



HAL
open science

L'absence d'une protéine impliquée dans le maintien de la polarité chez la bactérie Gram-négatif *Caulobacter crescentus* induit une sensibilité à la vancomycine

Simon-Ulysse Robert Vallet

► **To cite this version:**

Simon-Ulysse Robert Vallet. L'absence d'une protéine impliquée dans le maintien de la polarité chez la bactérie Gram-négatif *Caulobacter crescentus* induit une sensibilité à la vancomycine. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02285424

HAL Id: dumas-02285424

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02285424v1>

Submitted on 19 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Année : 2018/2019

L'absence d'une protéine impliquée dans le maintien de la polarité chez la bactérie Gram-négatif Caulobacter crescentus induit une sensibilité à la vancomycine

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN
PHARMACIE DIPLÔME D'ÉTAT

Simon-Ulysse, Robert VALLET

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 26/07/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Monsieur Aziz Bakri

Directeur de thèse :

Madame Claire Durmort

Membres :

Monsieur Michael Mourez

Monsieur Théophile Michel

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Liste actualisée des enseignants

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2018 - 2019

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	TELEPHONE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	04 76 63 74 73
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	04 76 76 54 96
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	04 56 52 00 92.
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	04 76 63 58 20 / 06 75 55 35 01
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	04 76 76 54 97
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	04 76 63 71 08
MAST	BELLET	BEATRICE	-	
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 12
DCE	BOULADE	MARINE	SyMMES	
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 11 / 06 17 35 77 65
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823	
DCE	BOUVET	RAPHAEL	HP2 – INSERM U1042	
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA	04 38 78 56 01 / 04 76 63 74 73 / 06 37 51 20 74
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	04 76 63 74 75
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	06 32 39 37 65
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 76 63 74 72 / 06 88 16 54 43
AHU	CHANOINE	SEBASTIEN	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309, Equipe d'épidémiologie environnementale	04 76 76 54 97 (CHU) / 04 76 54 94 66 (IAB)
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 01
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS	
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	
DCE	COUCHET	MORGANE	LBFA – INSERM U1055	
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-	06 74 88 07 26
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 17

Mise à jour le 31/08/2018

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	TELEPHONE
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	06 80 23 45 34
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 76 63 71 38
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	04 76 76 72 01
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	06 15 11 79 97
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	04 57 42 85 19
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042	
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	04 76 76 71 66
PRCE	FITE	ANDREE	-	06 33 79 01 95
AHU	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	04 76 76 54 90
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-	
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	04 76 76 56 04
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 01
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 74 58 / 06 33 12 90 73
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	04 76 63 75 63 / 06 33 48 97 10
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-	06 62 11 37 04
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS	
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	04 76 76 78 86
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	06 30 36 62 56 / 04 76 63 57 36
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 75 17
DCE	LE	CONG ANH KHANH	CERMAV	
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 56 52 00 95
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 00
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	
AHU	MINOVES	MELANIE	-	
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	04 76 51 44 90
DCE	MONTEMAGNO	CHRISTOPHER	LRB- INSERM U1039	
DCE	MOULIN	SOPHIE	HP2 – INSERM U1042	
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	04 76 76 54 87
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS	
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 21
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 97

Mise à jour le 31/08/2018

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	TELEPHONE
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS	07 86 11 77 53 /04 76 63 53 13
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 95
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 04
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, THEMAS	04 76 76 79 54
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA	
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS	06 85 92 00 79
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	06 71 11 49 20
PAST	RIEU	ISABELLE	-	
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055	
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 94
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	04 57 42 85 64
DCE	TAHER	RALEB	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	04 57 42 86 60
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 94
DCE	VERNET	CELINE	Université de Berkley	+1 510 679 4220
DCE	VRAGNIAU	CHARLES	UVHCI	
PU	WOUESSIDDJEWE	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 02

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institute for Advanced Biosciences
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCF : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
 PU : Professeur des Universités
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
 SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 31/08/2018

Remerciements

A Monsieur le Professeur Aziz Bakri, pour avoir accepté la présidence de mon jury de thèse. Mes sincères remerciements.

Au Docteur Claire Durmort, vous m'avez fait l'honneur d'accepter la direction cette thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre écoute et votre patience. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Au Docteur Michael Mourez, pour avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

Au Lord Théophile Michel, pour avoir accepté de juger mon travail. Puisses-tu trouver dans cette thèse mon profond respect et mon amitié sincère.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu. Merci pour tous vos sacrifices, votre générosité, votre patience, votre amour. Vous êtes les parents les plus cools du monde. Je vous aime.

A mes frères et ma sœur, Louise, Victor, Adrien, Marin et Baba. Merci d'avoir entretenu la déconne, notre force. Je vous aime.

A Typhaine, pour sa patience, ses relectures. Merci pour les fous rires, les bons moments passés et à venir. J'ai la chance de commencer chaque journée avec toi. Je t'aime.

A Alexandre, mon Dieu, mon amour. Je suis très honoré d'avoir fait ta connaissance durant ces études et je sais que cette amitié durera éternellement.

A Parmi, Théo, Coco, Polak, Nico, Topsent, Coppo, Clément, Bibar, Magui, Popo, Remi, Duke... Sans vous ces années n'auraient pas eu la même saveur. Merci d'avoir partagé toutes ces soirées de zinzins avec moi.

