

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 β -lactame ou β -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 β -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 β -lactamines le plus répandu est la production d'une enzyme extracellulaire capable d'hydrolyser l'antibiotique et appelée β -lactamase. Chez *Bacillus licheniformis*, la présence de β -lactamines dans le milieu extérieur induit la production d'une β -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 β -lactamase. Ce mécanisme d'induction est apparenté à ceux de la β -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 β -lactamines

D'un point de vue chimique, les β -lactamines sont des antibiotiques ayant en commun la présence d'un cycle β -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 β -lactamines possèdent une action inhibitrice sur la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries. En fonction de l'hétérocycle associé au noyau β -lactame, on distingue différentes familles de β -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 β -lactame et portent un groupement sulfonate au lieu du COOH présent chez les pénicillines et les céphalosporines. Selon les β -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 β -lactame utilisés en médecine humaine.

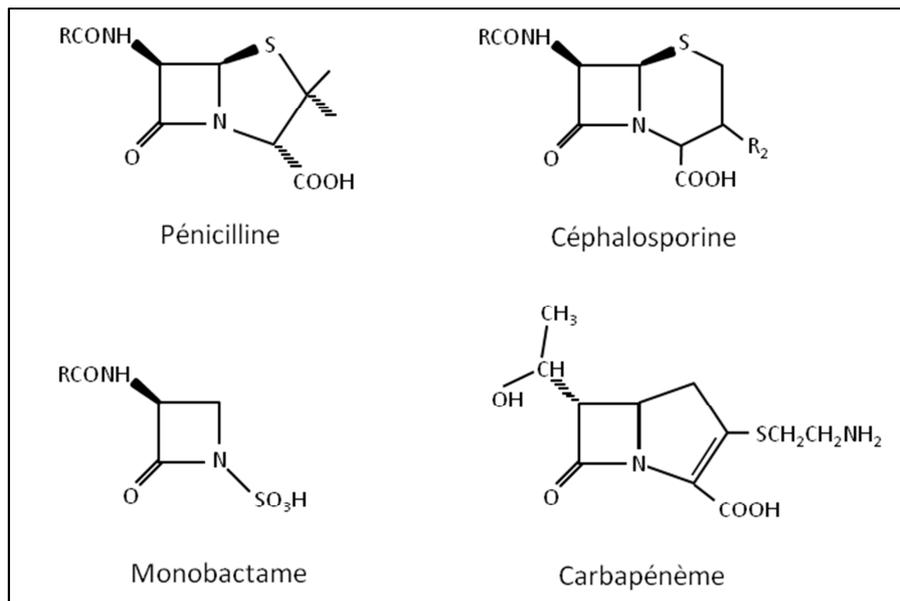


Figure 1.1. Principales familles d'antibiotiques à noyau β -lactame ou β -lactamines. R : chaîne latérale variable.

Les antibiotiques à noyau β -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 β -lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane (Ghuysen & Goffin, 1999).

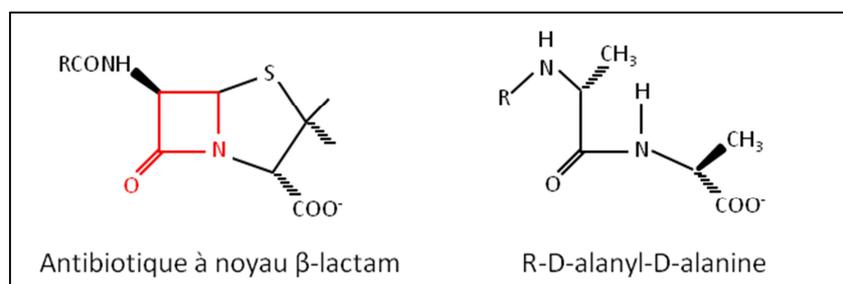


Figure 1.2. Analogie de structure entre un antibiotique à noyau β -lactame et le substrat des DD-peptidase, le peptide R-D-alanyl-D-alanine.

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).

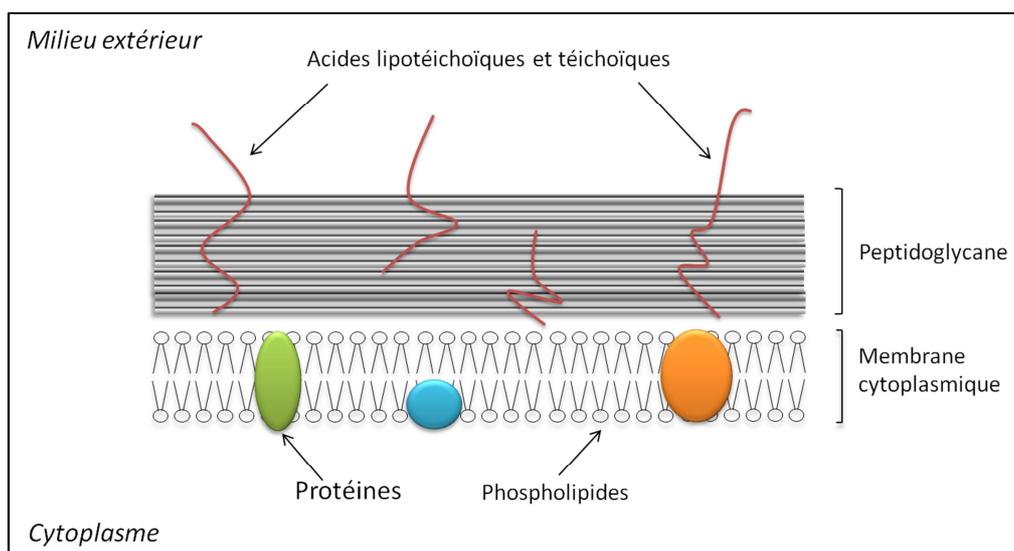


Figure 1.3. La paroi d'une bactérie à Gram positif.

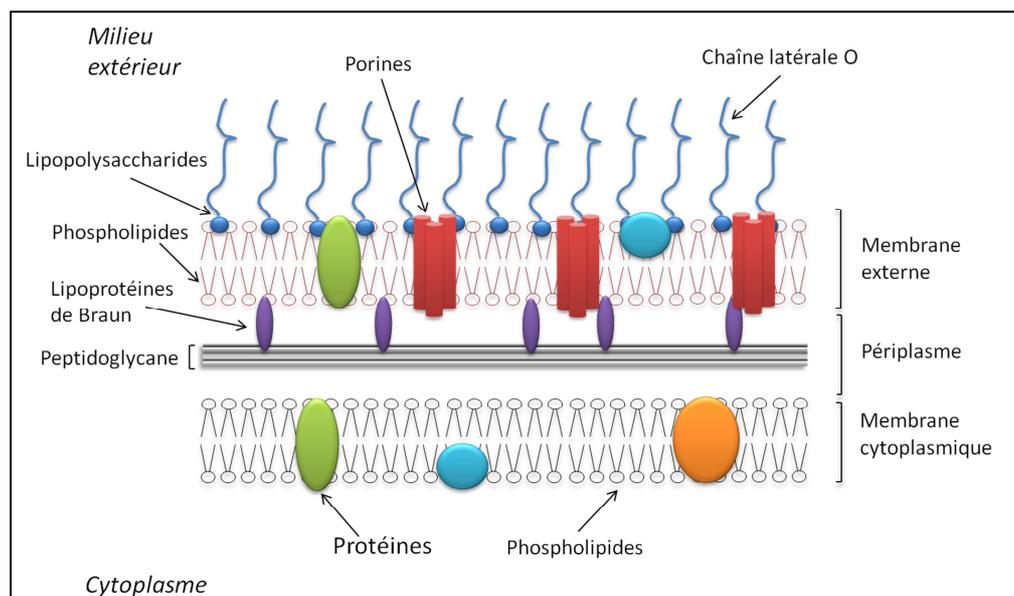


Figure 1.4. La paroi d'une bactérie à Gram négatif.

