

Table des matières

1. Introduction

1.1. Structure et mécanisme d'action des β-lactamines	1
1.2. Biosynthèse et remodelage du peptidoglycane	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
1.3. La résistance des bactéries aux β-lactamines	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 β -lactamases.....	13
1.3.3.2. Mécanisme catalytique des β -lactamases et PBPs	14
1.4. Mécanismes d'induction de la synthèse des β-lactamases	16
1.4.1. Induction de la synthèse de β -lactamases chez <i>Citrobacter freundii</i>	16
1.4.2. Induction de la synthèse de β -lactamases chez <i>Aeromonas</i> spp	17
1.4.3. Induction de la synthèse des β -lactamases chez <i>Streptomyces cacaoi</i>	18
1.4.4. Mécanisme d'induction de la β -lactamase chez <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus licheniformis</i>	19
1.5. Objectifs du travail	27

2. Résultats et discussions

2.1. Etude de la transmission du signal de la présence d'antibiotiques par le récepteur BlaR1	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
2.2. Production et purification de la boucle L3 de BlaR1 et du récepteur entier	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
2.3.	Etude de l'activité métalloprotéasique de la boucle L3 de BlaR1	56
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
2.4.	Recherche de BlaR2	61
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 β -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 ⁻	72
2.4.2.3.	Effet de l'inactivation du gène <i>BL01303</i> sur l'induction de la β -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⁻</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⁻</i>	90
2.4.3.6.	Discussion	92

3. Conclusion et perspectives

4. Matériel et méthodes

4.1.	Souches bactériennes	100
4.2.	Vecteurs d'expression et de clonage.....	101
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
4.3.	Milieus de culture.....	105
4.4.	Les antibiotiques	106
4.5.	Les enzymes.....	106
4.6.	Les marqueurs de taille.....	107
4.7.	Les oligonucléotides synthétiques	108
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
4.8.	Techniques de biologie moléculaire.....	111
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
4.9.	Techniques d'analyse des protéines	115
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 β -lactamasique	119
4.10.	Reconstitution de la protéine BlaRE213D dans des liposomes	120
4.11.	Test d'activité de la boucle L3 de BlaR1	121
4.12.	Préparation des membranes de <i>Bacillus</i>	121
4.13.	Analyse par gel retard ou « EMSA » (electrophoretic migration shift assay)	121
4.14.	Test d'autolyse cellulaire	122
4.15.	Préparation de peptidoglycane de <i>B. licheniformis</i> purifié	122
4.16.	Test de fixation d'une protéine sur du peptidoglycane purifié de <i>Bacillus</i>	123
4.17.	Etude de l'activité de Yoch par zymogramme	123
4.18.	Analyse par HPLC de la dégradation du peptidoglycane	123
4.19.	Outils bioinformatiques	124
4.20.	PREDetector	124

5. Références

6. Annexes