A Merguez, Couscous, Tarm, Déci, Danger, Fat Chuck, Bavo, Adri, Baz, Chaton pour les faits d'armes à peine croyables de nos soirées et votre soutien depuis le début.

A tous les copains que je vais retrouver à l'Oasis pour boire un maximum de bières et aussi ceux qui n'auront pas pu faire le déplacement.

A toute l'équipe du Professeur Patrick Viollier et Clare Kirkpatrick de m'avoir accueilli pour mon stage de 6ème année, de m'avoir transmis vos connaissances, votre rigueur ainsi que votre bonne humeur.

Table des Matières

Remerciements	6
Table des Matières	9
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations	16
I. INTRODUCTION	20
I. LES BACTERIES ET LES ANTIBIOTIQUES.....	21
I. <i>La vancomycine</i>	23
a) Structure et synthèse	23
b) Mécanisme d'action	23
c) Cibles bactériologiques	24
d) Utilisation thérapeutique et toxicité	24
II. <i>L'acide nalidixique</i>	26
a) Structure	26
b) Mécanisme d'action	26
c) Cibles bactériologiques	26
d) Utilisation thérapeutique	26
II. L'ANTIBIORESISTANCE	27
I. <i>Principes généraux</i>	27
II. <i>Expulsion de l'antibiotique</i>	28
III. <i>Modification de la cible, cas de la vancomycine</i>	28
IV. <i>Modification de la cible, cas de l'acide nalidixique</i>	29
III. CAULOBACTER CRESCENTUS	30
I. <i>Transporteurs couplés à la protéine TonB (TBDTs)</i>	30
II. <i>Cycle cellulaire</i>	30
III. <i>Sensibilité et pompe</i>	31
II. RESULTATS.....	33
I. TESTS ANTIBIOTIQUES	34
I. <i>Vancomycine</i>	34
II. <i>Vancomycine et acide nalidixique</i>	35
III. <i>Test sur pastilles d'antibiotiques</i>	35
II. ROLE DE LA POMPE	38
I. <i>Activité des promoteurs des gène <i>acrA</i> et <i>tipR</i></i>	38
II. <i>Effet non spécifique de l'acide nalidixique</i>	39
III. <i>Surexpression de la pompe à efflux, $\Delta tipR$</i>	40
III. MUTAGÉNÈSE	41
I. <i>Mutagénèse par insertion de transposon</i>	41
II. <i>Transduction</i>	44
III. <i>Génération de mutants spontanés</i>	46
IV. TEST DE MOBILITE, FACS ET IMAGERIE.....	49
I. <i>Mobilité</i>	49
II. <i>Phénotype</i>	49
III. <i>Analyse du stade du cycle cellulaire</i>	50
III. DISCUSSION	52
IV. CONCLUSIONS	56
V. PERSPECTIVES	58
VI. MATERIELS ET METHODES	60
I. SOUCHES BACTERIENNES, SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES, MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	61
I. <i>Souches bactériennes</i>	61
II. <i>Culture bactérienne et antibiotiques</i>	62
II. TESTS DE CROISSANCE	62
I. <i>Test de croissance en milieu liquide</i>	62
II. <i>Test de croissance en milieu solide</i>	62

III.	<i>Test de mobilité</i>	63
III.	TEST A LA BETA-GALACTOSIDASE	63
I.	<i>Solutions utilisées pour le test enzymatique</i>	63
II.	<i>Protocole du test enzymatique</i>	63
IV.	MUTAGENÈSE ET TRANSDUCTION	64
I.	<i>Mutagenèse par transposon et localisation du transposon par PCR à amorces dégénérées</i>	64
II.	<i>Génération de mutants spontanés</i>	65
III.	<i>Transduction</i>	66
V.	EXTRACTION D'ADN.....	67
VI.	PRÉPARATION POUR MICROSCOPE.....	67
VII.	CYTOMETRIE EN FLUX	68
I.	<i>Solutions</i>	68
II.	<i>Préparation pour fixer les cellules</i>	68
III.	<i>Traitement des cellules fixées</i>	68
VII.	BIBLIOGRAPHIE	69

Liste des figures

<u>Figure n°1 : Comparaison membranaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif</u>	21
<u>Figure n°2 : Acide nalidixique, vancomycine et son mécanisme d'action</u>	24
<u>Figure n°3 : Comparaison chronologique de l'introduction des antibiotiques et de l'apparition des résistances associées [13].</u>	26
<u>Figure n°4 : Représentation schématique des transporteurs transmembranaires [18], [19]</u> .	28
<u>Figure n°5 : Cycle cellulaire de <i>Caulobacter crescentus</i></u>	30
<u>Figure n°6 : Test de résistance à la vancomycine</u>	33
<u>Figure n°7 : Test antibiotiques en disque</u>	35
<u>Figure n°8 : Test à la β-galactosidase</u>	36
<u>Figure n°9: Test de la surexpression de la pompe à efflux</u>	38
<u>Figure n°10 : Surexpression de la pompe sur boîte de Petri</u>	39
<u>Figure n°11 : Transposon insertion</u>	42
<u>Figure n°12 : Test de résistance des transposons</u>	44
<u>Figure n°13 : Cytométrie, microscopie et test de mobilité</u>	49