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 β -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 γ , c'est-à-dire entre le carbone γ de la chaîne latérale du D-Glu et le carbone α 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.

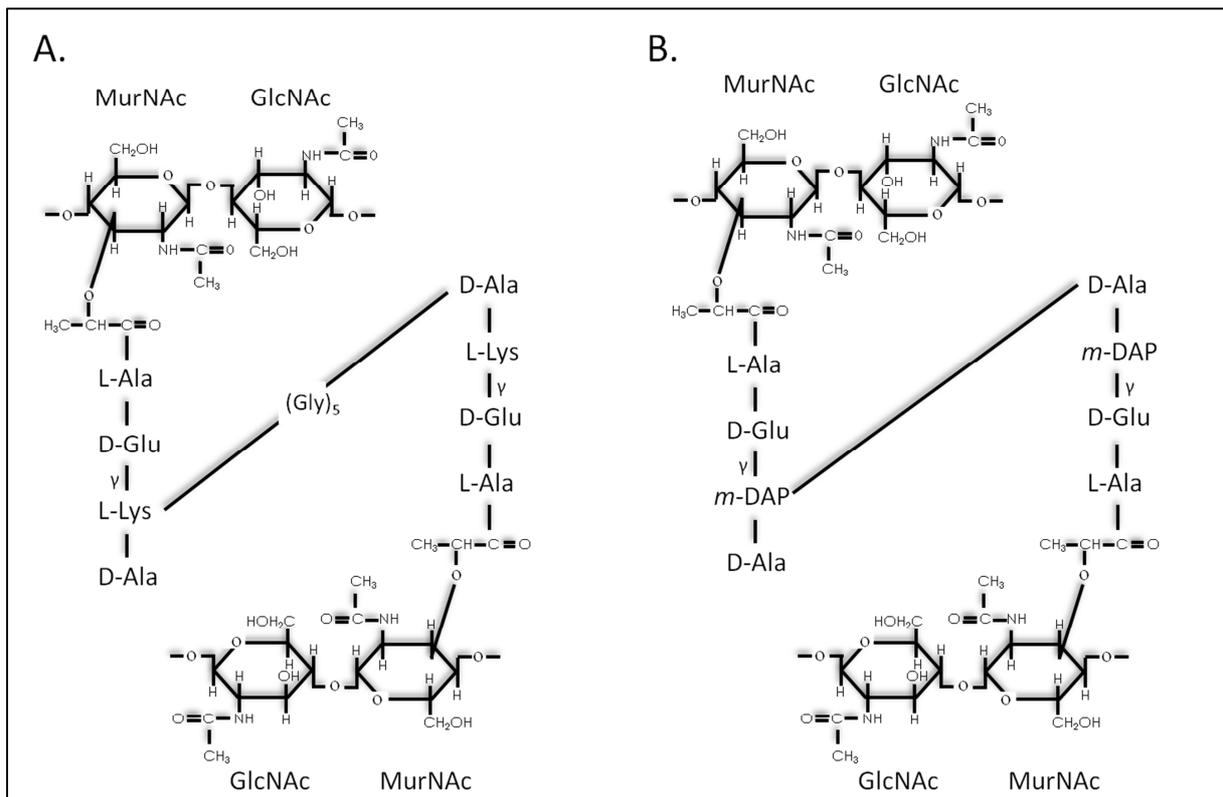


Figure 1.5. Structure du peptidoglycane chez *S. aureus* (A) et chez *E. coli* (B). La structure du peptidoglycane des bactéries du genre *Bacillus* est identique à celle d'*E. coli*. Chez *S. aureus*, un pont pentaglycine relie les deux tétrapeptides présents sur deux chaînes de glycane voisines.

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 γ du résidu D-Glu plutôt que celle localisée en α . 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.

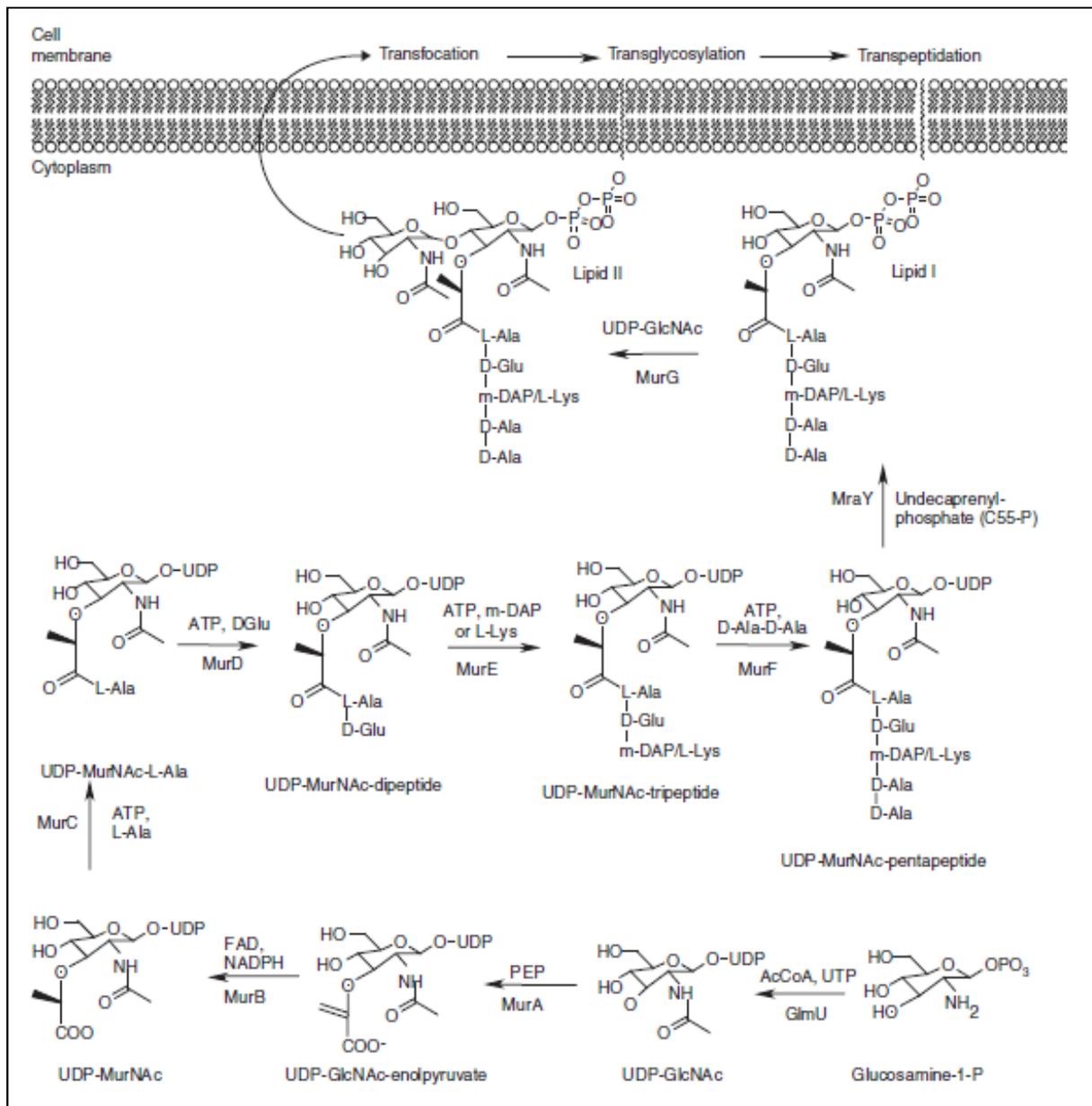


Figure 1.6. Schéma de la biosynthèse du peptidoglycane (Green, 2002). Les enzymes, substrats, produits et cofacteurs utilisés pour la biosynthèse du peptidoglycane sont décrits dans le texte.

