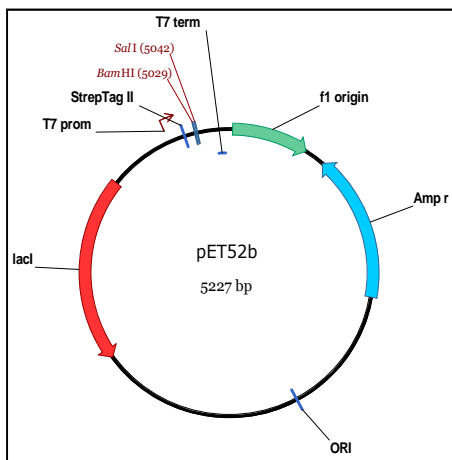


Figure 4.4. Le pET28a. *kan<sup>r</sup>*: gène de résistance à la kanamycine ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 prom : promoteur pour la polymérase du phage T7 ; T7 term : terminateur pour la polymérase du phage T7.



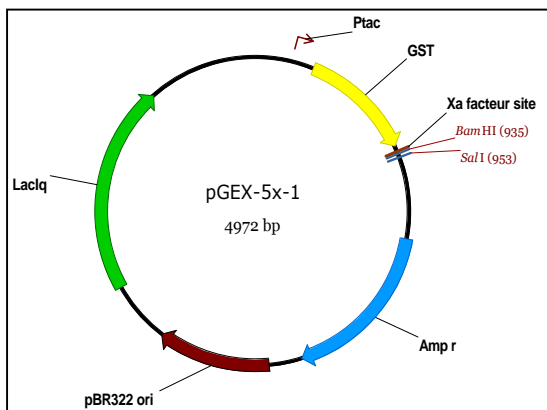
**Figure 4.5.** Le pET43.1 – Ek LIC. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l’ampicilline ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 prom : promoteur de la polymérase du phage T7 ; T7 term : terminateur de la polymérase du phage T7 ; NusA : gène codant pour la protéine NusA ; HisTag : séquence codante pour une queue polyhistidines ; LIC site : site de clonage.



**Figure 4.6.** Le pET52b. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l’ampicilline ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; T7 prom : promoteur de la polymérase du phage T7 ; T7 term : terminateur de la polymérase du phage T7 ; StrepTag II : séquence codant pour une StrepTag.

#### 4.2.3. Le pGEX-5X-1

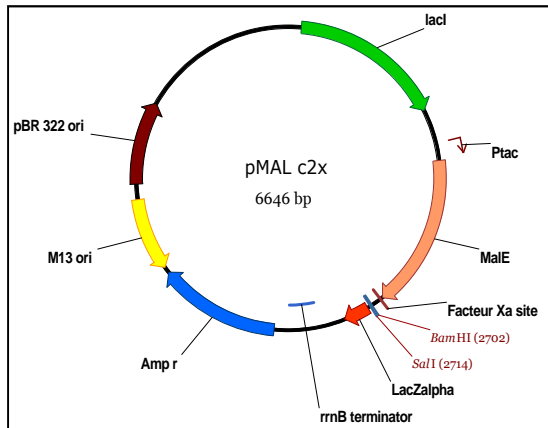
Le pGEX-5X-1 fait partie des plasmides pGEX qui permettent l’expression, chez *E. coli*, de protéines recombinantes fusionnées à la glutathion-S-transferase (GST). Le clonage s’effectue au niveau des sites de restriction situés entre le gène codant pour la GST et le gène de résistance à l’ampicilline (figure 4.7). En absence d’IPTG, la transcription du gène d’intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur LacI sur le promoteur *tac*. L’ajout d’IPTG (0,5 à 2 mM) dans le milieu de culture induit l’expression du promoteur *tac*, ce qui permet la transcription du gène *gst* suivi du gène d’intérêt.



**Figure 4.7.** Le pGex-5x-1. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l’ampicilline ; *lacIq* : gène codant pour le répresseur LacI ; GST : gène codant pour la glutathion-S-transferase ; *ptac* : promoteur *tac*, inductible à l’IPTG ; Xa facteur site : site de clivage enzymatique pour le facteur Xa.

#### 4.2.4. Le pMAL-c2x

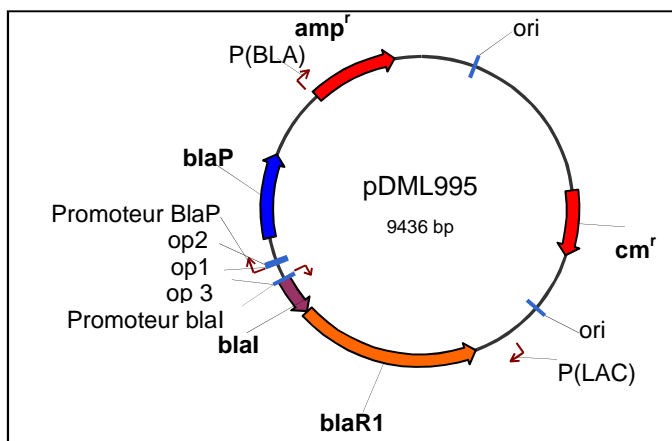
Le pMAL-c2x est un plasmide de type pMAL-2 permettant l'expression de protéines recombinantes fusionnées à la « Maltose-binding protein » (MBP) chez *E. coli* (figure 4.8). Le clonage s'effectue en amont du gène *malE* qui code pour la MBP. Les sites de restriction entre les gènes *malE* et *lacZα* permettent le clonage du fragment d'intérêt. L'insertion de ce dernier inactive la β-galactosidase codée par le gène *lacZα*, ce qui permet une sélection blanc/bleu. En absence d'IPTG, la transcription du gène d'intérêt est réprimée grâce à la fixation du répresseur LacI sur le promoteur tac. L'ajout d'IPTG (0,5 à 2 mM) dans le milieu de culture induit l'expression du promoteur tac, ce qui permet la transcription du gène *malE* et du gène d'intérêt.



**Figure 4.8.** Le pMAL-c2x. *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline ; *malE* : gène d'expression de la MBP ; *lacI* : gène codant pour le répresseur LacI ; LacZalpha : partie α du gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase ; Ptac : promoteur tac, inducible à l'IPTG ; Facteur Xa site : site de clivage enzymatique pour le facteur Xa.

#### 4.2.5. Le pDML995

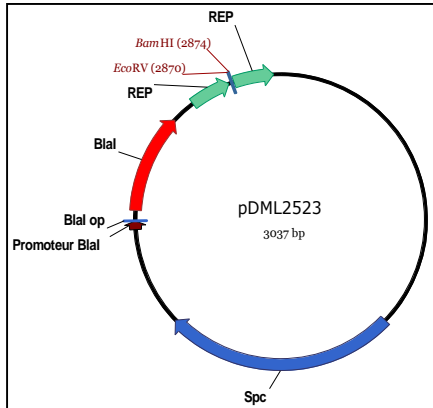
Le pDML995 est un vecteur navette *E. coli/B. subtilis* dérivé du pMK4 et développé par l'équipe du Pr. Bernard Joris. Ce plasmide contient le divergeon *bla* de *B. licheniformis* 749i, un gène de résistance à l'ampicilline exprimé chez *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol exprimé chez *Bacillus*. Ce plasmide permet l'induction de la β-lactamase BlaP chez *B. subtilis* (Figure 4.9).



**Figure 4.9.** Le pDML995. *blaP* : gène de la β-lactamase BlaP ; *blaI* : gène du répresseur BlaI ; *blaR1* : gène du récepteur BlaR1 ; *amp<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline ; *cm<sup>r</sup>* : gène de résistance au chloramphénicol.

#### 4.2.6. Le pDML2523

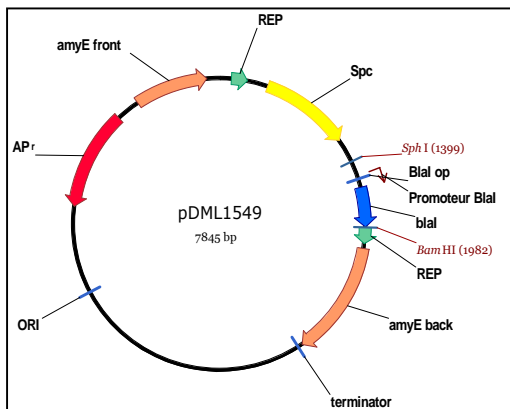
Le pDML2523 est un vecteur navette *E. coli/B. subtilis* contenant le gène *blal* de *B. licheniformis* et un gène de résistance à la spectinomycine (figure 4.10). Ce vecteur est utilisé pour l'inactivation de gènes chez *B. subtilis* (Brans *et al.*, 2004).



**Figure 4.10.** Le pDML2523. *spc* : gène de résistance à la spectinomycine ; *blal* : gène codant pour le répresseur Blal de *B. licheniformis* ; REP : séquences répétées inverses.

#### 4.2.7. Le pDML1549

Le pDML1549 est un vecteur navette *E. coli/B. subtilis* qui présente une cassette *blal* contenant le gène *blal* de *B. licheniformis* 749I et un gène de résistance à la spectinomycine. Cette cassette est entourée des séquences du début (*amyE* front) et de la fin (*amyE* back) du gène *amyE* codant pour l'amylase chez *B. subtilis* 168 (figure 4.11). Ce vecteur a été utilisé pour la complémentation du mutant *ykfA*<sup>-</sup> de *B. subtilis*.



**Figure 4.11.** Le pDML1549. *spc* : gène de résistance à la spectinomycine ; *blal* : gène codant pour le répresseur Blal de *B. licheniformis* ; *amyE* front : séquence du début du gène *amyE* ; *amyE* back : séquence de la fin du gène *amyE* ; *AP<sup>r</sup>* : gène de résistance à l'ampicilline ; REP : séquences répétées inverses.

### 4.3. Milieux de culture

Les compositions des milieux de culture sont données pour 1 litre.

- **Milieu LB (Luria Bertani)**: 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) ; 10 g de NaCl.
- **Milieu 2XYT** : 16 g de bactotryptone (Difco) ; 10 g d'extrait de levure (Difco) ; 5 g de NaCl.
- **Milieu Soc** : 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) ; 10 g de NaCl ; 10 mM de MgSO<sub>4</sub> ; 10 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 20 mM de glucose.

- **Milieu LM** : 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) ; 10 g de NaCl ; MgSO<sub>4</sub> 3 mM.
- **Milieu MD** : 92 ml de tampon phosphate-citrate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 107 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 g/l, citrate ferrique 100 g/l) ; 100 ml de glucose 20 % ; 10 ml de L-tryptophane (5 mg/ml) ; 5 ml de citrate d'ammonium ferrique (2,2 mg/ml) ; 25 ml d'aspartate de potassium (100 ng/ml) ; 3 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M.
- **Milieu MMG** : 870 ml de solution 1 (solution 1 : 19 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,12 g de Na<sub>3</sub>Citrate ; 0,2 g de MgSO<sub>4</sub> ; 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans 870 ml d'H<sub>2</sub>O, pH 7) ; 500 µl de FeCl<sub>3</sub> 0,1 M ; 20 µl de MnSO<sub>4</sub> 0,1 M ; 8ml de L-tryptophane 5 mg/ml ; 20 ml de glucose 20% ; 100ml d'acide L-glutamique monopotassium 2%).
- **Milieu minimum** : 12,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,5 g de NaCl ; 1g de NH<sub>4</sub>Cl ; 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M ; 20 ml de glucose 20% ; 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M ; 2 ml de L-tryptophane 100 mg/ml ; pH 7,4.
- **Milieu BH (Brain-Heart)** : 37g de Bacto Brain Heart infusion (Difco)

Les milieux de culture solides équivalant aux milieux liquides sont obtenus par l'addition de 15 g d'agar par litre de milieu.