Liste des tableaux

<u>Tableau I : Insertions des transposons</u>	40
<u>Tableau II : Mutations des souches SVRM.</u>	45
<u>Tableau III : Souches utilisées pour l'étude</u>	59
<u>Tableau IV : Amorces utilisées pour la PCR à amorces dégénérées</u>	63

Abréviations officielles

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARB PCR	Arbitrary PCR
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DHADH	Acide dihydroxique déhydratase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
IV	Intraveineux
LB	Lysogeny Broth
MDR	Multi Drug Resistant
ME	Membrane Externe
MI	Membrane Interne
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAL	Acide Nalidixique
NAM	acide N-acétyl-muramique
NCR	Non Coding Region
ONPG	o- nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Protéine Hypothétique
PHC	Protéine Hypothétique Conservée
PYE	Peptone Yeast Extract
RND	Resistance Nodulation Division
SI	Séquence d'Insertion
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNVRM	Spontaneous Nalidixic acid Vancomycin Resistant Mutant
ST	Stalked Cell
SVRM	Spontaneous Vancomycin Resistant Mutant
SW	Swarmer Cell
TBDT	TonB Dependent Transporteur
VANCO	Vancomycine
VAN-FL	Vancomycine Fluorescent
WT	Wild Type

*« C'est la pénicilline qui guérit les hommes,
mais c'est le bon vin qui les rend heureux. »*

Alexander Fleming

I. Introduction

I. Les bactéries et les antibiotiques

Les bactéries sont apparues sur la Terre il y a environ 4 milliards d'années. Ces organismes généralement unicellulaires sont dépourvus de noyau. Leur matériel génétique baigne dans le cytoplasme qui est protégé par l'enveloppe cellulaire. En dépit de cette apparente simplicité elles ont su se développer dans les différents biotopes terrestres grâce à une extraordinaire capacité d'adaptation. Elles ont acquis des fonctions leur permettant de proliférer dans des milieux très différents, parfois extrêmes.

Ces organismes microscopiques jouent un rôle déterminant dans le maintien de la vie sur Terre. Elles sont capables, via des réactions enzymatiques, de synthétiser des vitamines, comme la vitamine B₁₂, indispensables à la vie pour la majorité des animaux y compris les humains [1]. Outre la synthèse de vitamines, les relations entre l'Homme et les bactéries sont très complexes. Elles colonisent notre peau, notre système digestif, nos muqueuses ainsi que nos poumons et contribuent au bon fonctionnement de ces organes. Par exemple, les bactéries digestives synthétisent des composés essentiels à la coagulation sanguine, stimulent l'immunité et limitent la prolifération de bactéries pathogènes [2].

Néanmoins, lorsque cet équilibre est rompu, nous perdons l'effet bénéfique de cette symbiose et nous pouvons observer l'apparition d'infections tel que des infections cutanées ou des infections pulmonaires. En médecine humaine, lors de l'identification des germes responsables d'infections nous utilisons classiquement une méthode de coloration pour classifier les bactéries. Cette technique est la coloration de Gram et permet de différencier les bactéries Gram négatives avec une membrane externe, des bactéries Gram positives n'ayant pas cette membrane supplémentaire (figure n°1), et ainsi d'orienter le traitement [3]. Pour traiter ces infections bactériennes nous utilisons en première intention des antibiotiques.