- 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 β -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-Ala₄-D-Ala₅, libérant la fonction carboxilique du D-Ala₄. 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).

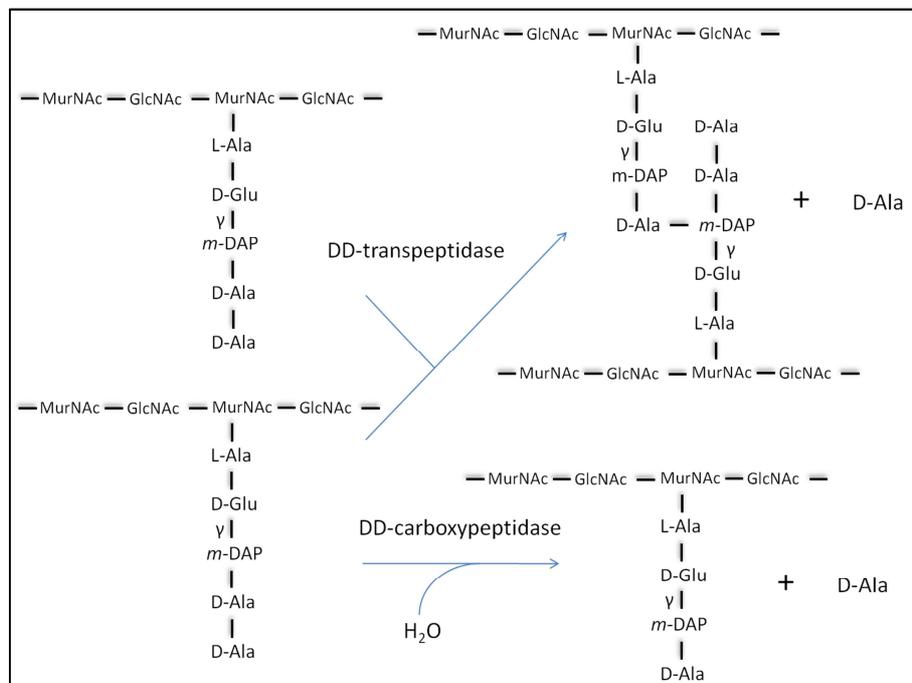


Figure 1.7. Représentation des réactions de transpeptidation et carboxypeptidation chez *E. coli*.

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 β -lactame. En effet, les β -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 périplasma. 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 périplasma.

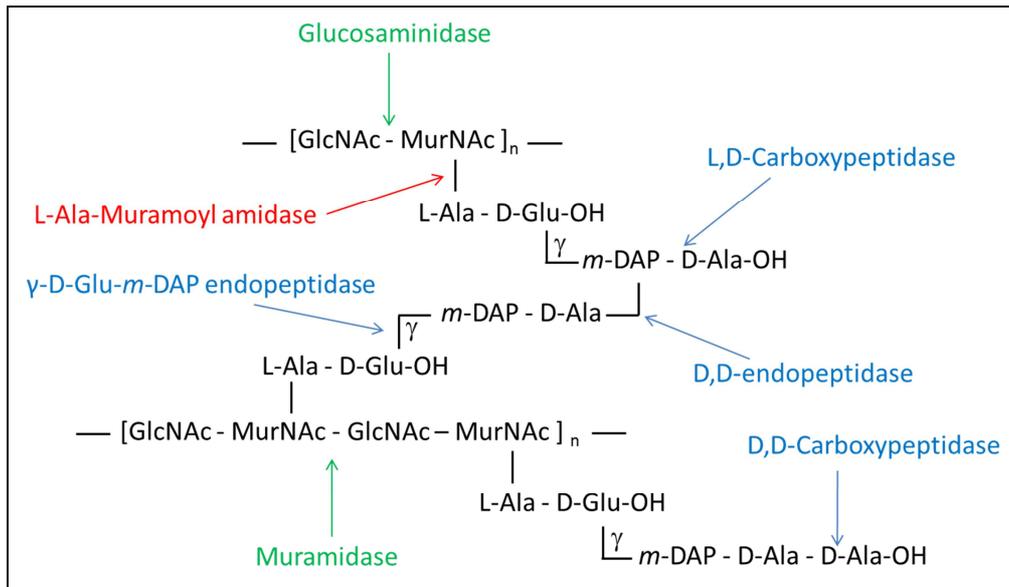


Figure 1.8. Représentation schématique des activités enzymatiques intervenant dans la dégradation du peptidoglycane. On trouve les trois grandes classes d'enzymes lytiques : les peptidases (en bleu), les amidases (en rouge) et les glucosaminidases (en vert).

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- γ -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.