#### 4.4. Les antibiotiques

- **L'ampicilline** : antibiotique à noyau β-lactame inhibant la biosynthèse du peptidoglycane. Il est utilisé à une concentration de 100 µg/ml pour les cultures d'*E. coli*.
- **La kanamycine** : aminoglycoside interférant avec la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30s des ribosomes. Elle est utilisée à une concentration de 50 µg/ml pour les cultures d'*E. coli*.
- **La spectinomycine** : aminoside interférant avec le ribosome bactérien, modifiant sa fonction de synthèse protéique. Elle est utilisée à une concentration de 100 µg/ml pour les cultures de *B. subtilis*.
- **Le chloramphénicol** : antibiotique qui affecte la synthèse des protéines en interagissant avec la sous-unité 50s des ribosomes. Il est utilisé à une concentration de 30 µg/ml pour les cultures d'*E. coli* et de 7 µg/ml pour les cultures de *B. subtilis*.
- **L'érythromycine** : antibiotique macrolide qui se lie avec la sous-unité ribosomique 50s et empêche ainsi la translocation des peptides et la formation de polypeptides. Il est utilisé à une concentration de 2µg/ml pour les cultures de *B. subtilis*.

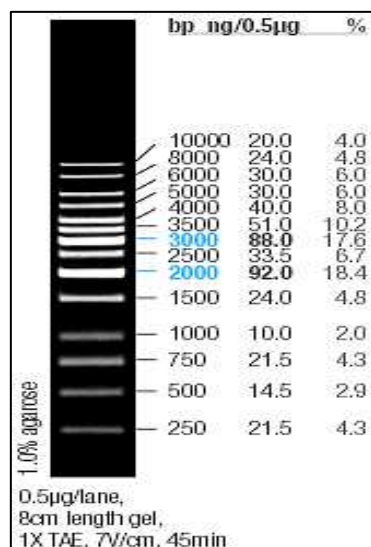
#### 4.5. Les enzymes

Les endonucléases de restrictions, les ADN polymérase et leurs tampons sont fournis par les firmes Promega et Fermentas. Ces différentes enzymes sont utilisées dans les conditions définies par les fabricants.



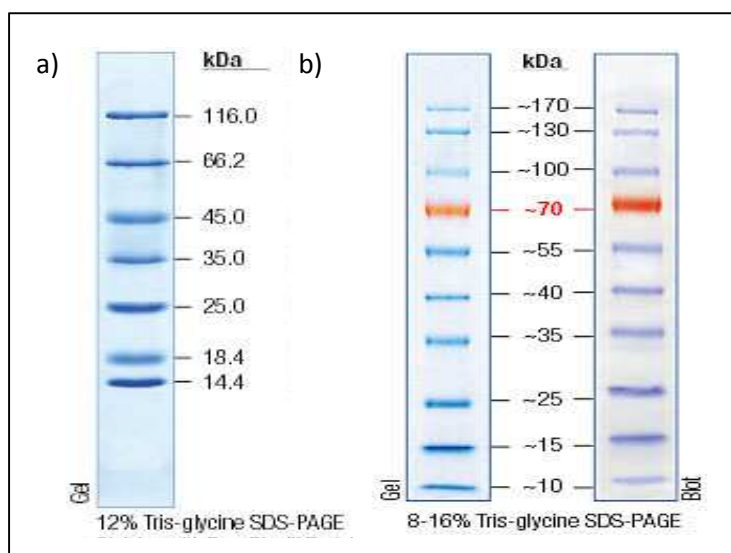
#### 4.6. Les marqueurs de taille

- **Marqueur de taille pour l'ADN :** Le O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) est un marqueur utilisé pour estimer la taille des fragments linéaires d'ADN lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose. La taille des bandes varie de 250 à 10 000 pb (Figure 4.12).



**Figure 4.12.** Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % du marqueur de taille O'GeneRuler .

- **Marqueurs de taille pour les protéines :**
  - Le « Protein Molecular Weight Marker» (Fermentas) est un marqueur utilisé pour évaluer la masse moléculaire des protéines entre 14 et 116 kDa lors d'un SDS-PAGE (Figure 4.13a).
  - Le « PAGE Ruler prestained protein ladder » (Fermentas) est utilisé lors d'un Western blot. Il a été préalablement coloré pour permettre la visualisation du transfert (Figure 4.13b).



**Figure 4.13.** Description des marqueurs de taille « Protein Molecular Weight Marker » (a) et « Page Ruler prestained protein ladder » (b).

#### 4.7. Les oligonucléotides synthétiques

Les oligonucléotides utilisés lors de ce travail ont été synthétisés et fournis par Eurogentec (Belgique). La concentration des solutions stocks est de 100 µM.

##### 4.7.1. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification de la boucle L3 de BlaR1

Nom	Séquence	Application
L3NusA5'	5' -GACGACGACAAGATATATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec NusA
L3NusA3'	5' -GAGGAGAAGCCCGGTTATTTTCGCCTTTAGCAAAGGTGAT-3'	Amplification de L3 pour fusion avec NusA
L3SalI3'	5' - ATGTCGACTTTTCGCCTTTAGCAAAGGTGAT-3'	Amplification de la boucle L3
L3M5'	5' -TAGGATCCTATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec MBP
L3G5'	5' -TAGGATCCATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec GST
L3S5'	5' -TAGGATCCTTATAGCAATCTAAAAATCGGCAA-3'	Amplification de L3 pour fusion avec streptag

##### 4.7.2. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le séquençage du gène *blaR1*

Nom	Séquence	Application
BlaRSCNcoI5'	5' -TACCATGGGCAGCAGTCTTTTCTTTATTCCC-3'	Amplification du gène <i>blaR1</i> avec une Streptag à l'extrémité C-terminale
BlaRSCBamHI3'	5' -TTGGATCCTTACTTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCATCGGGAACGGAGGG-3'	Amplification du gène <i>blaR1</i> avec une Streptag à l'extrémité C-terminale
BlaR500	5' -GTCATTTTGAGCCGTTCTCC-3'	Séquençage du gène <i>blaR1</i> de <i>B.licheniformis</i>
BlaR1400	5' -CGTAAATGATCCTCCCAATTT-3'	Séquençage du gène <i>blaR1</i> de <i>B.licheniformis</i>

##### 4.7.3. Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée du gène *blaR1*

Nom	Séquence	Application
BlaR_E213A_UP	5' -TGTGTTTTGCTTCATGCATTGTACCATTGCAAACG-3'	Mutation E213A de <i>blaR1</i>
BlaR_E213A_RP	5' -CGTTTGCAATGGTACAATGCATGAAGCAAAACACA-3'	Mutation E213A de <i>blaR1</i>
BlaR_E213D_UP	5' -GTGTTTTGCTTCATGATCTGTACCATTGTAAACG-3'	Mutation E213D de <i>blaR1</i>
BlaR_E213D_RP	5' -CGTTTACAATGGTACAGATCATGAAGCAAAACAC-3'	Mutation E213D de <i>blaR1</i>
BlaR_E213Q_UP	5' -GTGTTTTGCTTCATCAACTGTACCATTGTAAACG-3'	Mutation E213Q de <i>blaR1</i>
BlaR_E213Q_RP	5' -CGTTTACAATGGTACAGTTGATGAAGCAAAACAC-3'	Mutation E213Q de <i>blaR1</i>
BlaR_RRAA_UP	5' -GCAGCTCATACAAAGCAGCGATTGTTACAGTTGTCAAC-3'	Mutation R304A/R305A de <i>blaR1</i>
BlaR_RRAA_RP	5' -GTTGACAACGTGAACAATCGCTGCTTGTATGAGCTGC-3'	Mutation R304A/R305A de <i>blaR1</i>
BlaR_A345D_UP	5' -CTCCTTCTGTGTCTATATTGGACATGCAAAAAGAAACACGC-3'	Mutation A345D de <i>blaR1</i>
BlaR_A345D_RP	5' -GCGTGTCTTCTTTTTCATGTCCAATCTAGACACAGAAGGAG-3'	Mutation A345D de <i>blaR1</i>
BlaR_A345S_Upbis	5' -TCTGTGTCTATATTGTCATGCAAAAAGAAACACGC-3'	Mutation A345S de <i>blaR1</i>
BlaR_A345S_Rpbis	5' -GCGTGTCTTCTTTTTCATGGACAATATAGACACAGA-3'	Mutation A345S de <i>blaR1</i>

4.7.4. Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de l'opéron *ykfABCD* de *B. licheniformis*.

Nom	Séquence	Application
ykfprom5'	5' -CGCCAATATGGAATGGAACACAT- 3'	Séquençage de la région promotrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>
ykfprom3'	5' -CACCAACCGTATCTCCCTTCATT- 3'	Séquençage de la région promotrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>
BlykfAUP	5' -ATCCTGTCGGCTACATTGAA- 3'	Séquençage du gène <i>ykfA</i>
BlykfARP	5' -CAGCGCAACGAACCGTCCGC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfA</i>
BlykfBUP	5' -GTCGGCTTTAAATCGGCC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfB</i>
BlykfBRP	5' -AGCCGTCTCAGTCGCAATG- 3'	Séquençage du gène <i>ykfB</i>
BlykfCUP	5' -ATATCGTTGAAGGGGCATC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfC</i>
BlykfCRP	5' -GTCGACATCCGGAAGAGTGC- 3'	Séquençage du gène <i>ykfC</i>
BlykFDUP	5' -TACTGCGGAAACGGAGAGAT- 3'	Séquençage du gène <i>ykfD</i>
BlykFDRP	5' -AAATCAGGCGGATCATTAG- 3'	Séquençage du gène <i>ykfD</i>
ykfterm5'	5' -AATCATACTGAAAGGCGAGC- 3'	Séquençage de la région terminatrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>
ykfterm3'	5' -GTTCCAACCTCGGTACAAACG- 3'	Séquençage de la région terminatrice de l'opéron <i>ykfABCD</i>

4.7.5. Oligonucléotides utilisés pour l'inactivation des gènes de l'opéron *ykfABCD* de *B. subtilis*

Nom	Séquence	Application
ykfA-5'Upbis	5' -AAGCTGCCGCTTTATCAAATGCGAATTCAATTGTCCGTCACCCTGTGCG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfA5'RPter	5' -TTGGATCCCGCTCATCATCCTGTCCCC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfA3' UP	5' -AAGATATCCAAGCCGAATCGCTGTCCCG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfA3'RPbis	5' -AACGACAGGGTGACGGACAATTGAATTCGCATTTGATAAAGCGGCAGC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfA</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB5'UPbis	5' -AAGAGCAATGATGCACACTGTCTCGAGTCTACACTGGGCAGCCATT- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB-5'RP	5' -TTGGATCCGATTCGGCTTGTTCGATTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB3'UPbis	5' -AAGATATCCGCCGATTATGGCTGATGAA- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfB3'Rpbis	5' -AAAATGGCGTGCCAGTGTAGACTCGAGGACAGTGTGCATCATTGCTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfB</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-5'UP	5' -AAGAGCCGATGGAGATTATAAGAATTCGCGGATTATGGCTGATGAA- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-5'RP	5' -TTGGATCCGACAGTGTGCATCATTGCTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-3'UP	5' -AAGATATCGCCGCTGTTTTTCAGAATAA- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfC-3'RP	5' -AATTCATCAGCCATAATCGGCGGAATTCCTTATGAATCTCCATCGGCTC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfC</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfD5' UP	5' -AACTCTTTCTACGAAAGCCAGCGAATTCATGCGGGAGATCAGGCTAAG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfD</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfD5' RP	5' -TTGGATCCCTTCACGAATCTGAAAGGTG- 3'	Inactivation du gène <i>ykfD</i> de <i>B. subtilis</i>
ykfD3' UP	5' -AAGATATCATGTGGAGAATCTCGTCCCC- 3'	Inactivation du gène <i>ykfD</i> de <i>B. subtilis</i>