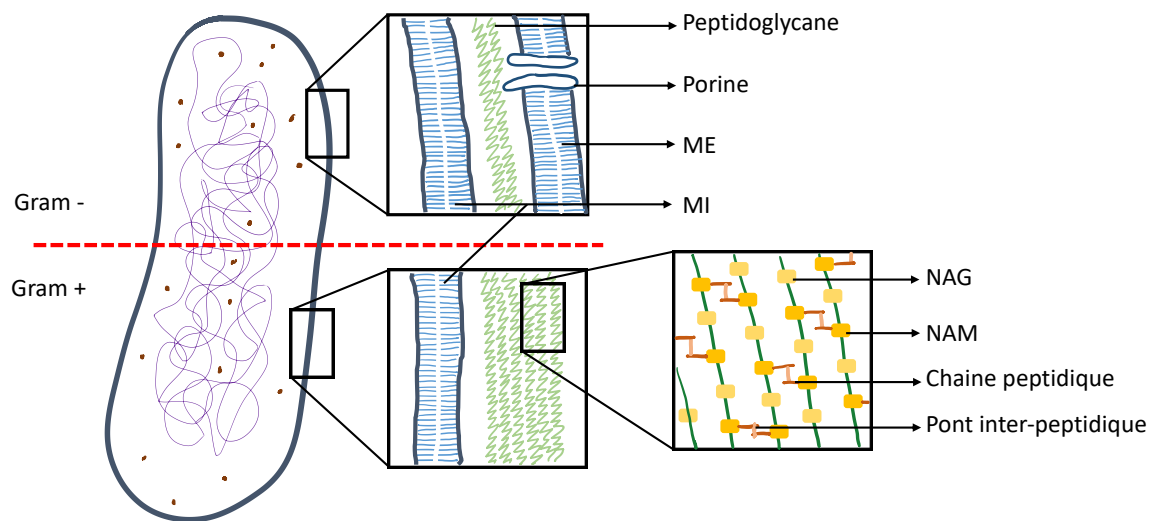


Figure n°1 : Comparaison membranaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Partie supérieure, représentation de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif avec la membrane interne (MI) et la membrane externe (ME), dans laquelle s'intègrent des porines en bleu. Le peptidoglycane est entre les MI et ME, en vert. Partie inférieure, représentation de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif avec la MI et un peptidoglycane plus large que chez les bactéries à Gram négatif. Zoom sur le peptidoglycane avec le N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique en jaune, reliés par des liaisons osidiques en vert. En orange foncé les chaînes peptidiques et en orange clair les ponts inter-peptidiques.

Il existe cinq grandes familles d'antibiotiques qui diffèrent par leurs spectres d'activité, leurs indications ou leurs voies d'utilisation. La plus connue historiquement est la famille des bêta-lactamines avec entre autre la pénicilline découverte en 1926 par Alexander Fleming [4]. Les bêta-lactamines agissent sur la synthèse du peptidoglycane des bactéries en se liant aux enzymes impliquées dans la synthèse de cette structure. L'absence du peptidoglycane provoque une perte de résistance à la pression osmotique et par conséquent la lyse de la bactérie.

L'absence de membrane externe chez les bactéries à Gram positif facilite l'action de cet antibiotique. En effet les bêta-lactamines diffusent à travers le peptidoglycane pour atteindre leur site d'action, la surface de la membrane interne. Chez les bactéries à Gram négatif, l'antibiotique doit traverser la membrane externe via des porines puis diffuser à travers le peptidoglycane avant d'atteindre le site d'action (figure n°1). Cette étape limite donc l'entrée de molécules chargées, hydrophobes ou trop volumineuses.

Les glycopeptides, sont une autre famille d'antibiotiques. Ils agissent également sur le peptidoglycane mais ne sont pas actifs sur les bactéries à Gram négatif du fait de leur taille

qui ne leur permet pas le passage à travers les porines. La vancomycine fait partie de cette famille, et est classiquement utilisée en traitement des infections à Gram positif.

Enfin l'acide nalidixique qui fait partie de la famille des quinolones présente une activité similaire à la vancomycine par son action sur les Gram positives mais cible quant à elle la réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

I. La vancomycine

La vancomycine fait partie de la famille des glycopeptides qui comporte comme autre molécule la teicoplanine. La vancomycine est bactéricide et agit principalement sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane.

a) *Structure et synthèse*

La formule brute de la vancomycine est $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ (figure n°2), pour une masse moléculaire de $1\,449,3\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Cette molécule hydrophile est issue d'une synthèse protéique non ribosomale. Sept modules d'acides aminés sont assemblés en un heptapeptide puis modifiés par glycosylation et par liaison oxydative [5]. La vancomycine peut aussi être synthétisée par synthèse totale.

b) *Mécanisme d'action*

Comme décrit précédemment, la vancomycine va agir sur la synthèse du peptidoglycane en créant cinq liaisons hydrogènes avec la partie terminale du pentapeptide (N-acyl-D-Ala₄-D-Ala₅-COOH) d'une unité N-acétyl-glucosamine (NAG) ou de l'acide N-acétyl-muramique (NAM) qui sont les précurseurs du peptidoglycane. Du fait de la séquestration de la molécule précurseur du peptidoglycane par la vancomycine, la liaison entre le peptide et le site actif de l'enzyme impliquée dans l'élongation du peptidoglycane est bloquée. Le peptidoglycane ne peut plus se former et est dégradé par l'action de protéases perdant ainsi sa fonction de protection osmotique (figure n°2). La cellule meurt d'une lyse osmotique [6].

c) *Cibles bactériologiques*

Les espèces sensibles à la vancomycine sont pour la plupart des bactéries à Gram positif. Parmi ces espèces sensibles nous retrouvons des bactéries à Gram positif aérobies du genre *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listéria* mais aussi les souches *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus non aureus*, et *Streptococcus pneumoniae*. En ce qui concerne les souches anaérobies, les bactéries du genre *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* ainsi que la souche *Propionibacterium acnes* sont sensibles à la vancomycine [7].

d) *Utilisation thérapeutique et toxicité*

Avant le début des années 1980, à cause de sa relative toxicité la vancomycine était réservée aux patients qui avaient de fortes allergies aux β -lactames ou aux patients infectés par des bactéries résistantes aux autres antibiotiques. L'apparition de la colite pseudomembraneuse à *Clostridium difficile* et de pathogènes résistants comme *Staphylococcus aureus* méthicillin-résistant (MRSA) et *Streptococcus pneumoniae* pénicilline-résistant ont largement contribué à la hausse de l'utilisation de la vancomycine, seule molécule efficace contre ces types d'infections [8].

La vancomycine est une molécule volumineuse. Sa taille ne lui permet pas de passer à travers les pores de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et n'est pas indiquée dans le traitement d'infections à Gram négatives.