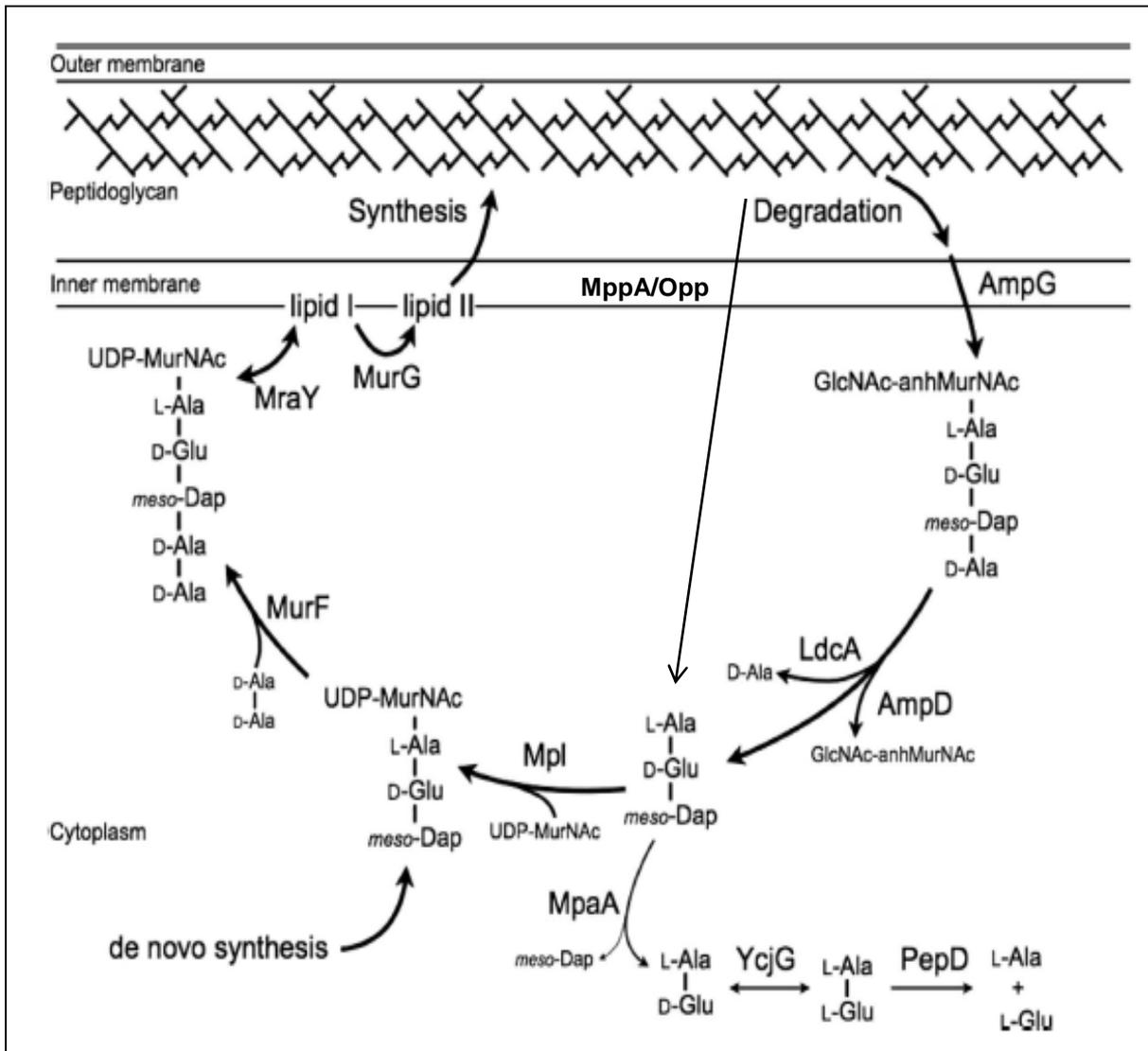


Figure 1.9. Voie de recyclage des acides aminés du peptidoglycane chez *E. coli* (Park & Uehara, 2008).

En parallèle, le disaccharide GlcNAc-anhMurNAc est également recyclé (figure 1.10). Une β -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).

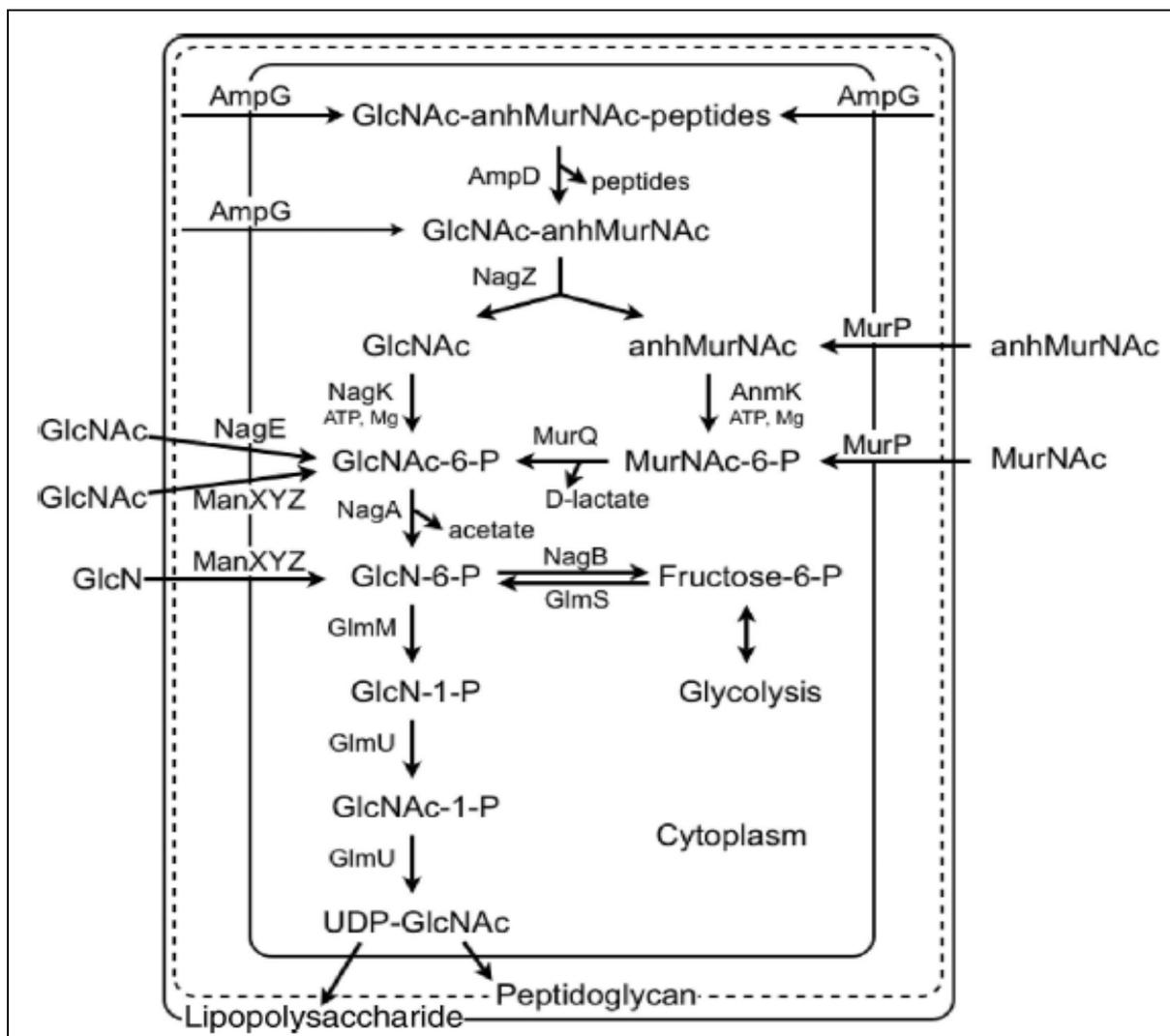


Figure 1.10. Voie de recyclage des sucres du peptidoglycane chez *E. coli* (Park & Uehara, 2008).

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 β -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 γ -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-γ-D-Glu-DAP ligase	Cytoplasme
<i>ldcA (f304 gene)</i>	<i>ykfA</i>	LD-Carboxypeptidase	Cytoplasme
<i>mpaA (ycjI)</i>	<i>yqgT</i>	γ-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>	β-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 β-lactamines

Face à l'utilisation importante d'antibiotiques à noyau β-lactame, les bactéries ont développé une série de mécanismes de résistance efficaces. Ces mécanismes peuvent intervenir individuellement mais la résistance des bactéries aux β-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 β-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 β-lactamines tout en gardant leur activité enzymatique.

Par exemple, les bactéries du genre *Enterococcus* sont naturellement résistantes aux antibiotiques à noyau β-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 β-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 β -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 β -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 β -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 β -lactamines le plus répandu, aussi bien pour les bactéries Gram-positives que les Gram-négatives, est la production de β -lactamases. Ces enzymes hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame, inactivant ainsi l'antibiotique (Figure 1.11).

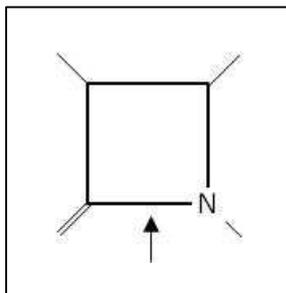


Figure 1.11. Site d'action des β -lactamases. La liaison amide clivée par les β -lactamases est indiquée par la flèche.