ykfD3' RP	5' -AACTTAGCCTGATCTCCCGCATGAATTCGCTGGCTTTCGTAGAAAGAG-3'	Inactivation du gène ykfD de <i>B. subtilis</i>
BSAUP	5' -CGCATCGGGGTTTTGGGAC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfABCD chez <i>B. subtilis</i>
BSDRP	5' -ATACAAATGGCAAGCGACAAAAC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfABCD de <i>B. subtilis</i>
pSpac FW	5' -GGTGTGGCATAATGTGTGGAATTGTGAGC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfA,B,C ou D de <i>B. subtilis</i>
ykfB-5'RP	5' -TTGGATCCGATTCGGCTTGTTCGATTC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfA de <i>B. subtilis</i>
ykfC-5'RP	5' -TTGGATCCGACAGTGTGCATCATTGCTC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfB de <i>B. subtilis</i>
ykfC-3'RP	5' -AATTCATCAGCCATAATCGGCGGAATTCTTATGAATCTCCATCGGCTC-3'	Vérification de l'inactivation de ykfC de <i>B. subtilis</i>
ykfD-3'RP	5' -AACTTAGCCTGATCTCCCGCATGAATTCGCTGGCTTTCGTAGAAAGAG-3'	Vérification de l'inactivation de ykfD de <i>B. subtilis</i>
ykfASmal5'	5' -AACCCGGGTTATGCGAAGGAGCGGTA-3'	Complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>
ykfASmal3'	5' -CAGAAGGGGCGCTGAAGACACCCGGGAT-3'	Complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>
amyEfront	5' -TTTATTGCTGTTTCATTTGGTTCTG-3'	Vérification de la complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>
amyEback	5' -GATGGTGTATGTTTTGCCAAATTG-3'	Vérification de la complémentation de ykfA chez <i>B. subtilis</i>

#### 4.7.6. Oligonucléotides utilisés lors des expériences de RT-PCR sur de l'ARN total de *B. licheniformis*

Nom	Séquence	Application
BlaIRTUP	5' -TTCCTTCTTTCTGTTCTTATGTTCTTC-3'	RT-PCR du gène <i>blaI</i>
BlaIRTRP	5' -TACCTCAAATCTCTGATGCGGAATTAG-3'	RT-PCR du gène <i>blaI</i>
BlaPTRUP	5' -GCGTGCTTTTACAACAGAAATCA-3'	RT-PCR du gène <i>blaP</i>
BlaPRTRP	5' -CAAGTGCTCTTGCTGTACTGGTAT-3'	RT-PCR du gène <i>blaP</i>
BL01303RT_UP	5' -ATCATTTACCCGAATACATCCA-3'	RT-PCR du gène <i>BL01303</i>
BL01303RT_RP	5' -GATCCACCGCAATAACCTTG-3'	RT-PCR du gène <i>BL01303</i>
16sUP	5' -CAAGCGTTGTCCGAATTAT-3'	RT-PCR du gène codant pour le RNA16s
16sRP	5' -CTCAAGTTCCCCAGTTCCA-3'	RT-PCR du gène codant pour le RNA16s

#### 4.7.7. Oligonucléotides utilisés pour les expériences de retard de migration électrophorétique de l'opérateur présent en amont du gène *BL01303*

Nom	Séquence	Application
OP1303_UP	5' -AAAATTTTACATATATAAAATTTTG- 3'	EMSA Blal-OP <sub>BL01303</sub>
OP1303_RP	5' -CAAAATTTATATATGTAAAATTTT- 3'	EMSA Blal-OP <sub>BL01303</sub>
blaP24mer+	5' -AAAGTATTACATATGTAAAGATTTA- 3'	EMSA Blal-OP <sub>blaP</sub>
blaP24mer-	5' -TAAATCTTACATATGTAATACTTT- 3'	EMSA Blal-OP <sub>blaP</sub>

#### 4.7.8. Oligonucléotides utilisés pour le séquençage et l'amplification du gène *BL01303*

Nom	Séquence	Application
BL01303_UP	5' -CGGAGCTGTATTTCTACAGGAGC- 3'	Séquençage du gène <i>BL01303</i>
BL01303_RP	5' -GCTGTAACCTCCCACGCCATCG- 3'	Séquençage du gène <i>BL01303</i>
BL01303Ndel5'	5' -AACATATGGAAGTAACAGTCCAAAAAGGTGAC- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>
BL01303SacI3'open	5' -TTGAGCTCTTTTAAACTTTAACTTTAACCGT- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>
BL01303Sall5'	5' -AAGTCGACGAAGTAACAGTCCAAAAAGGTGAC- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>
BL01303SacI3'open	5' -TTGAGCTCTTTTAAACTTTAACTTTAACCGT- 3'	Amplification du gène <i>BL01303</i>

### 4.8. Techniques de biologie moléculaire

#### 4.8.1. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. La visualisation de l'ADN est réalisée grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé entre les paires de bases. Après suspension de l'agarose (1%) dans un tampon TAE (TAE 1x : 40 mM Tris acétate ; 2 mM EDTA), celui-ci est solubilisé par l'action de la chaleur et le gel est formé lors du retour à la température ordinaire. L'ADN chargé négativement par ses groupements phosphates, est déposé dans les puits du gel, soumis à un champ électrique et migre vers le pôle positif. La vitesse de migration de l'ADN à travers les pores du gel est inversement proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire. Un marqueur spécifique de poids moléculaire est utilisé comme référence pour déterminer la taille de l'ADN (cf. § 4.6).

#### 4.8.2. Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN résultant d'une PCR ou d'une digestion d'un plasmide par des enzymes de restriction sont purifiés grâce au kit de purification GFX<sup>TM</sup> PCR (Amersham Pharmacia Biotech). Le principe de ce kit repose sur l'utilisation d'une matrice de silice possédant la propriété de fixer sélectivement l'ADN. Après centrifugation, le surnageant non retenu sur la colonne contient les impuretés telles que les protéines, les sels, les courts fragments d'ARN, les dNTPs, le bromure d'éthidium ainsi que les oligonucléotides. La colonne est lavée jusqu'à élimination complète des impuretés et l'ADN d'intérêt est élué de la matrice de silice par de l'eau stérile.

#### 4.8.3. Extraction et purification de l'ADN plasmidien

L'extraction et la purification des plasmides d'*E. coli* sont réalisées à l'aide du kit Nucleobond AX (Macherey-Nagel) pour une culture de 100 ml et du kit Gene JET™ Plasmide Miniprep (Fermentas) pour une culture de 1 à 3 ml.

Dans le cas du kit Nucleobond AX, les cellules subissent une lyse alcaline. Une solution d'acétate précipite ensuite l'ADN chromosomique et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation ou filtration. L'ADN plasmidien est purifié grâce à une matrice échangeuse d'ions. Les contaminants (sels, protéines, ...) sont éliminés par le tampon de lavage. L'élution est réalisée par une solution de force ionique élevée. L'ADN est précipité par addition de 0,8 volume d'isopropanol, lavé à l'éthanol 70%, séché et enfin dissout dans de l'eau stérile.

Le kit Gene JET™ Plasmide se base sur le même principe. Les différentes étapes sont la lyse cellulaire, l'élimination des débris cellulaires et de l'ADN chromosomique et l'élution. La purification de l'ADN plasmidien est dans ce cas réalisée grâce à une matrice de silice. L'élution est réalisée par de l'eau stérile.

#### 4.8.4. Extraction et purification de l'ADN génomique

L'extraction et la purification d'ADN génomique d'*E. coli* et *B. subtilis* sont réalisées à l'aide du kit « illustra bacteria genomic Prep Mini spin kit » (GE Healthcare) au départ d'une culture de 3 ml. Les bactéries subissent d'abord une lyse permettant une libération douce de l'ADN, grâce à une solution de lysozyme et de protéinase K. S'en suit l'étape d'élimination de l'ARN par une solution de RNase (20 mg/ml). Ensuite, l'ADN est purifié sur une matrice de silice. Les contaminants sont éliminés par une solution de lavage. L'élution est réalisée par le tampon d'élution, dont le volume est fonction de la concentration désirée.

#### 4.8.5. Mesure de la concentration en ADN

Le spectromètre Genequant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech) permet l'estimation de la concentration en ADN d'une solution. Une mesure d'absorbance à 260 nm égale à 1, équivaut à une concentration en ADN double brin de 50 µg/ml (pour un trajet optique de 1 cm).

#### 4.8.6. Ligation

Le fragment d'ADN à cloner et le plasmide dans lequel il doit être inséré sont mis en présence de la T4 DNA ligase dans un volume final de 10 µl de tampon de ligation. La solution est incubée soit trois heures à température ambiante, soit cinq à six heures à 16°C ou une nuit à 4°C suivie d'une heure à température ambiante.

#### 4.8.7. Technique de Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cette technique a pour but d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN spécifique à partir d'amorces appelées oligonucléotides. L'ADN subit tout d'abord une étape de dénaturation initiale à 95°C

pendant 5 minutes. S'en suit un cycle de polymérisation commençant par une nouvelle étape de dénaturation à 95°C pendant 1 minute. Chacun des deux brins monocaténares de l'ADN ainsi obtenu est alors hybridé avec un oligonucléotide synthétique complémentaire en abaissant la température jusqu'à une température optimale pour chacune des hybridations pendant une durée de 30 secondes. Ensuite, en présence de désoxynucléotides, une ADN polymérase thermophile synthétise le brin complémentaire en utilisant les oligonucléotides comme amorces à une température fonction de la polymérase employée. La durée de cette étape varie selon la taille du fragment à amplifier et la rapidité de la polymérase utilisée. Ces cycles sont répétés de 20 à 40 fois.

Composition du milieu de réaction :

- Tampon de la polymérase recommandé par le fournisseur
- 0,2 mM de chaque dNTPs
- 200 pmoles de chaque oligonucléotide
- ADN polymérase 1 u/100 µl
- 10 pg à 1 µg de matrice
- H<sub>2</sub>O

#### 4.8.8. Mutagenèse dirigée

Pour réaliser une mutagenèse dirigée à l'aide du kit « QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene), deux amorces complémentaires portant la mutation à introduire sont utilisées au cours d'une seule réaction de PCR. Les conditions d'amplification sont celles recommandées par le fournisseur. En général, le mélange réactionnel de base comprend 50 ng de matrice, 125 ng de chaque oligonucléotide, 10 mM de dNTP et 2,5 unités de DNA polymerase dans un volume final de 50 µl. Ce mélange est soumis à une première dénaturation à 95°C pendant 30 sec, suivie de 18 cycles de PCR (dénaturation à 95°C, 30 sec ; hybridation à 55°C, 1 minute ; élongation à 68°C, 2 minutes/kb de plasmide). Le produit de la PCR est ensuite incubé 60 minutes à 37°C en présence de 10 unités de l'enzyme *DpnI* afin de digérer l'ADN méthylé provenant du plasmide matrice. Enfin, 1 à 2 µl de ce mélange final sont utilisé(s) pour la transformation des cellules compétentes *E. coli* DH5α. Après transformation, culture et extraction, les plasmides obtenus sont analysés par digestion enzymatique et vérifiés par séquençage.

#### 4.8.9. Séquençage de séquence nucléotidique

Le séquençage de l'ADN repose sur la technique de terminaison des chaînes en présence de didésoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). On obtient alors des fragments d'ADN de tailles différentes selon la position où la polymérisation a été interrompue. Les amorces de séquençage sont couplées à une substance fluorescente. Lors de l'électrophorèse, le passage des fragments d'ADN devant un faisceau laser provoque une émission de fluorescence qui est détectée par un photomultiplicateur placé en face de chacune des pistes du gel d'électrophorèse. Les séquences sont lues par un séquenceur automatique à laser. Le séquençage de toutes nos constructions a été effectué par le service GIGA-séquençage de l'Université de Liège.