Les effets indésirables de la vancomycine sont l'hypersensibilité réactionnelle, des effets liés à l'injection en intraveineuse (IV) du médicament, l'ototoxicité, l'altération de la balance des radicaux libres et la néphrotoxicité [9].

L'hypersensibilité réactionnelle, les effets liés à l'injection en IV, l'induction du stress oxydatif et la néphrotoxicité sont des effets indésirables communs à de nombreux médicaments. Cependant, la vancomycine peut aussi endommager la branche auditive du huitième nerf crânien et favoriser l'apparition d'une surdité qui dans certains cas est irréversible. Il est aussi important de mentionner des effets indésirables souvent réversibles à l'arrêt du traitement comme des neutropénies, des thrombopénies, des leucopénies et des agranulocytoses.

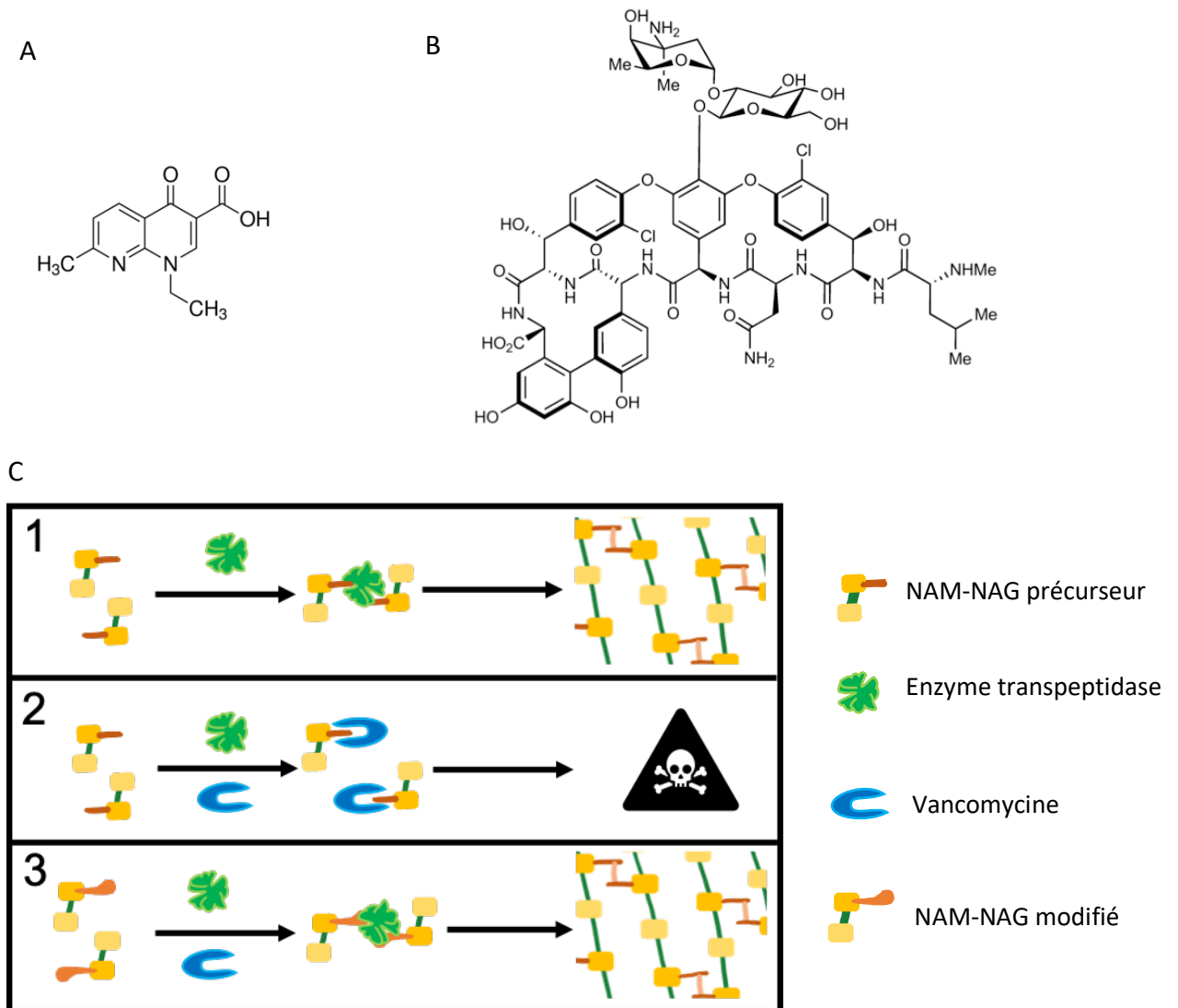


Figure n°2 : Acide nalidixique, vancomycine et son mécanisme d'action

(A) Formule topologique de l'acide nalidixique (ref). (B) Formule topologique de la vancomycine [7] (C) Schéma de la biosynthèse du peptidoglycane (1), du mécanisme d'action de la vancomycine (2), du mécanisme de résistance de la vancomycine (3).