1.3.3.1. Structure des β -lactamases

On peut classer les β -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 β -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 β -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 β -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
β -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 β -lactamases à sérine possèdent une structure tertiaire fortement similaire. En effet, leur structure tridimensionnelle est composée d'un domaine « tout- α » 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 α du domaine « tout- α » et le troisième motif est situé sur le brin β le plus interne du feuillet antiparallèle. Les β -lactamines de classe A possèdent un quatrième motif conservé (EXELN) qui est situé sur la boucle ω reliant 2 hélices α à l'entrée du site actif (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991).

1.3.3.2. Mécanisme catalytique des β -lactamases et PBPs

Les β -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 β -lactame. Ainsi, les pénicillines inactivent les PBPs alors que les β -lactamases inactivent les pénicillines.

Les β -lactamases à sérine et les PBPs interagissent avec les β -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} s^{-1} , ce qui conduit à l'accumulation d'un acyl-enzyme stable. Par contre, pour les β -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 s^{-1} (Frère, 1995).

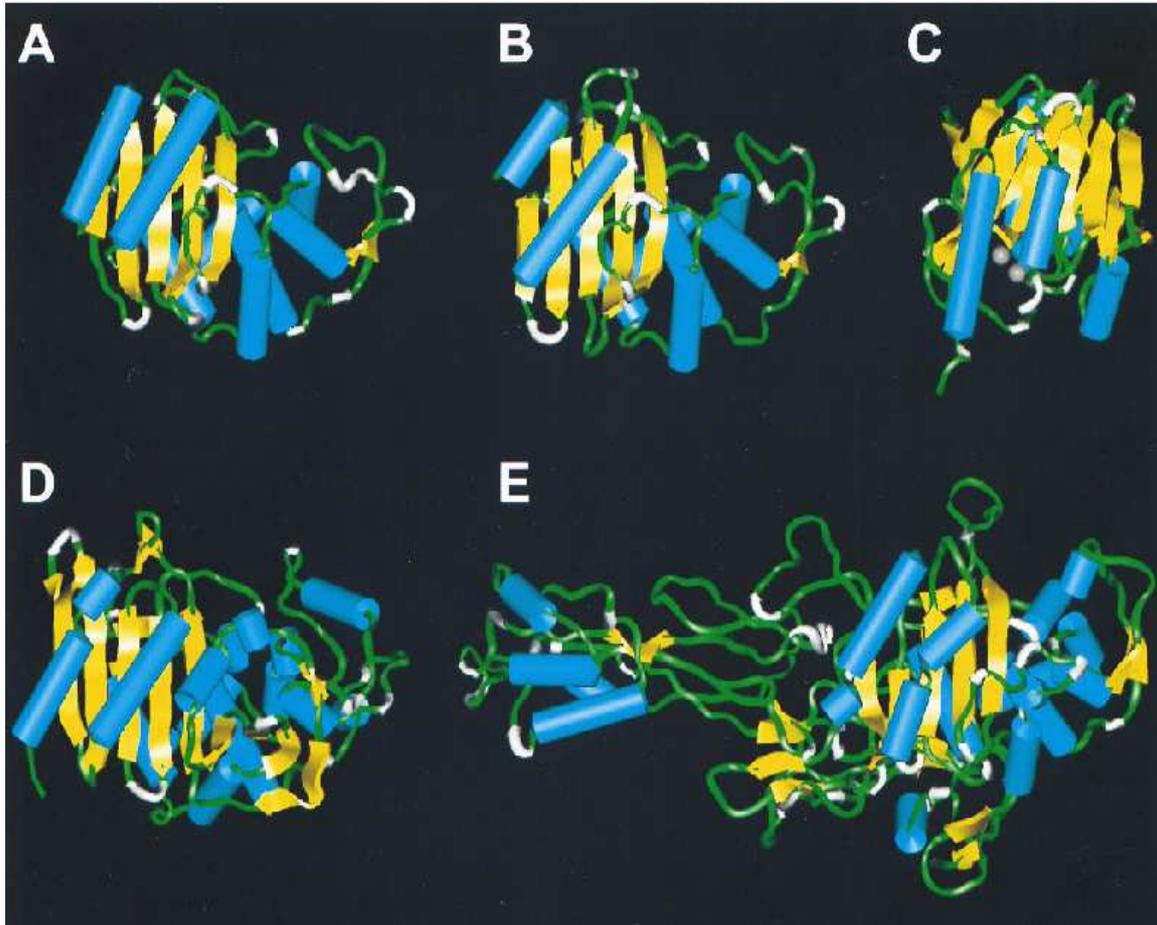


Figure 1.12. Représentation de la structure tridimensionnelle de la β -lactamase de classe A TEM-1 d'*E. coli* (A), de la β -lactamase de classe A BlaP de *B. licheniformis* 749C (B), de la β -lactamase de classe B de *B. fragilis* (C), de la β -lactamase de classe C de *E. cloacae* P99 (D) et du PBP2x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

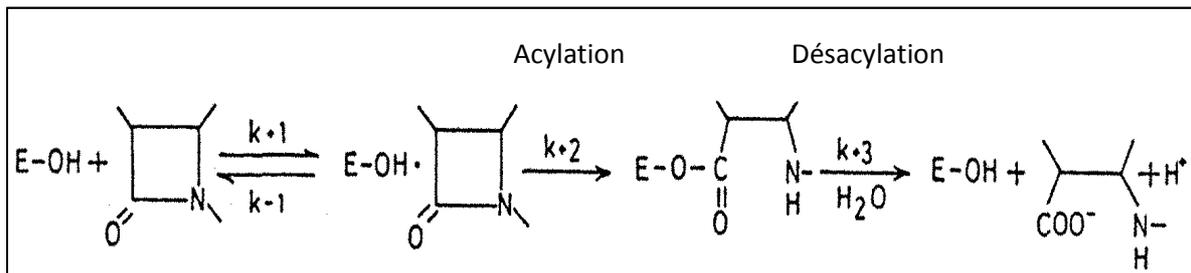


Figure 1.13. Représentation du chemin réactionnel des PBPs avec les β -lactamines. k_2/K = constante d'acylation, k_3 =constante de désacylation.

1.4. Mécanismes d'induction de la synthèse des β -lactamases

La synthèse de β -lactamases peut être soit constitutive, soit induite par la présence de β -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 β -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 β -lactamases chez *Citrobacter freundii*

Chez les bactéries Gram-négatives, le mécanisme de régulation de la production de β -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 β -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 β -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 β -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 β -lactamase AmpC (Lindberg et al., 1987).