#### 4.8.10. Isolement et purification des ARN totaux de *B. licheniformis*

Les ARN totaux de *B. licheniformis* sont isolés à l'aide du « RNeasy Protect Bacteria Mini Kit » (Qiagen) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Une culture de *B. licheniformis* de 40 ml est réalisée en milieu LB à 37°C. Lorsque l' $A^{600}$  a atteint une valeur de 0,8, la culture est divisée en deux. Les 20 premiers millilitres sont additionnés de céphalosporine C 2,5 µg/ml et les deux cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 3h. 1 ml de chaque culture est ensuite prélevé et 2 ml de « RNA protect reagent » (Qiagen) y sont ensuite ajoutés. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide d'une solution contenant du lysozyme (15 mg/ml) et de la protéinase K (10% v/v). Le lysat est alors centrifugé puis resuspendu dans de l'éthanol avant d'être chargé sur une matrice de silice RNeasy. L'ARN se fixe sur la colonne et tous les contaminants sont éliminés par lavage. L'ARN est ensuite élué par de l'eau.

Afin de s'assurer que l'échantillon d'ARN préparé est dépourvu d'ADN, celui-ci est traité par le « RNase-Free DNase Set » (Qiagen). Ce kit permet une digestion efficace de l'ADN sur colonne lors de la purification d'ARN lorsqu'on utilise les kits RNeasy. La DNase est efficacement éliminée par lavage.

#### 4.8.11. RT-PCR

La RT-PCR est une technique qui permet de préparer des ADN complémentaires (ADNc) spécifiques à partir d'un mélange d'ARN totaux et d'une amorce complémentaire au brin d'intérêt. Ensuite, l'ADNc est amplifié par PCR.

Les expériences de RT-PCR ont été réalisées à l'aide du « QIAGEN OneStep RT-PCR Kit » (Qiagen). Comme son nom l'indique, ce kit permet de préparer et d'amplifier l'ADNc en une seule réaction. En effet, le mix d'enzymes fourni contient une reverse transcriptase et la HotStarTaq DNA polymerase. Après la transcription inverse (réalisée par incubation 30 minutes à 50°C), les réactions sont chauffées à 95°C pendant 15 minutes pour simultanément inactiver la reverse transcriptase et activer la polymérase. Les fragments PCR sont ensuite amplifiés par PCR classique.

#### 4.8.12. Préparation de cellules compétentes et transformation d'*E. coli*

Chez *E. coli*, l'état de compétence est obtenu par une fragilisation chimique au  $\text{CaCl}_2$  et à froid de la membrane plasmique. Ce traitement permettrait la formation de pores dans la membrane et faciliterait ainsi l'entrée de l'ADN à l'intérieur de la bactérie (Sambrook *et al.*, 1989). Pour ce faire, 100 ml de milieu liquide LB sontensemencés avec 2 ml de préculture d'*E. coli* réalisée dans ce même milieu. La culture est incubée à 37°C jusqu'à ce que l' $A_{600}$  atteigne 0,6. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (10 minutes à 4000 g) et reprises dans 20 ml de tampon TFB1 ( $\text{CH}_3\text{COOK}$  30 mM ;  $\text{CaCl}_2$  10 mM ; KCl 100 mM ; Glycerol 15% ;  $\text{MnCl}_2$  50 mM) stérilisé par filtration. La solution bactérienne est incubée 2 heures sur glace puis centrifugée (10 minutes à 4000 g). Les bactéries sont reprises dans 4 ml de tampon TFB2 (MOPS 10 mM ;  $\text{CaCl}_2$  75 mM ; Glycerol 15%) filtré. Les cellules dites compétentes sont alors aliquotées et conservées à -70°C.

Pour transformer *E. coli*, 2 µl de plasmide purifié ou 5 µl de produit d'une ligation sont ajoutés à 100 µl de cellules compétentes. Ce mélange est incubé sur glace pendant 15 à 30 minutes puis est

soumis à un choc thermique de 45 secondes à 42°C. On y ajoute ensuite 400 µl de milieu SOC et le tout est incubé à 37°C pendant 1h30 à 2h. La sélection de clones transformés s'effectue par étalement sur milieu LB-Agar additionné du marqueur de sélection approprié. Les boîtes de Pétri sont incubées 16 h à 37°C.

#### 4.8.13. Préparation de cellules compétentes et transformation de *B. subtilis*

*B. subtilis* présente un état de compétence naturel observé en fin de phase exponentielle de croissance, plus précisément lorsque la vitesse décroît juste avant d'atteindre la phase plateau, stade où la paroi bactérienne est naturellement fragilisée. Une première préculture est réalisée en inoculant 2 ml de milieu LM avec 50 µl d'inoculum de *B. subtilis*. Cette préculture est incubée 16 heures à 28°C puis est utilisée pour ensemercer 5 ml de milieu LM de manière à obtenir une  $A^{600}$  égale à 0,2. Cette seconde préculture, additionnée de 50 µl de L-tryptophane 5 mg/ml, est incubée à 37°C jusqu'à ce que l' $A^{600}$  atteigne une valeur de 1. Ensuite, 500 µl de la seconde préculture sont ajoutés à 10 ml de milieu MD. La suspension bactérienne est incubée durant 4 heures à 37 °C. Une fois la phase stationnaire atteinte, les cellules sont dites compétentes. Avant d'être aliquotées et conservées à -70°C, les bactéries sont additionnées de glycérol (10 % final).

Pour transformer *B. subtilis*, les cellules compétentes additionnées d'ADN (maximum 20 ng) sont incubées à 37°C pendant 50 minutes à 1h30 sous agitation orbitale. Les cellules sont ensuite étalées sur boîtes LB-agar additionnées de l'antibiotique approprié.

Si la transformation est difficile, un autre protocole de transformation peut être utilisé : la souche à transformer est inoculée dans 1 ml de milieu LB et incubée à 37°C pendant 6 heures. L'absorbance à 450 nm de la préculture est mesurée et on inocule ensuite 1 ml de milieu MMG avec la préculture de façon à obtenir une absorbance de 0,01. A ce moment, le plasmide est ajouté (0,5 à 1 µg d'ADN) et la culture est incubée 24h à 37°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 100 µl de milieu LB et étalé sur boîte LB-agar additionné de l'antibiotique approprié.

### 4.9. Techniques d'analyse des protéines

#### 4.9.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Le SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Analysis Gel Electrophoresis) permet de séparer un mélange de protéines en fonction de leur taille. La concentration des gels de polyacrylamide est choisie en fonction de la masse moléculaire des protéines à analyser. La préparation des gels de concentration et de séparation s'effectue à partir des solutions et des réactifs suivants (volume total pour deux gels) :

	Gel de concentration	Gel de séparation			
	4%	10%	12%	15%	18%
Solution d'acrylamide/ bisacrylamide 30%	1,2 ml	3,325 ml	5 ml	5 ml	6 ml
Tampon Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10% (w/v) dans H <sub>2</sub> O	60 µl	100µl	100 µl	100µl	100µl
Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,5 ml	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	4,05 ml	3,4 ml	2,4 ml	1,29 ml
Persulfate d'ammonium 10% (w/v) dans H <sub>2</sub> O	60 µl	100µl	100 µl	50µl	100 µl
TEMED	6 µl	10µl	10 µl	10µl	10 µl

Le gel de séparation est coulé entre deux plaques de verre préalablement lavées à l'acétone. Afin de s'assurer un front de migration horizontal, de l'isopropanol est déposé au-dessus du gel de séparation. Après la polymérisation de celui-ci, l'isopropanol est éliminé et remplacé par le gel de concentration. Un peigne est introduit dans le gel de concentration avant sa polymérisation de manière à former les puits.

Avant le chargement, du tampon de dénaturation (0,6 ml de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; 2,5 ml de glycérol ; 2 ml de SDS 10% w/v ; bleu de bromophénol 0,1% (w/v) ; 0,5 ml de mercaptoéthanol ; amené à 10 ml avec de l'eau) est ajouté aux échantillons protéiques. Ce mélange est chauffé à 100°C pendant cinq minutes. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel de concentration. L'électrophorèse est réalisée à un voltage constant. Un marqueur de poids moléculaire est utilisé comme référence afin de déterminer les masses moléculaires apparentes des protéines à analyser (cf. § 4.6.). La migration est réalisée à l'aide du tampon TGS : Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1% (w/v) ; H<sub>2</sub>O. Après migration, le gel est coloré par une solution de « PageBlue™ Protein Staining Solution » (Fermentas). L'excès de colorant est éliminé par incubation dans de l'eau stérile de manière à ne laisser apparaître que les protéines colorées.

#### 4.9.2. Test d'acylation

L'échantillon à analyser est incubé avec de l'ampicilline fluorescente (0,5 mM) pendant 30 minutes à 37°C et est ensuite analysé par SDS-PAGE. Après la migration, le gel est analysé à l'aide du PhosphorImager (Biorad). Ce type d'appareillage permet l'excitation et l'observation d'un fluorophore présent dans le gel. L'image obtenue est analysée à l'aide du programme Quantity One (Biorad).

#### 4.9.3. Production et purification des anticorps dirigés contre BlaR-CTD

Le serum polyclonal dirigé contre le senseur de la protéine BlaR1 (BlaR-CTD) a été obtenu d'un lapin de Nouvelle-Zélande immunisé avec la protéine BlaR-CTD purifiée (Duval *et al.*, 2003). Les anticorps polyclonaux ont été purifiés à l'aide d'une colonne Sepharose 4B sur laquelle a été immobilisée la protéine BlaR-CTD purifiée.

Pour cela, 25 mg de la protéine BlaR-CTD purifiée sont tout d'abord dialysés contre un tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M. Ensuite, 330 mg de sépharose (CNBr-activated Sepharose 4 fast

flow, Amersham Biosciences) sont lavés 6 fois à l'aide de HCl 1 mM. La protéine concentrée (volume finale de 500 µl) est ensuite ajoutée à la sépharose et le tout est agité doucement à 4°C pendant une nuit. La matrice est ensuite lavée 3 fois avec du tampon NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 8,3 NaCl 0,5 M. Les groupes actifs restants sont ensuite bloqués lors d'une incubation de 2h à température ambiante dans du tampon Tris 0,1 M pH 8. Ensuite, une série de lavages sont réalisés : 3 lavages avec un tampon Tris 0,1 M pH 8 NaCl 0,5 M, suivis de trois lavages avec du tampon Acétate 0,1 M pH 4 NaCl 0,5 M et de 3 lavages avec du PBS pH 7,4. Le sérum est ajouté à la matrice à ce moment et l'ensemble est incubé à 4°C pour la nuit. Trois lavages supplémentaires au PBS pH 7,4 sont réalisés. La matrice est alors pactée dans une colonne et à nouveau lavée avec du PBS pH 7,4. Les anticorps sont ensuite élués avec du tampon glycine (glycine 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 2,3) en fractions de 1 ml. L'éluat est immédiatement neutralisé en ajoutant à chaque fraction 30 µl de tampon Tris 3 M pH 8,8 et 20 µl de NaCl 5 M.

Les anticorps purifiés dirigés contre BlaR-CTD ont été utilisés à une dilution finale de 1:1000.