II. L'acide nalidixique

L'acide nalidixique est un antibiotique synthétique. Il est le chef de file de la classe des quinolones.

a) *Structure*

L'acide nalidixique est une petite molécule dont la formule brute est $C_{12}H_{12}N_2O_3$ (figure n°2), pour une masse moléculaire de 232 g.mol^{-1} . Sa double structure circulaire possède deux atomes de nitrogène. La plupart des antibiotiques sont produits par des champignons ou des bactéries, certains sont totalement synthétiques comme l'acide nalidixique [10].

b) *Mécanisme d'action*

Cet antibiotique inhibe la croissance bactérienne en bloquant la réplication de l'ADN. En effet, les cibles de cette molécule sont la gyrase A et la topoisomérase IV qui sont responsables du désenroulement de l'ADN. Cette étape est nécessaire à la transcription et à la réplication de l'ADN des bactéries. L'inhibition des enzymes provoque le blocage de la réplication et le clivage de l'ADN, entraînant ainsi l'apoptose de la bactérie [10].

c) *Cibles bactériologiques*

L'acide nalidixique est préférentiellement actif sur les bactéries à Gram négatif. Parmi les espèces sensibles nous retrouvons des bactéries aérobies à Gram négatif comme *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* et *Providencia* [11].

d) *Utilisation thérapeutique*

Le chef de file des quinolones a été utilisé dans le traitement des infections urinaires bactériennes à Gram négatif dont *Escherichia coli*, *Proteus*, *Shigella*, *Enterobacter*, et *Klebsiella*. En effet la molécule est éliminée sans modification dans les urines où elle se retrouve en concentration importante. Son action sur les bactéries à Gram positif est très limitée [12]. Aujourd'hui elle est remplacée par des molécules plus efficaces et moins toxiques. L'acide nalidixique est toujours utilisé en recherche bactériologique pour étudier la division cellulaire.

II. L'antibiorésistance

I. Principes généraux

Peu de temps après l'introduction sur le marché d'un traitement antibiotique nous observons l'apparition de résistances (figure n°3) [13].

Ce phénomène nécessite un premier contact, entre la molécule et la cellule cible, qui crée une pression de sélection et favorise l'émergence de bactéries capables de résister à l'antibiotique. Puis ces bactéries proliféreront en gardant cet avantage sélectif qui peut aussi être partagé entre les espèces. La synthèse d'enzymes capables de dégrader l'antibiotique, l'augmentation du nombre et la modification des cibles bactériennes, la diminution de l'entrée ou l'expulsion de l'antibiotique sont les mécanismes classiques de résistance aux antibiotiques [14].

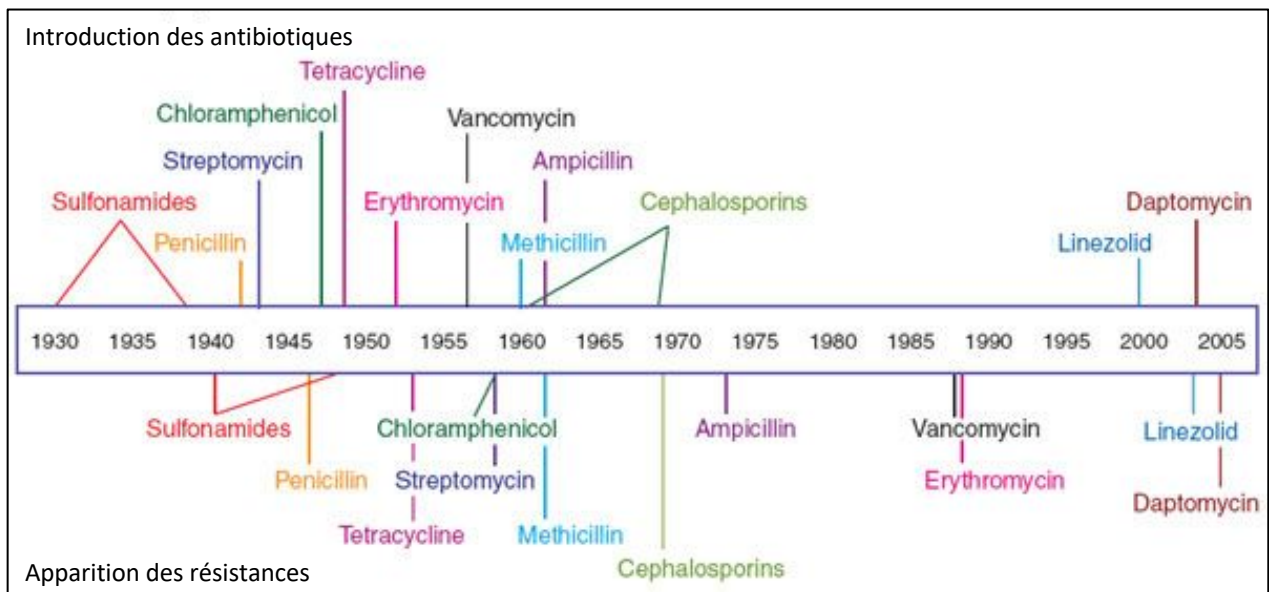


Figure n°3 : Comparaison chronologique de l'introduction des antibiotiques et de l'apparition des résistances associées [13].

