

## 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 mutagenèse 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  $E^{213}A$  ( $E^{213}$  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.