#### 4.9.4. Immunodétection (Western blotting)

Les protéines préalablement séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nylon (PVDF, Immobilon, Millipore) grâce à l'appareil de transfert (Hoefer Semiphor, Amersham Biosciences). Le transfert se fait pendant 60 minutes à 45 mA par gel dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; glycine 192 mM ; éthanol 20%. La membrane est ensuite incubée une heure dans un tampon de blocage (lait en poudre 5 % dans du TBS (TBS : Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; NaCl 500 mM)). Elle est alors mise en contact avec les anticorps primaires, dirigés contre la protéine d'intérêt pendant 90 minutes (anticorps dilués dans une solution TTBS additionnée de 1% de BSA (TTBS : TBS + Tween 20 0,05 %)). La membrane est ensuite lavée dans le TTBS puis placée pendant 90 minutes dans la solution d'anticorps secondaires, couplés à la phosphatase alcaline. Après lavage au TTBS puis TBS, la membrane est révélée en présence de 150 µl de NitroBlue 22 Tetrazolium (NBT, 30 mg/ml dans du DMF 70%) et 150 µl de 5-bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate (BCIP, 22,5 mg/ml dans du DMF 70%) dans un volume de 15 ml de tampon carbonate (NaHCO<sub>3</sub> 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 9,8) pendant 3 à 10 minutes.

#### 4.9.5. Séquençage NH<sub>2</sub> terminal

Les protéines séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) sont transférées sur une membrane PVDF (Millipore), préalablement rincée dans du méthanol et incubée dans le tampon de transfert (CAPS 10 mM, pH 10,5). Après le transfert, la membrane est colorée au bleu de coomassie (H<sub>2</sub>O, méthanol 50%, bleu de coomassie R-250 0,1%) fraîchement préparé et filtré, elle est ensuite lavée dans la solution de décoloration (méthanol 50%, acide acétique 10%) et séchée pendant la nuit à température ambiante. Ensuite, la protéine à séquencer est découpée du blot par un instrument stérilisé. Le séquençage se fait dans un microséquenceur automatique, le « Pulsed Liquid Phase Protein Sequenator » (Applied Biosystems).

#### 4.9.6. Dosage des protéines par la méthode au BCA (Pierce)

La méthode au BCA est une méthode sensible de dosage des protéines basée sur la réduction du Cu<sup>2+</sup> en milieu alcalin par les liaisons peptidiques, les résidus tryptophane, cystéine et tyrosine. Le Cu<sup>2+</sup> en présence d'acide bicinchoninique (BCA) forme un complexe qui absorbe à 562 nm. Cette technique est utilisée pour déterminer la concentration en protéines totales dans un extrait cellulaire

brut non purifié (limites de sensibilité: 20 à 2000 µg/ml). La réaction de dosage est réalisée en microplaques à fond plat (format 96 puits, Merck). 200 µl de réactif BCA sont ajoutés dans les puits correspondants à l'échantillon, au blanc et aux standards de sérum albumine bovine (BSA) puis ceux-ci sont additionnés de 20 µl d'échantillon, du blanc (tampon de conditionnement de la protéine à doser) ou des standards de BSA (0 ; 0,025 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 mg/ml). La microplaque est incubée 30 minutes à 37°C avant d'être lue sur un lecteur pour microplaque.

#### 4.9.7. Fractionnement cellulaire

Lors des tests de production de protéines recombinantes chez *E. coli*, des échantillons de 1 ml de culture sont récoltés, centrifugés et remis en suspension dans 100 µl de tampon phosphate 50 mM pH 7 par unité d'A<sup>600</sup> de l'échantillon. Pour récolter la fraction totale, cette suspension cellulaire subit une sonication (3 fois 15 secondes). La fraction soluble est séparée de l'insoluble par centrifugation de l'échantillon pendant 20 minutes à 13000 g. Le culot correspondant à la fraction insoluble est remis en suspension dans un volume équivalant à la fraction soluble.

#### 4.9.8. Purification de protéines par IMAC (« Immobilized Metal Affinity Chromatography »)

L'IMAC est un type de chromatographie d'affinité qui fait appel à l'immobilisation, sur une résine, d'un atome métallique comme le nickel, le zinc, le cobalt, etc. Lors de ce travail, nous avons utilisé une matrice « chelating sépharose™ Fast Flow » (Amersham Biosciences) sur laquelle ont été immobilisés des ions Ni<sup>2+</sup>. Ce métal de transition chargé positivement peut former six liaisons de coordination : trois avec le sépharose et trois avec des molécules d'eau. Les molécules d'eau peuvent être remplacées par la protéine ligand durant la phase d'adsorption et par une molécule de faible poids moléculaire (l'imidazole) durant l'élution. Une colonne de 10 ml a été utilisée avec un débit de 1,5 à 3 ml/minute. La colonne est préalablement équilibrée avec un tampon permettant la fixation de la protéine (tampon A : Tris 20 mM pH 8). L'échantillon est ensuite injecté sur la colonne. Les contaminants sont éliminés par un lavage avec le tampon d'équilibration additionné de NaCl 2 M. L'élution est réalisée par un gradient en tampon B (Tris 20 mM pH 8, Imidazole 250 mM). La colonne est ensuite régénérée et conservée dans une solution d'éthanol 20%. La régénération de la colonne est réalisée en injectant les volumes appropriés des solutions suivantes :

- 3 volumes de colonne d'EDTA 100 mM
- 5 volumes de colonne d'H<sub>2</sub>O milliQ
- 2 volumes de colonne de NaOH 1M
- 10 volumes de colonne d'H<sub>2</sub>O milliQ
- 5 volumes de colonne de tampon Tris 1 M pH7, NaCl 150 mM
- 5 volumes de colonne d'H<sub>2</sub>O milliQ
- 3 volumes de colonne de NiSO<sub>4</sub> 100mM
- 10 volumes de colonne d'H<sub>2</sub>O milliQ
- 3 volumes de colonne d'éthanol 20%

#### 4.9.9. Purification de protéines sur colonne StrepTactin

Les résines de type StrepTactin permettent la purification de protéines portant une StrepTag par chromatographie d'affinité basée sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine. La Strep-Tag est un peptide synthétique de 8 acides aminés (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Cette séquence peptidique mime la poche de liaison de la biotine et montre donc une affinité intrinsèque pour la StrepTactin qui est une streptavidin modifiée. Lors de ce travail, 2 types de colonnes ont été utilisées : une colonne de 1 ml Gravity flow *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup>column (IBA BioTAGnology) et une colonne de 5 ml *Strep-Tactin*<sup>®</sup>Superflow<sup>®</sup> cartridge H-PR (IBA BioTAGnology).

Le processus chromatographique se déroule comme suit. La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de colonne de tampon de lavage. L'échantillon protéique est ensuite injecté sur la colonne. Les contaminants sont éliminés par un lavage avec 5 volumes de colonne de tampon de lavage. L'élution de la protéine d'intérêt est réalisée à l'aide de 4 volumes de colonne de tampon d'élution qui contient de la desthiobiotine, une biotine modifiée qui a une très grande affinité pour la résine. Lors de l'élution, des fractions de ½ volume de colonne sont récoltées. La colonne est ensuite régénérée à l'aide de 15 volumes de colonne de tampon de régénération. Pour la colonne de 1 ml, le débit est fonction de la gravité et pour la colonne de 5 ml, le débit utilisé est de 3 ml/minutes pour toutes les étapes excepté la charge de l'échantillon qui est réalisée avec un débit de 1,5 ml/minutes.

Composition des tampons :

- Tampon de lavage : Tris-HCl 100 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM.
- Tampon d'élution : Tris-HCl 100 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; desthiobiotine 2,5 mM.
- Tampon de régénération : Tris-HCl 100 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM ; HABA 1 mM.

Pour la purification de la protéine membranaire BlaR1, les tampons de lavage et d'élution sont additionnés de DDM 0,01 %.

#### 4.9.10. Induction des souches de *B. subtilis* et dosage de l'activité $\beta$ -lactamasique

Pour les tests d'induction et le dosage de l'activité  $\beta$ -lactamasique, 40 ml de milieu LB additionnés de chloramphénicol 7  $\mu$ g/ml sont inoculés avec une préculture de *B. subtilis* transformé par le pDML995 ou un dérivé de celui-ci. La culture est placée sous agitation dans un incubateur liquide à 37°C. Lorsque l' $A_{600}$  atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8, la culture est séparée en deux volumes de 20 ml : un étant induit par l'ajout d'une  $\beta$ -lactamine, la céphalosporine C (concentration finale de 2,5  $\mu$ g/ml) et l'autre servant de témoin. Un échantillon est prélevé et la  $A_{600}$  est mesurée toutes les heures pour les cultures induite et non-induite.

La mesure de l'activité  $\beta$ -lactamasique de chaque échantillon est basée sur le changement du spectre d'absorption de la nitrocéfine lors de son hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase. La nitrocéfine ou CPR (céphalosporine rouge) est un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame chromogène. Une solution stock de nitrocéfine à 10 mM est préparée en solubilisant 5,38 mg de nitrocéfine dans 1 ml de

diméthylformamide (DMF). La solution utilisée (100  $\mu\text{M}$ ) est obtenue en diluant 500  $\mu\text{l}$  de solution stock dans 50 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7. La variation d'absorbance est mesurée à 482 nm. Le milieu réactionnel est composé de 5 à 50  $\mu\text{l}$  de surnageant de culture contenant la  $\beta$ -lactamase synthétisée par les bactéries, additionné de nitrocéfine pour atteindre un volume final de 500  $\mu\text{l}$ . La réaction est réalisée à 37°C. Le dosage de la quantité de  $\beta$ -lactamases produites est obtenu en effectuant le rapport de la variation d'absorbance à 482 nm par unité de temps et par unité d' $A_{600}$  de la suspension cellulaire. La quantité de  $\beta$ -lactamases  $[E_t]$  est calculée à partir des équations suivantes :

$$v_0 = (\Delta A \times s^{-1} \times A^{600-1}) / \varepsilon$$

$$v_0 = (k_{\text{cat}} \times [E_t] \times [S]) / (K_m + [S])$$

où

$$\left\{ \begin{array}{l} v_0 = \text{vitesse initiale;} \\ \Delta A = \text{variation d'absorbance} \\ k_{\text{cat}} = \text{constante catalytique (470 s}^{-1}\text{)} \\ [S] = \text{concentration molaire en substrat} \\ \quad (100 \mu\text{M}) \\ K_m = 40 \mu\text{M} \\ \varepsilon = \text{coefficient d'extinction molaire de la} \\ \quad \text{nitrocéfine (15000 M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} \end{array} \right.$$

#### 4.10. Reconstitution de la protéine BlaRE213A dans des liposomes

Afin de réinsérer une protéine membranaire dans des liposomes, il faut en premier lieu réaliser un film lipidique. Pour cela, des extraits de lipides polaires d'*E. coli* (Avanti), solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 20 mg/ml, sont utilisés. La solution de lipide, placée dans un tube en verre de 5 ml, est séchée par un flux d'azote. Le tube est ensuite placé dans un dessiccateur pendant deux heures afin d'éliminer toute trace de chloroforme.

Le film lipidique est ensuite remis en suspension avec une solution de n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside 0,1% contenant la protéine membranaire. Le détergent est progressivement éliminé à l'aide de Biobeads SM-2 Adsorbent (Bio-Rad). Ces dernières sont préalablement hydratées avec de l'eau milliQ. L'eau est ensuite retirée à l'aide d'une seringue et remplacée par la solution lipides/protéines. Le tout est agité pendant une heure à 4°C. Ensuite, la solution lipides/protéines est récupérée à l'aide d'une seringue et déposée sur des billes fraîches. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à élimination du détergent.

La solution lipides/protéines est ensuite additionnée de sucrose (concentration finale 40%). Cette solution est soumise à une ultracentrifugation de 1 heure à 100000 g afin de concentrer le mélange lipides/protéines à la surface. Au-dessus de cette surface est ensuite coulé un gradient de sucrose de 30 à 5 %. Le tout est soumis à une ultracentrifugation de 16h à 100000 g.

Le gradient de sucrose est ensuite fractionné à l'aide d'une pompe péristaltique. Chaque fraction est analysée par mesures d'absorbance à 400nm (détection des lipides) et à 280nm (détection des protéines). Les fractions dans lesquelles des protéines et des lipides sont détectés contiennent des liposomes dans lesquels sont réinsérées les protéines membranaires.