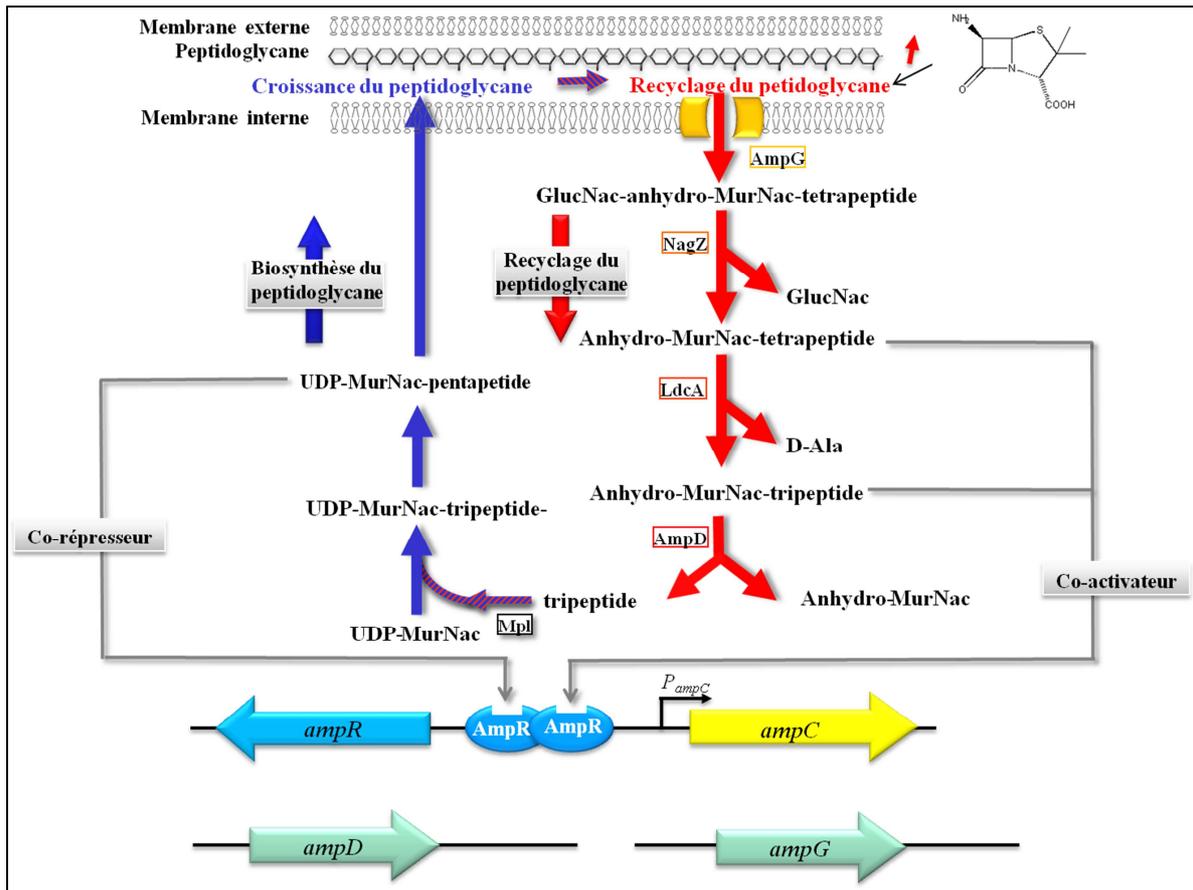


Figure 1.14. Représentation schématique de la voie de régulation de l'expression du gène *ampC* chez *C. freundii*, détaillée dans le texte.

1.4.2. Induction de la synthèse de β -lactamases chez *Aeromonas* spp

La régulation de la production de β -lactamases chez les bactéries du genre *Aeromonas* implique un autre mécanisme de régulation que le système AmpCR. En effet, ces bactéries produisent plusieurs β -lactamases inductibles grâce à un système à deux composants (TCS pour two-component system). La plupart de ces bactéries produisent trois β -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 β -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 β -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 β -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).

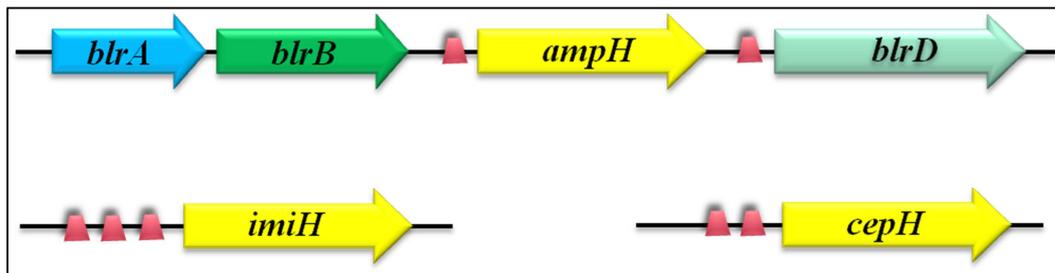


Figure 1.15. Organisation des gènes impliqués dans la régulation des β -lactamases AmpH, ImiH et CepH chez *A. hydrophila*. Les petits trapèzes rouges représentent les séquences TTCAC reconnues par le régulateur BlrA.

1.4.3. Induction de la synthèse des β -lactamases chez *Streptomyces cacaoi*

Le génome de *S. cacaoi* contient deux gènes non liés codant pour deux β -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 β -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 β -lactamases de classe A (Magdalena *et al.*, 1995).

La présence d'un antibiotique à noyau β -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 β -lactamases (Raskin *et al.*, 2003).

La production de la β -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).

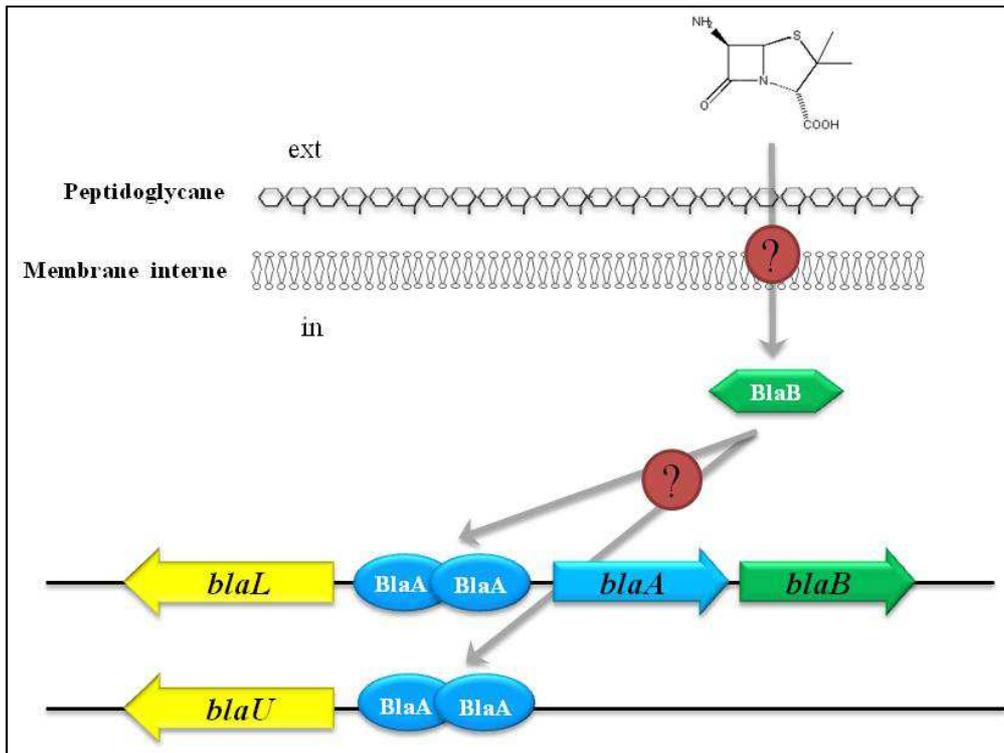


Figure 1.16. Représentation schématique de la voie de régulation des β -lactamases BlaL et BlaU chez *S. cacaoi*, détaillée dans le texte.

1.4.4. Mécanisme d'induction de la β -lactamase chez *Staphylococcus aureus* et *Bacillus licheniformis*.

Pour résister aux antibiotiques à noyau β -lactame, *S. aureus* et *B. licheniformis* peuvent produire une β -lactamase de classe A inducible, appelée respectivement BlaZ et BlaP. L'expression du gène codant pour la β -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 β -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 β -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 β -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 β -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).

