

La présence de pénicilline dans le milieu extérieur induit, chez *B. licheniformis* 749I, la production de la β -lactamase BlaP. Ce mécanisme d'induction est similaire à celui de la β -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 β -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 H²¹²ExxH 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 K³⁰³R[↓]R (« ↓ » indique la liaison peptidique clivée) qui est situé dans la boucle L3 (figure 2.19). En effet, le mutant R³⁰⁴A/R³⁰⁵A 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 β -lactamase BlaP. Ainsi, le clivage est nécessaire à l'activation de la boucle L3. Nous avons également montré que le mutant H(E²¹³A)xxH, ne subit pas non plus de protéolyse et a également un phénotype non-inductible pour la β -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 β -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 R³⁰⁴A/R³⁰⁵A qui donne lieu à une légère induction de la production de la β -lactamase BlaP nous a permis de proposer une nouvelle étape dans le mécanisme de transmission du signal par BlaR1 activé. Ainsi, le récepteur BlaR-R³⁰⁴A/R³⁰⁵A 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 A³⁴⁵ et M³⁴⁶. Afin d'obtenir une protéine intacte, nous avons réalisé la mutation de ce site de clivage mais les protéines portant les mutations A³⁴⁵S ou A³⁴⁵D subissent également un clivage. Le fait de muter les résidus R³⁰⁴ et R³⁰⁵ (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 (E²¹³), 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 β -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 β -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'élution (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 γ -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 β -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- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala en L-Ala- γ -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 β -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 β -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- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala. La diminution de l'induction de la β -lactamase pour le mutant *ykfA*⁻ 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*⁻ 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 β -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*⁻. 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 β -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- γ -D-Glu-*m*-DAP (le pro-coactivateur), résultant de l'activité de *YkfA*, pour générer le dipeptide γ -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.

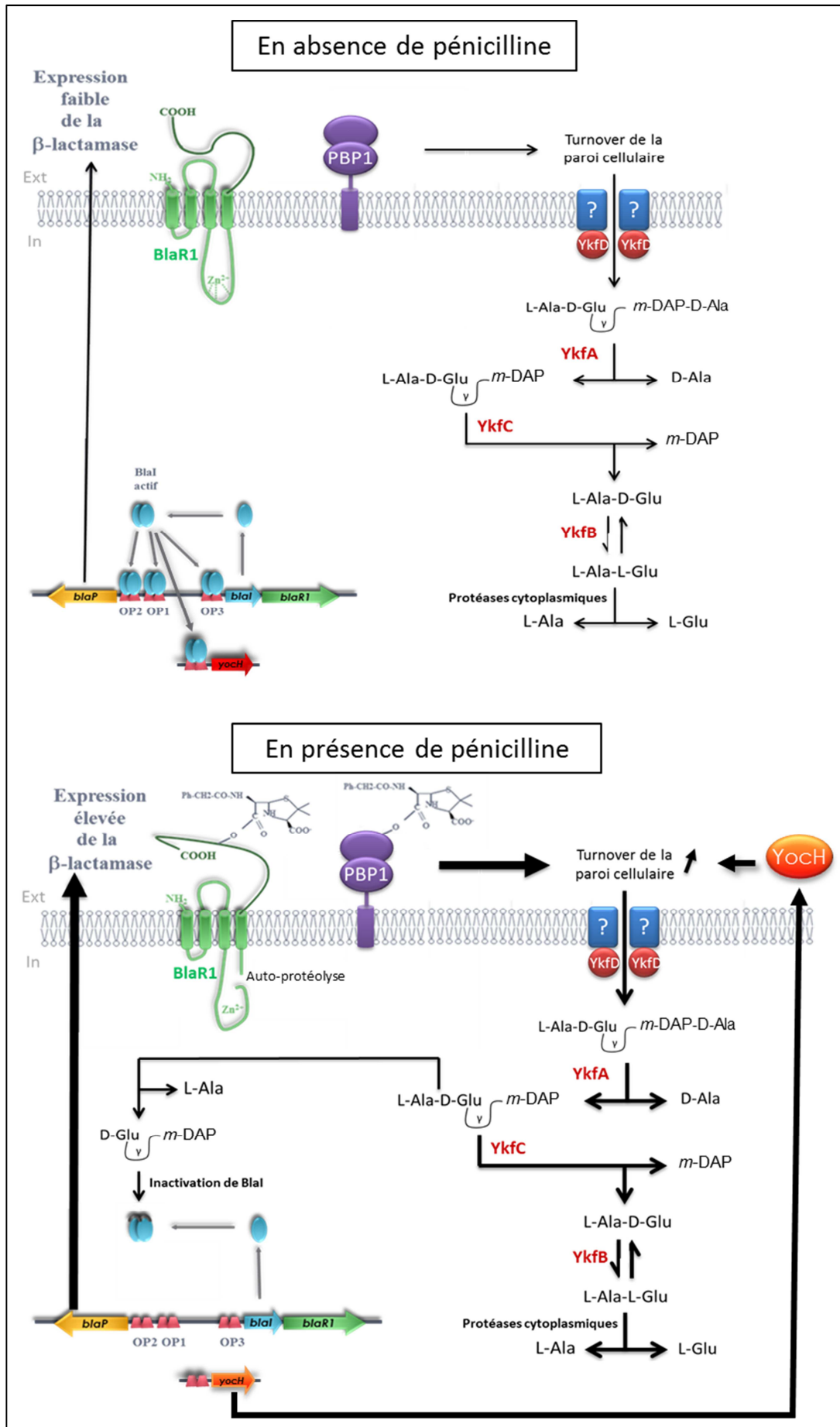


Figure 3.1. Modèle complété proposé pour l'induction de la β -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*.