#### 4.11. Test d'activité de la boucle L3 de BlaR1

Afin de tester l'activité de la boucle L3, les échantillons contenant 5 pmoles de tripeptide dans 100 µl de tampon phosphate 20 mM pH 7 sont incubés pendant 1h à 37°C avec les membranes de *B. subtilis* enrichies en BlaR1 ou la protéine NusA-L3. L'échantillon est ensuite congelé puis lyophilisé et resuspendu dans 50 µl de tampon borate 50 mM pH 9,5. Ensuite, 15 µl de TNBSA 0,3 % sont ajoutés et la solution est incubée 55 minutes à 37°C. Cette opération est répétée une seconde fois. L'échantillon est ensuite congelé puis lyophilisé et resuspendu dans 100 µl de tampon C (tampon C = H<sub>2</sub>O mQ, 0,1 % TFA). Après une centrifugation de 10 minutes à 14000 g, le surnageant est injecté sur une colonne HPLC Nucléodur 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée dans du tampon C. La colonne a ensuite été lavée avec du tampon C. Le débit utilisé tout au long du processus chromatographique est de 0,7 ml/minute. L'élution est réalisée par un gradient de 0 à 70 % en tampon D (tampon D = acétonitrile, TFA 1 %) en 60 minutes, suivi du plateau à 70 % pendant 5 minutes. Ensuite, la concentration en tampon D passe de 70 à 100 % en 1 minute. Il s'en suit un plateau de 5 minutes à 100 % en tampon D. La concentration en tampon D retombe alors à 0 % en 1 minute et reste stable pendant 10 minutes. L'ensemble du processus chromatographique est suivi par mesures d'absorbance à 335 nm.

#### 4.12. Préparation des membranes de *Bacillus*

*B. subtilis* transformé ou non par le pDML995, est mis en culture dans du milieu LB additionné ou non de chloramphénicol à 37°C. Lorsque l'A<sup>600</sup> atteint une valeur de 0,6, les cultures sont séparées en deux. Une partie est induite par addition de céphalosporine C (2,5 mg/ml) et l'incubation des deux demi-cultures est poursuivie à 37°C jusqu'à obtenir une valeur d'A<sup>600</sup> d'environ 1,5. Les cellules sont ensuite isolées par centrifugation 10 minutes à 6000 g. Le culot est ensuite resuspendu dans 10 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7. La lyse cellulaire est obtenue par l'ajout de lysozyme (2 mg/ml) suivi d'une sonication (2 pulses de 30 sec). Les cellules non lysées sont éliminées par une centrifugation de 10 minutes à 6000 g. Ensuite, les membranes sont récupérées par la centrifugation du surnageant pendant 30 minutes à 39000 g. Le culot contenant les membranes est ensuite lavé 2 fois dans du tampon phosphate 50 mM pH 7. Finalement, les extraits membranaires sont repris dans 500 µl du même tampon et conservés à -20°C.

#### 4.13. Analyse par gel retard ou « EMSA » (electrophoretic migration shift assay)

Pour réaliser les analyses par gel retard, 2 techniques ont été utilisées. La première permet de mettre en évidence la formation d'un complexe protéine-ADN, grâce à un séquenceur automatique Alf Express (Amersham Pharmacia Biotech) et deux oligonucléotides synthétiques complémentaires dont un brin est marqué à son extrémité 5' d'indodicarbocyanine (Filée *et al.*, 2001). Les oligonucléotides hybridés, la protéine liant l'ADN purifiée, ainsi que de l'ADN de sperme de saumon (ADN non spécifique, Sigma) sont dilués dans le tampon EMSA dont la composition est : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM ; NaCl 100 mM ; EDTA 1 mM ; glycérol 5 % ; BSA 50 µg/ml ; pH 7,5. Le mélange est incubé à 30°C pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel acrylamide/bisacrylamide non dénaturant de 4,5%. La migration du gel s'effectue dans un tampon

TBE (Tris 9 mM, acide borique 90 mM, EDTA 2 mM) sur le séquenceur automatique Alf Express. La migration se déroule à puissance constante (10W, 800V et 45 mA) pendant 180 minutes. Les résultats sont analysés grâce au logiciel Fragment Manager (Amersham Pharmacia Biotech).

Le retard de migration d'une sonde ADN fluorescente par fixation d'une protéine peut également être analysé sur gel agarose 1%. La protéine liant l'ADN purifiée est incubée avec la sonde d'ADN dans du tampon EMSA. De l'ADN non spécifique de sperme de saumon (Sigma-Aldrich) est également ajouté au mélange. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1% préparé avec du tampon TA (Tris acétate 40mM). Après une migration à 90 V pendant 30-45 minutes, le gel est révélé au Typhoon Trio+ (GE Healthcare) par excitation du fluorophore Cy5 à 633nm.

#### 4.14. Test d'autolyse cellulaire

Afin de déterminer le profil d'autolyse d'une souche de *Bacillus*, une préculture de 3 ml en milieu LB est placée pour la nuit à 37°C. Elle est ensuite diluée 100 fois dans un volume de 100 ml du même milieu. La culture est incubée à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité optique de 0,6-0,7. Elle est alors placée sur glace puis centrifugée à 7000g pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées 3 fois avec une solution de NaCl 0,9 g/L puis resuspendues dans 20 ml de tampon phosphate 100 mM pH 7 et incubée à 37°C avec une légère agitation. La lyse est ensuite analysée en mesurant l'absorbance à 575 nm toutes les 5 à 10 minutes pendant 100 minutes.

#### 4.15. Préparation de peptidoglycane de *B. licheniformis* purifié

Une préculture de *B. licheniformis* 749I de 20 ml en milieu LB est incubée à 37°C pendant une nuit. 10 ml de préculture sont ensuite ajoutés à 1 litre de milieu BH. La culture est placée à 37°C jusqu'à obtenir une  $A^{600}$  égale à 1 et est ensuite centrifugée 10 minutes à 4°C à 6000 g. Le culot comprenant les cellules est resuspendu dans 20 ml d'eau mQ froide. Ensuite, la suspension bactérienne est ajoutée goutte à goutte et sous agitation à 20 ml d'une solution SDS 8% bouillante. Après avoir laissé la solution obtenue bouillir pendant 1 h sous agitation, une nouvelle centrifugation est réalisée (20 minutes à 39000g). Le culot est lavé 5 à 10 fois avec 20 ml d'eau mQ froide jusqu'à l'élimination totale du SDS (ultracentrifugation de 60 minutes à 100000 g). Le culot est ensuite resuspendu dans 20 ml de tampon phosphate 20 mM pH 6,9 NaCl 7 mM auxquels sont ajoutés 200 µg/ml d' $\alpha$ -amylase. Après une incubation de 2 à 3 h à 20°C, la solution est centrifugée (60 minutes à 100000 g). Le culot obtenu est resuspendu dans 20 ml de tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 auxquels sont ajoutés 200 µg/ml de Trypsine. Cette solution est incubée à 25°C pendant une nuit et est ensuite centrifugée (60 minutes à 100000 g). Le culot est resuspendu dans 20 ml de tampon Tris 100 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 10 mM auxquels sont ajoutés 500 µg/ml de Pronase. La solution obtenue est incubée à 40°C pendant 2 à 3 h. Ensuite, la solution est à nouveau centrifugée (60 minutes à 100000 g). Le culot est lavé 2 fois à l'eau mQ froide, une fois avec 20 ml d'une solution de LiCl 8M et, à nouveau, une fois avec 20 ml d'eau mQ. Finalement, le culot est resuspendu dans 5 ml d'eau mQ, congelé à -70°C et lyophilisé.

#### 4.16. Test de fixation d'une protéine sur du peptidoglycane purifié de *Bacillus*

Dans un volume total de 500 µl d'eau, 20 µg de protéine purifiée sont incubés en présence de 3 mg de peptidoglycane de *Bacillus* pendant 10 minutes sur glace. Le surnageant est récupéré par centrifugation (10 minutes à 13000 g). Le peptidoglycane est alors lavé avec 1 ml d'H<sub>2</sub>O. Le surnageant est récupéré par centrifugation et mélangé avec les 500 µl de surnageant de départ (= échantillon 1). Le peptidoglycane est ensuite incubé en présence de 500 µl d'une solution NaCl 5 M pendant 10 minutes sur glace. Le surnageant est récupéré par centrifugation. Un second lavage avec 1 ml de solution saline est réalisé. Le surnageant est alors récupéré et mélangé avec les 500 µl du premier lavage (= échantillon 2). Le peptidoglycane est ensuite incubé dans 500 µl d'une solution SDS 2 %. La solution est mise dans un bain marie en ébullition pendant 5 minutes. Cette étape est reproduite une seconde fois avec 1 ml de solution SDS 2 %. Les surnageants sont mélangés (= échantillon 3). Le peptidoglycane est remis en suspension dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7 et est dialysé contre 1 l de ce même tampon pendant une nuit à 4°C. L'échantillon est récupéré puis est ajusté à 1,5 ml avec le tampon phosphate avant d'être additionné de 4 µg de mutanolysine. La digestion est réalisée pendant 3h à 37°C. Pour compléter la dégradation du peptidoglycane, une sonication (2 fois 20 sec) est réalisée (= échantillon 4). Un volume de 300 µl de chaque échantillon est dialysé contre 1 l d'eau puis est lyophilisé avant d'être resuspendu dans 30 µl d'eau. Enfin, les échantillons sont analysés par SDS-PAGE.

#### 4.17. Etude de l'activité de Yoch par zymogramme

Afin de déterminer si une protéine est capable de digérer le peptidoglycane de *Bacillus*, elle est déposée sur un gel SDS-PAGE 12% dont le gel de séparation est additionné de 0,05 % de peptidoglycane. Après la migration électrophorétique, le gel est placé pendant 30 minutes dans de l'eau mQ puis 30 minutes dans une solution de renaturation (Tris-HCl 25 mM pH7,5 ; 0,1 % triton x-100 ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM) à température ambiante. Ensuite, le gel est incubé 16 h à 37°C dans une solution de renaturation fraîche. Le gel est ensuite rincé à l'eau et coloré pendant 3h dans une solution de coloration (bleu de méthylène 0,1 % ; KOH 0,01 %). Finalement, le gel est décoloré à l'eau mQ jusqu'à apparition des zones décolorées correspondant à une digestion du peptidoglycane.

#### 4.18. Analyse par HPLC de la dégradation du peptidoglycane

Afin de tester l'activité autolytique de Yoch, 200 µl de peptidoglycane solubilisé dans de l'eau mQ (11 mg/ml) sont ajoutés à 25 µl de tampon phosphate 200 mM pH 6,8 et 25 µl de protéine (50 µg/ml). Ce mélange réactionnel est placé à 37°C sous agitation pendant une nuit. Ensuite, le peptidoglycane non digéré est éliminé par centrifugation (1 minute à 14000g) et le surnageant est filtré (filtre 0,22 µm). Ensuite, chaque échantillon est analysé par HPLC sur une colonne Nucléosil 100-3 C18 (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée par du tampon C (tampon C = H<sub>2</sub>O mQ, 0,1 % TFA). Le débit utilisé tout au long du processus chromatographique est de 0,5 ml/minute. L'éluion est réalisée par un gradient de 0 à 30 % en tampon D (tampon D = acétonitrile 60 %, TFA 0,035 %) en 100 minutes puis un deuxième gradient de 30 à 100 % en tampon D en 20 minutes et enfin un plateau à 100 % en tampon D pendant 10 minutes. Ensuite, la concentration en tampon D retombe à

0 % en 5 minutes et reste stable pendant 5 minutes. L'ensemble du processus chromatographique est suivi par mesure d'absorbance à 210 nm.