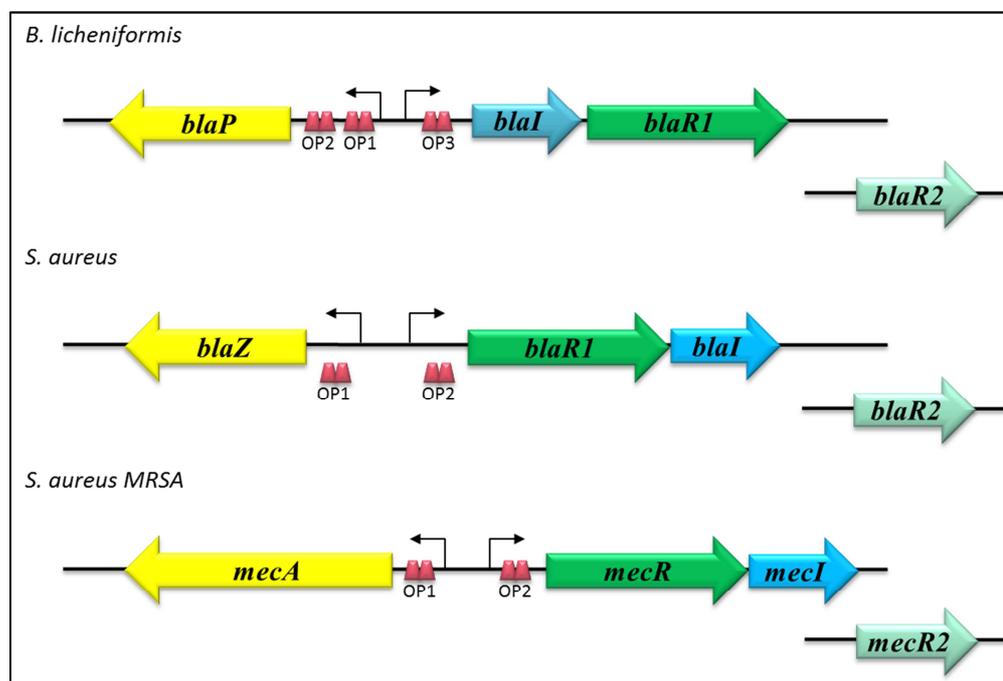


Figure 1.17. Représentation des divergeons responsables de l'induction de la β -lactamase BlaP de *B. licheniformis* et de la β -lactamase BlaZ et du PBP2a résistant de *S. aureus*.

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
Régulateur entier :	
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 %
Domaine de liaison à l'ADN (résidus 1 à 82 pour Blal de <i>B. licheniformis</i>) :	
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 %
Domaine de dimérisation (résidus 83 à 128 pour Blal de <i>B. licheniformis</i>) :	
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 %

Opérateurs de Blal de <i>B. licheniformis</i>		
	→	←
OP1	AAGTATT TACAT	ATGTAAGATTT
OP2	AAATCT TACAA	ATGTAAGTCTTT
OP3	GAGTATT TACAT	TGTAAGTATA
Consensus	aAgTa TACA t	a TGTA agNtTt

Opérateur de Blal et Mecl de <i>S. aureus</i>		
	→	←
OP1 Blal	AAAAAT TACAA	CTGTAATATCG
OP2 Blal	CGATAT TACAA	TGTAATATTA
Consensus	aaAa TTACAA	c TGTAATAT ca
OP1 Mecl	TCATA CTACAA	TGTAAGTATTA
OP2 Mecl	TAATAT TACAA	ATGTAATATGA
Consensus	TaATA CTACAA	a TGTA 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.

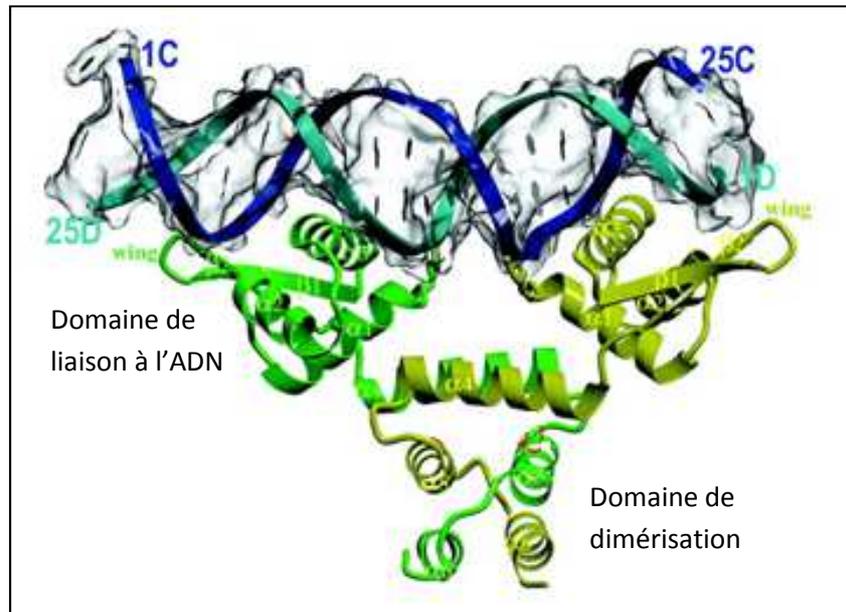


Figure 1.19. Représentation de la structure tridimensionnelle du dimère du répresseur MecI en interaction avec son opérateur (Garcia-Castellanos *et al.*, 2004). Le répresseur MecI interagit avec sa séquence opératrice via son hélice de reconnaissance $\alpha 3$, qui s'insère dans le sillon majeur de 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 β -lactamines transmembranaire de 601 acides aminés appelé BlaR1 et composé de deux domaines (Figure 1.20). Le domaine N-terminal (BlaR-NTD ; M¹-P³³⁹) comprend quatre segments transmembranaires, formant une botte de quatre hélices α , qui délimitent trois boucles : L1 (K²⁷-T³⁵) et L3 (Y¹³⁴-K³²²), cytoplasmiques, et L2 (P⁵³-S¹¹⁵), exposée à l'extérieur de la cellule (Hardt *et al.*, 1997). La boucle L3 possède un motif de liaison au zinc, H²¹²ExxH, 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 ; S³⁴⁰-R⁶⁰¹) 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.