II. Expulsion de l'antibiotique

L'expulsion de l'antibiotique par un transporteur est un moyen de réduire l'effet toxique. Il existe six familles de pompes à efflux dont la superfamille *resistance-nodulation-division* (RND) présente chez les bactéries à Gram négatif [15]. Cette dernière se caractérise par un complexe protéique de trois sous-unités. La partie inférieure et la partie supérieure s'intègrent respectivement dans la membrane interne et la membrane externe. Ces deux sous-unités sont reliées entre elles par un adaptateur protéique périplasmique. La différence de concentration en protons (H^+) de part et d'autre de la membrane crée la force proton-motrice nécessaire à l'activité de la pompe (figure n°4). Les substrats de cette famille de pompes à efflux sont très variés mais ont tous en commun un caractère lipophile. Parmi ces molécules nous retrouvons des colorants comme le Crystal violet, le bromure d'éthidium ou encore la rhodamine mais aussi des antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines, les macrolides ou les quinolones dont l'acide nalidixique. Les bactéries qui possèdent ce type de pompe à efflux sont donc plus résistantes face à ces molécules grâce à la diminution de leurs concentrations périplasmiques et cytoplasmiques.

III. Modification de la cible, cas de la vancomycine

Pour la vancomycine, la résistance se caractérise par la présence de structures génétiques, des opérons, qui codent pour des enzymes capables de modifier la cible de l'antibiotique. Chez les Gram positives, les précurseurs du peptidoglycane synthétisés par ces enzymes ont une affinité moins importante du fait des résidus en C-terminal modifiés (figure n°2). La liaison entre le NAM-NAG et la vancomycine est remplacée par une interaction répulsive [16]. Cette répulsion diminue l'affinité du ligand pour sa cible d'un facteur 1000. Il faudrait donc 1000 fois plus de molécules pour garder une efficacité mais sachant que la vancomycine est toxique, son utilisation en thérapeutique n'est plus possible.

Chez les Gram négatives, la membrane externe ne permet pas l'entrée de la vancomycine et en font des bactéries naturellement résistantes.

IV. Modification de la cible, cas de l'acide nalidixique

L'acide nalidixique est actif principalement sur les germes à Gram négatif. Néanmoins la sensibilité peut être diminuée par la présence de pompes à efflux comme nous venons de le souligner mais aussi par la présence de mutations sur le gène codant l'enzyme cible de cette quinolone. Une mutation d'un nucléotide sur une région codante peut aboutir à la synthèse d'une protéine avec une séquence d'acides aminés différente de la séquence du gène non muté [17]. Si l'acide aminé modifié est essentiel à l'activité de l'antibiotique cela peut provoquer une diminution de l'activité voire une perte totale d'activité de la molécule. C'est le cas chez *Caulobacter crescentus* où un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) sur la séquence d'ADN de la Gyrase A suffi à rendre la bactérie résistante à l'acide nalidixique.

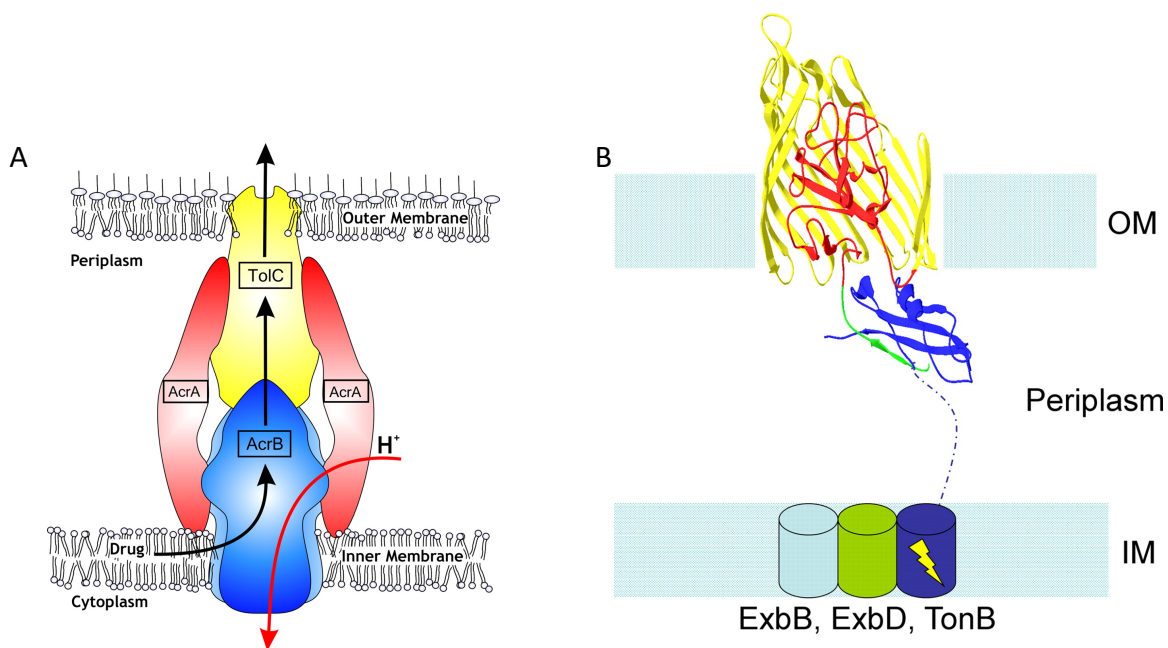


Figure n°4 : Représentation schématique des transporteurs transmembranaires

(A) Pompe à efflux chez les Gram négatives utilisant le gradient de proton H⁺ (flèche rouge). La sous-unité AcrB (bleu) et la sous-unité TolC (jaune), intégrées respectivement dans la MI et la Me, reliées par la sous-unité périplasmique AcrA (rouge) [18]. (B) Transporteurs couplés à la protéine TonB (TBDTs). Situées dans la membrane interne, les protéines ExbB, ExbD et TonB transmettent l'énergie nécessaire à l'activation du TBDT en jaune et rouge [19].