#### 4.19. Outils bioinformatiques

Les oligonucléotides sont choisis grâce au programme **Vecteur NTI** (Invitrogen) qui permet d'évaluer différents paramètres tels que la formation de structures secondaires ou la température de fusion. Ce programme est également utilisé pour construire graphiquement des plasmides.

L'alignement de séquences nucléotidiques ou peptidiques peut être réalisé à l'aide du programme **Multalin** disponible sur le site internet de l'INRA à l'adresse : <http://www.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

Le site internet du **NCBI** (National Center for Biotechnology Information ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) donne l'accès à différentes banques de données génomiques et protéomiques. Il propose également le programme **Blastp** qui permet la comparaison d'une séquence peptidique avec les séquences peptidiques des banques de données.

De nombreux outils permettant l'analyse de séquences génomiques et protéiques sont également disponibles sur le site de **BCM Search Launcher** (The Baylor College of Medicine Search Launcher) dont l'adresse est <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> ainsi que sur le site <http://www.expasy.org/> qui est le serveur protéomique **Expasy** de l'Institut suisse de bioinformatique (SIB).

#### 4.20. PREDetector

PREDetector est un programme informatique qui permet l'identification de séquences similaires à celles reconnues, et déjà validées expérimentalement, par une protéine liant l'ADN sur base de la méthode des matrices de scores. Ainsi, il convertit un alignement multiple de séquences *cis* en matrices de scores via la formule de Hertz et Stormo (Hertz & Stormo, 1999) :

$$weight_{i,j} = \ln \left\{ \frac{[(n_{i,j} + p_i)/(N + 1)]}{p_i} \right\} \sim \ln \left( \frac{f_{i,j}}{p_i} \right)$$

**N** est le nombre total de séquences alignées, **p<sub>i</sub>** est l'« a priori », c'est-à-dire la fréquence d'apparition du nucléotide **i** dans le génome dans lequel la recherche de séquences similaires à la séquence consensus va être effectuée, et **f<sub>i,j</sub> = n<sub>i,j</sub>/N** est la fréquence d'apparition du nucléotide **i** en position **j**. Le score d'un nucléotide **i** en position **j** de l'alignement est positif, nul ou négatif selon que sa fréquence d'apparition à cette position est plus grande, égale ou plus petite que l'« a priori » de ce nucléotide (**ln f<sub>i,j</sub>/p<sub>i</sub>**).

A l'aide de la matrice créée, PREDetector scanne la région génomique souhaitée et attribue un score aux séquences cibles potentielles identifiées. Le score attribué à une séquence similaire à la séquence consensus est la somme des scores de chaque nucléotide qui la compose. Le programme détermine également la position de chaque séquence *cis* par rapport au codon d'initiation de leurs

gènes respectifs et stipule le nom de ces gènes, leurs fonctions, ainsi que les gènes potentiellement co-transcrits. Les résultats de la prédiction sont classés en fonction de leur localisation dans le génome, c'est-à-dire dans une région codante (« coding region ») ou dans une région intergénique, celle-ci étant divisée en région régulatrice (« regulatory region », où les éléments régulateurs sont les plus susceptibles d'être trouvés), en région amont (« upstream region », située en amont d'un codon *start* mais au-delà de la région régulatrice) et en région terminatrice (« terminator region », c'est-à-dire la région définie comme comprise entre deux codons *stop*).

PREDetector scanne les génomes dans les deux sens de lecture (forward et reverse). Les données brutes issues de cette recherche comportent donc parfois des doublons, c'est-à-dire une même séquence ayant des scores différents selon le sens de sa lecture. Dans ce cas, lors de notre analyse, nous avons conservé la séquence de score le plus élevé. Le programme détermine également la position de chaque séquence *cis* par rapport au codon d'initiation de leurs gènes respectifs et stipule le nom de ces gènes, leurs fonctions, ainsi que les gènes potentiellement co-transcrits.

- Amoroso, A., J. Boudet, S. Berzigotti, V. Duval, N. Teller, D. Mengin-Lecreulx, A. Luxen, J. P. Simorre & B. Joris, (2012) A Peptidoglycan Fragment Triggers beta-lactam Resistance in *Bacillus licheniformis*. *PLoS Pathog* **8**: e1002571.
- Avison, M. B., P. Niumsup, K. Nurmahomed, T. R. Walsh & P. M. Bennett, (2004) Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. *J Antimicrob Chemother* **53**: 197-202.
- Avison, M. B., P. Niumsup, T. R. Walsh & P. M. Bennett, (2000) *Aeromonas hydrophila* AmpH and CepH beta-lactamases: derepressed expression in mutants of *Escherichia coli* lacking creB. *J Antimicrob Chemother* **46**: 695-702.
- Berzigotti, S., K. Benlafya, J. Sepulchre, A. Amoroso & B. Joris, (2012) *Bacillus licheniformis* BlaR1 L3 loop is a zinc metalloprotease activated by self-proteolysis. *PLoS One* **7**: e36400.
- Brans, A., P. Filée, A. Chevigne, A. Claessens & B. Joris, (2004) New integrative method to generate *Bacillus subtilis* recombinant strains free of selection markers. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7241-7250.
- Borbulevych, O., M. Kumarasiri, B. Wilson, L. I. Llarrull, M. Lee, D. Heseck, Q. Shi, J. Peng, B. M. Baker & S. Mobashery, (2011) Lysine Nzeta-decarboxylation switch and activation of the beta-lactam sensor domain of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **286**: 31466-31472.
- Cheng, Q., H. Li, K. Merdek & J. T. Park, (2000) Molecular characterization of the beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *J Bacteriol* **182**: 4836-4840.
- Cheng, Q. & J. T. Park, (2002) Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides. *J Bacteriol* **184**: 6434-6436.
- Clarke, S. R. & K. G. Dyke, (2001) The signal transducer (BlaRI) and the repressor (Blal) of the *Staphylococcus aureus* beta-lactamase operon are inducible. *Microbiology* **147**: 803-810.
- Duval, V., M. Swinnen, S. Lepage, A. Brans, B. Granier, C. Franssen, J. M. Frère & B. Joris, (2003) The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of beta-lactamase synthesis. *Mol Microbiol* **48**: 1553-1564.
- Fernandez-Recio, J., F. Walas, L. Federici, J. Venkatesh Pratap, V. N. Bavro, R. N. Miguel, K. Mizuguchi & B. Luisi, (2004) A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* **578**: 5-9.
- Filée, P., C. Vreuls, R. Herman, I. Thamm, T. Aerts, P. P. De Deyn, J. M. Frère & B. Joris, (2003) Dimerization and DNA binding properties of the *Bacillus licheniformis* 749/I Blal repressor. *J Biol Chem* **278**: 16482-16487.
- Filée, P., K. Benlafya, M. Delmarcelle, G. Moutzourelis, J. M. Frère, A. Brans & B. Joris, (2002) The fate of the Blal repressor during the induction of the *Bacillus licheniformis* BlaP beta-lactamase. *Mol Microbiol* **44**: 685-694.

- Filée, P., M. Delmarcelle, I. Thamm & B. Joris, (2001) Use of an ALFexpress DNA sequencer to analyze protein-nucleic acid interactions by band shift assay. *Biotechniques* **30**: 1044-1048, 1050-1041.
- Frère, J. M., (1995) Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol* **16**: 385-395.
- Frère, J. M., C. Duez, J. M. Ghuysen & J. Vandekerkhove, (1976) Occurrence of a serine residue in the penicillin-binding site of the exocellular DD-carboxy-peptidase-transpeptidase from *Streptomyces R61*. *FEBS Lett* **70**: 257-260.
- Frère, J. M., B. Joris, O. Dideberg, P. Charlier & J. M. Ghuysen, (1988) Penicillin-recognizing enzymes. *Biochem Soc Trans* **16**: 934-938.
- Garcia-Castellanos, R., G. Mallorqui-Fernandez, A. Marrero, J. Potempa, M. Coll & F. X. Gomis-Ruth, (2004) On the transcriptional regulation of methicillin resistance: Mecl repressor in complex with its operator. *J Biol Chem* **279**: 17888-17896.
- Garcia-Castellanos, R., A. Marrero, G. Mallorqui-Fernandez, J. Potempa, M. Coll & F. X. Gomis-Ruth, (2003) Three-dimensional structure of Mecl. Molecular basis for transcriptional regulation of staphylococcal methicillin resistance. *J Biol Chem* **278**: 39897-39905.
- Gao, X., J. Wang, D. Q. Yu, F. Bian, B. B. Xie, X. L. Chen, B. C. Zhou, L. H. Lai, Z. X. Wang, J. W. Wu & Y. Z. Zhang, (2010) Structural basis for the autoprocessing of zinc metalloproteases in the thermolysin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17569-17574.
- Ghuysen, J. M. & C. Goffin, (1999) Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2339-2344.
- Goffin, C. & J. M. Ghuysen, (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1079-1093.
- Goodell, E. W., (1985) Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **163**: 305-310.
- Green, D. W., (2002) The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets* **6**: 1-19.
- Gregory, P. D., R. A. Lewis, S. P. Curnock & K. G. Dyke, (1997) Studies of the repressor (Blal) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **24**: 1025-1037.
- Gulick, A. M., D. M. Schmidt, J. A. Gerlt & I. Rayment, (2001) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: crystal structures of the L-Ala-D/L-Glu epimerases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **40**: 15716-15724.
- Hackbarth, C. J. & H. F. Chambers, (1993) blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1144-1149.
- Hakenbeck, R., (1998) Mosaic genes and their role in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* **19**: 597-601.



- Hanique, S., M. L. Colombo, E. Goormaghtigh, P. Soumillion, J. M. Frère & B. Joris, (2004) Evidence of an intramolecular interaction between the two domains of the BlaR1 penicillin receptor during the signal transduction. *J Biol Chem* **279**: 14264-14272.
- Hanson, N. D. & C. C. Sanders, (1999) Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm Des* **5**: 881-894.
- Hardt, K., B. Joris, S. Lepage, R. Brasseur, J. O. Lampen, J. M. Frère, A. L. Fink & J. M. Ghuyssen, (1997) The penicillin sensory transducer, BlaR, involved in the inducibility of beta-lactamase synthesis in *Bacillus licheniformis* is embedded in the plasma membrane via a four-alpha-helix bundle. *Mol Microbiol* **23**: 935-944.
- Hausrath, A. C. & B. W. Matthews, (1994) Redetermination and refinement of the complex of benzylsuccinic acid with thermolysin and its relation to the complex with carboxypeptidase A. *J Biol Chem* **269**: 18839-18842.
- Hertz, G. Z. & G. D. Stormo, (1999) Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* **15**: 563-577.
- Hiard, S., R. Marea, S. Colson, P. A. Hoskisson, F. Titgemeyer, G. P. van Wezel, B. Joris, L. Wehenkel & S. Rigali, (2007) PREDetector: a new tool to identify regulatory elements in bacterial genomes. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 861-864.
- Holtje, J. V., D. Mirelman, N. Sharon & U. Schwarz, (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **124**: 1067-1076.
- Hooper, N. M., (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**: 1-6.
- Howell, A., S. Dubrac, K. K. Andersen, D. Noone, J. Fert, T. Msadek & K. Devine, (2003) Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol Microbiol* **49**: 1639-1655.
- Jacobs, C., J. M. Frère & S. Normark, (1997) Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88**: 823-832.
- Jacobs, C., L. J. Huang, E. Bartowsky, S. Normark & J. T. Park, (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J* **13**: 4684-4694.
- Jacobs, C., B. Joris, M. Jamin, K. Klarsov, J. Van Beeumen, D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, J. T. Park, S. Normark & J. M. Frère, (1995) AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol* **15**: 553-559.
- Joris, B., J. M. Ghuyssen, G. Dive, A. Renard, O. Dideberg, P. Charlier, J. M. Frère, J. A. Kelly, J. C. Boyington, P. C. Moews & et al., (1988) The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces R61* DD-peptidase family. *Biochem J* **250**: 313-324.