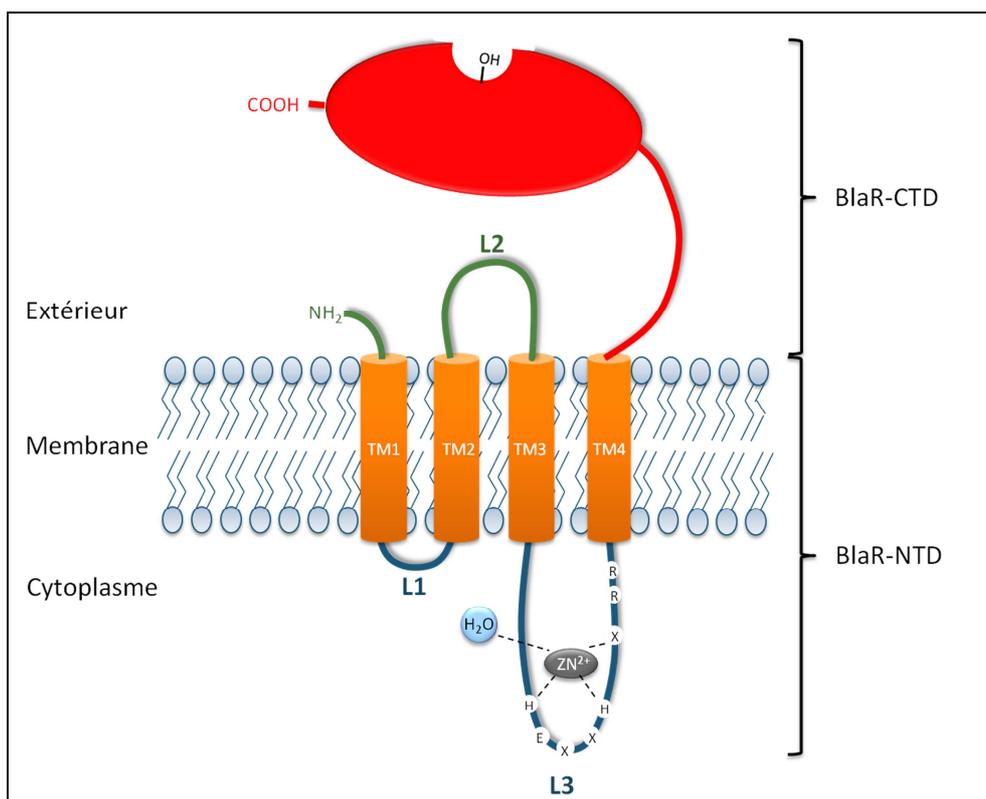


Figure 1.20. Topologie du récepteur BlaR1 de *B. licheniformis*. Ce récepteur contient 2 domaines, un extracellulaire : BlaR-CTD (en rouge) et un transmembranaire : BlaR-NTD. Ce dernier est composé de 4 segments transmembranaires (en orange) : TM1 à 4, qui délimitent 3 boucles. La boucle L2 est exposée à l'extérieur de la cellule (en vert) et les boucles L1 et L3 sont cytoplasmiques (en bleu). La boucle L3 contient le motif H²¹²EXXH 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
Récepteur entier :	
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 %
Domaine NTD (Résidus 1 à 339 de BlaR1 de <i>B. licheniformis</i>):	
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 %
Domaine CTD (Résidus 340 à 601 de BlaR1 de <i>B. licheniformis</i>):	
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 β -lactamase de classe D OXA-2 de *Salmonella typhimurium*. Sa structure tridimensionnelle a été résolue et présente une forte similarité avec celle des β -lactamases à sérine (figure 1.21). Elle comporte un domaine « tout- α » et un domaine « $\alpha\beta$ ». La poche catalytique se situe entre ces deux domaines. Une longue boucle, nommée Ω , délimite le dessous du site catalytique et contient un résidu W488, caractéristique des β -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 β -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 β -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 β -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*.

Pour obtenir l'induction de la β -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 β -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 N¹⁰¹ et F¹⁰² (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 γ -D-Glu- *m*-DAP et γ -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- γ -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).

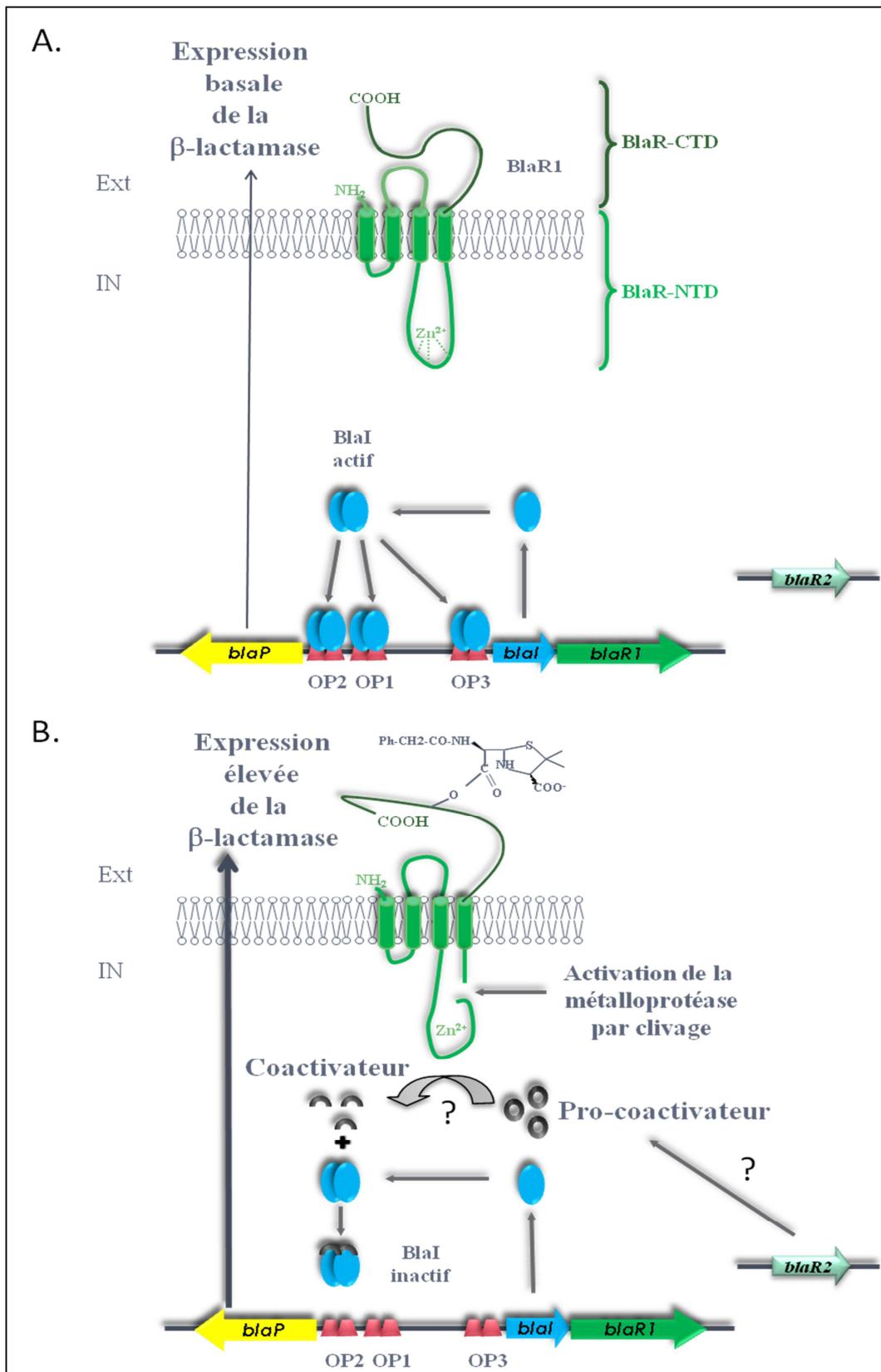


Figure 1.22 : Représentation schématique de la voie de production de la β -lactamase BlaP chez *B. licheniformis*, comme décrite dans la littérature avant le début de ce travail. A : situation en absence d'antibiotique ; B : situation lorsqu'un antibiotique à noyau β -lactame est présent dans le milieu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

1.5. Objectifs du travail

Le récepteur BlaR1 de *B. licheniformis* joue un rôle central dans l'induction de la β -lactamase BlaP de *B. licheniformis*. En effet, une fois acylé par un antibiotique à noyau β -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 β -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 mutagenèse 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 γ -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 β -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.