- Joris, B., P. Ledent, T. Kobayashi, J. O. Lampen & J. M. Ghuyssen, (1990) Expression in *Escherichia coli* of the carboxy terminal domain of the BLAR sensory-transducer protein of *Bacillus licheniformis* as a water-soluble Mr 26,000 penicillin-binding protein. *FEMS Microbiol Lett* **58**: 107-113.
- Joris, B., S. Englebert, C. P. Chu, R. Kariyama, L. Daneo-Moore, G. D. Shockman & J. M. Ghuyssen, (1992) Modular design of the Enterococcus hirae muramidase-2 and Streptococcus faecalis autolysin. *FEMS Microbiol Lett* **70**: 257-264.
- Kelly, J. A., A. P. Kuzin, P. Charlier & E. Fozzy, (1998) X-ray studies of enzymes that interact with penicillins. *Cell Mol Life Sci* **54**: 353-358.
- Kerff, F., P. Charlier, M. L. Colombo, E. Sauvage, A. Brans, J. M. Frère, B. Joris & E. Fozzy, (2003) Crystal structure of the sensor domain of the BlaR penicillin receptor from *Bacillus licheniformis*. *Biochemistry* **42**: 12835-12843.
- Kidwai, M., P. Sapra & K. R. Bhushan, (1999) Synthetic strategies and medicinal properties of beta-lactams. *Curr Med Chem* **6**: 195-215.
- Kobayashi, K., S. D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K. K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai, S. Ashikaga, S. Aymerich, P. Bessieres, F. Boland, S. C. Brignell, S. Bron, K. Bunai, J. Chapuis, L. C. Christiansen, A. Danchin, M. Debarbouille, E. Dervyn, E. Deuerling, K. Devine, S. K. Devine, O. Dreesen, J. Errington, S. Fillinger, S. J. Foster, Y. Fujita, A. Galizzi, R. Gardan, C. Eschevins, T. Fukushima, K. Haga, C. R. Harwood, M. Hecker, D. Hosoya, M. F. Hullo, H. Kakeshita, D. Karamata, Y. Kasahara, F. Kawamura, K. Koga, P. Koski, R. Kuwana, D. Imamura, M. Ishimaru, S. Ishikawa, I. Ishio, D. Le Coq, A. Masson, C. Mauel, R. Meima, R. P. Mellado, A. Moir, S. Moriya, E. Nagakawa, H. Nanamiya, S. Nakai, P. Nygaard, M. Ogura, T. Ohanan, M. O'Reilly, M. O'Rourke, Z. Pragai, H. M. Pooley, G. Rapoport, J. P. Rawlins, L. A. Rivas, C. Rivolta, A. Sadaie, Y. Sadaie, M. Sarvas, T. Sato, H. H. Saxild, E. Scanlan, W. Schumann, J. F. Seegers, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, M. Simon, P. Stragier, R. Studer, H. Takamatsu, T. Tanaka, M. Takeuchi, H. B. Thomaidis, V. Vagner, J. M. van Dijk, K. Watabe, A. Wipat, H. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Yamamoto, K. Yamane, K. Yata, K. Yoshida, H. Yoshikawa, U. Zuber & N. Ogasawara, (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678-4683.
- Lamotte-Brasseur, J., G. Dive, O. Dideberg, P. Charlier, J. M. Frère & J. M. Ghuyssen, (1991) Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem J* **279 ( Pt 1)**: 213-221.
- Le Moual, H., B. P. Roques, P. Crine & G. Boileau, (1993) Substitution of potential metal-coordinating amino acid residues in the zinc-binding site of endopeptidase-24.11. *FEBS Lett* **324**: 196-200.
- Lenzini, V. M., J. Magdalena, C. Fraipont, B. Joris, A. Matagne & J. Dusart, (1992) Induction of a *Streptomyces cacaoi* beta-lactamase gene cloned in *S. lividans*. *Mol Gen Genet* **235**: 41-48.
- Lim, D. & N. C. Strynadka, (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* **9**: 870-876.
- Lindberg, F., S. Lindquist & S. Normark, (1987) Inactivation of the ampD gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* beta-lactamase. *J Bacteriol* **169**: 1923-1928.

- Lindquist, S., M. Galleni, F. Lindberg & S. Normark, (1989a) Signalling proteins in enterobacterial AmpC beta-lactamase regulation. *Mol Microbiol* **3**: 1091-1102.
- Lindquist, S., F. Lindberg & S. Normark, (1989b) Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC beta-lactamase gene. *J Bacteriol* **171**: 3746-3753.
- Lodge, J., S. Busby & L. Piddock, (1993) Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa* ampR gene and its role at the chromosomal ampC beta-lactamase promoter. *FEMS Microbiol Lett* **111**: 315-320.
- Magdalena, J., C. Gerard, B. Joris, M. Forsman & J. Dusart, (1997) The two beta-lactamase genes of *Streptomyces cacaoi*, blaL and blaU, are under the control of the same regulatory system. *Mol Gen Genet* **255**: 187-193.
- Magdalena, J., B. Joris, J. Van Beeumen, R. Brasseur & J. Dusart, (1995) Regulation of the beta-lactamase BlaL of *Streptomyces cacaoi*: the product of the blaB regulatory gene is an internal membrane-bound protein. *Biochem J* **311 ( Pt 1)**: 155-160.
- Massova, I. & S. Mobashery, (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1-17.
- Matagne, A., A. Dubus, M. Galleni & J. M. Frère, (1999) The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat Prod Rep* **16**: 1-19.
- McKinney, T. K., V. K. Sharma, W. A. Craig & G. L. Archer, (2001) Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (mecA) is corepressed but not coinduced by cognate mecA and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol* **183**: 6862-6868.
- Melckebeke, H. V., C. Vreuls, P. Gans, P. Filée, G. Llabres, B. Joris & J. P. Simorre, (2003) Solution structural study of BlaI: implications for the repression of genes involved in beta-lactam antibiotic resistance. *J Mol Biol* **333**: 711-720.
- Mohammadi, T., V. van Dam, R. Sijbrandi, T. Vernet, A. Zapun, A. Bouhss, M. Diepeveen-de Bruin, M. Nguyen-Disteche, B. de Kruijff & E. Breukink, (2011) Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* **30**: 1425-1432.
- Niumsup, P., A. M. Simm, K. Nurmahomed, T. R. Walsh, P. M. Bennett & M. B. Avison, (2003) Genetic linkage of the penicillinase gene, amp, and blrAB, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1351-1358.
- Okazaki, A. & M. B. Avison, (2008) Induction of L1 and L2 beta-lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1525-1528.
- Park, J. T., D. Raychaudhuri, H. Li, S. Normark & D. Mengin-Lecreulx, (1998) MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. *J Bacteriol* **180**: 1215-1223.
- Park, J. T. & T. Uehara, (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 211-227, table of contents.

- Pearce, S. R., M. L. Mimmack, M. P. Gallagher, U. Gileadi, S. C. Hyde & C. F. Higgins, (1992) Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **6**: 47-57.
- Pennartz, A., C. Genereux, C. Parquet, D. Mengin-Lecreux & B. Joris, (2009) Substrate-induced inactivation of the *Escherichia coli* AmiD N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase highlights a new strategy to inhibit this class of enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2991-2997.
- Prescott, L. M., H. J. P., Klein D. A. (1995). *Microbiologie*. Bruxelles.
- Raskin, C., C. Gerard, S. Donfut, E. Giannotta, G. Van Driessche, J. Van Beeumen & J. Dusart, (2003) BlaB, a protein involved in the regulation of *Streptomyces cacaoi* beta-lactamases, is a penicillin-binding protein. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1460-1469.
- Rohrer, S. & B. Berger-Bachi, (2003) FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 837-846.
- Rowland, S. J. & K. G. Dyke, (1990) Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **4**: 961-975.
- Sala, C., A. Haouz, F. A. Saul, I. Miras, I. Rosenkrands, P. M. Alzari & S. T. Cole, (2009) Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **71**: 1102-1116.
- Safo, M. K., Q. Zhao, T. P. Ko, F. N. Musayev, H. Robinson, N. Scarsdale, A. H. Wang & G. L. Archer, (2005) Crystal structures of the BlaI repressor from *Staphylococcus aureus* and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the bla and mec operons. *J Bacteriol* **187**: 1833-1844.
- Salerno, A. J. & J. O. Lampen, (1988) Differential transcription of the bla regulatory region during induction of beta-lactamase in *Bacillus licheniformis*. *FEBS Lett* **227**: 61-65.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, *et al.* (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sauvage, E., F. Kerff, E. Fonze, R. Herman, B. Schoot, J. P. Marquette, Y. Taburet, D. Prevost, J. Dumas, G. Leonard, P. Stefanic, J. Coyette & P. Charlier, (2002) The 2.4-A crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1223-1232.
- Sauvage, E., F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala & P. Charlier, (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 234-258.
- Schmidt, D. M., B. K. Hubbard & J. A. Gerlt, (2001) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: functional assignment of unknown proteins in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* as L-Ala-D/L-Glu epimerases. *Biochemistry* **40**: 15707-15715.
- Shah, I. M. & J. Dworkin, (2010) Induction and regulation of a secreted peptidoglycan hydrolase by a membrane Ser/Thr kinase that detects muropeptides. *Mol Microbiol* **75**: 1232-1243.

- Sherratt, D. J. & J. F. Collins, (1973) Analysis by transformation of the penicillinase system in *Bacillus licheniformis*. *J Gen Microbiol* **76**: 217-230.
- Stapleton, P. D. & P. W. Taylor, (2002) Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* **85**: 57-72.
- Taylor, A. E., J. A. Ayala, P. Niumsup, K. Westphal, J. A. Baker, L. Zhang, T. R. Walsh, B. Wiedemann, P. M. Bennett & M. B. Avison, (2010) Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology* **156**: 2327-2335.
- Templin, M. F., A. Ursinus & J. V. Holtje, (1999) A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J* **18**: 4108-4117.
- Tesch, W., C. Ryffel, A. Strassle, F. H. Kayser & B. Berger-Bachi, (1990) Evidence of a novel staphylococcal mec-encoded element (mecR) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 1703-1706.
- Trepanier, S., A. Prince & A. Huletsky, (1997) Characterization of the penA and penR genes of *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its LysR-type transcriptional regulator. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2399-2405.
- Uehara, T. & J. T. Park, (2007) An anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase with broad specificity tethered to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 5634-5641.
- Uehara, T. & J. T. Park, (2008) Growth of *Escherichia coli*: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. *J Bacteriol* **190**: 3914-3922.
- Urabe, H. & H. Ogawara, (1992) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of activator-regulator proteins for beta-lactamase in *Streptomyces cacaoi*. *J Bacteriol* **174**: 2834-2842.
- Vagner, V., E. Dervyn & S. D. Ehrlich, (1998) A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **144** ( Pt 11): 3097-3104.
- van Heijenoort, J., (1998) Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell Mol Life Sci* **54**: 300-304.
- van Heijenoort, J., (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**: 25R-36R.
- van Heijenoort, J., (2007) Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 620-635.
- van Straaten, K. E., B. W. Dijkstra, W. Vollmer & A. M. Thunnissen, (2005) Crystal structure of MltA from *Escherichia coli* reveals a unique lytic transglycosylase fold. *J Mol Biol* **352**: 1068-1080.
- Wittman, V., H. C. Lin & H. C. Wong, (1993) Functional domains of the penicillinase repressor of *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* **175**: 7383-7390.
- Wittman, V. & H. C. Wong, (1988) Regulation of the penicillinase genes of *Bacillus licheniformis*: interaction of the pen repressor with its operators. *J Bacteriol* **170**: 3206-3212.

Zhang, H. Z., C. J. Hackbarth, K. M. Chansky & H. F. Chambers, (2001) A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in *staphylococci*. *Science* **291**: 1962-1965.