III. *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus est une bactérie oligotrophique à Gram négatif qui prolifère à l'état sauvage dans les lacs et les rivières [20]. Depuis une cinquantaine d'années cette alphaprotéobactérie sert de modèle pour l'étude du cycle cellulaire bactérien.

I. Transporteurs couplés à la protéine TonB (TBDTs)

Comme décrit précédemment, la membrane externe des bactéries à Gram négatif est la première ligne de défense contre les facteurs environnementaux potentiellement toxiques. *Caulobacter* qui prolifère dans des milieux oligotrophes possède un grand nombre de récepteurs protéiques transmembranaires (comme les histidines kinases) qui détectent et répondent aux différents stress et toxines. Elle réagit aussi aux faibles concentrations de nutriments grâce aux transporteurs couplés à la protéine TonB (TBDTs) représentés en grand nombre chez *Caulobacter* (62 TBDTs) [21]. En comparaison, *Escherichia coli* n'en possède que 8. Les nutriments, substrats de ces transporteurs sont aussi variés qu'indispensables et nous retrouvons par exemple la vitamine B12, les sidérophores ou les hydrates de carbone. Ces transporteurs sont intégrés dans la membrane externe et sont reliés à la membrane interne par un complexe protéique (TonB, ExbD et ExbB) qui fournit l'énergie nécessaire à l'activité du transporteur (figure n°4).

II. Cycle cellulaire

C. crescentus se divise asymétriquement à chaque cycle cellulaire donnant naissance à deux cellules filles avec des morphologies et des fonctions distinctes : la cellule mobile dite « nageuse » (SW) et la cellule fixe dite « pédonculée » (ST) (figure n°5). Au début du cycle cellulaire la SW possède sur le même pôle un flagelle et des pili. Cette cellule est temporairement bloquée en une pseudo phase G1 quiescente incapable d'initier la réplication ou de se diviser. Elle doit se différencier en cellule ST répliquative pour entrer en phase S et commencer la réplication de l'ADN. En phase G2 du cycle, l'appendice de la cellule ST est polymérisé là où se situaient le flagelle et les pili et ces derniers sont positionnés au pôle opposé. La division cellulaire se termine avec deux cellules filles polarisées [22].

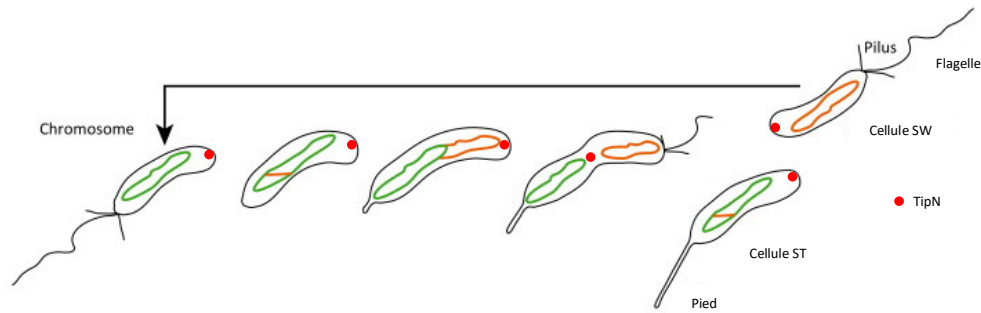


Figure n°5 : Cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus*

La cellule SW se transforme en cellule ST pour initier la réplication chromosomique (orange). La localisation de la protéine TipN est représentée en rouge.

La polarité au cours du cycle cellulaire chez *Caulobacter* est assurée par de nombreuses protéines dont TipN. Cette protéine de localisation identifiée grâce à sa capacité à placer le flagelle sur le nouveau pôle cellulaire, joue aussi un rôle dans l'intégrité membranaire via son interaction avec le système Tol-Pal qui maintient la liaison entre le peptidoglycane et la membrane externe. De récentes études menées dans notre laboratoire ont montré que TipN était aussi impliquée dans la résistance aux quinolones. Bien que *Caulobacter* soit naturellement résistante à l'acide nalidixique, nous avons observé que le mutant de TipN ($\Delta tipN$) n'était plus capable de proliférer en présence de cet antibiotique [23], [27].

III. Sensibilité et pompe

L'induction de l'expression du gène *acrAB2nodT*, une pompe à efflux, induite par la présence d'acide nalidixique s'est révélée être la cause de ce phénotype. Ce mécanisme est surprenant car généralement ces systèmes d'efflux protègent les bactéries contre ces molécules toxiques. L'absence de la pompe AcrAB2nodT ($\Delta acrAB2nodT$) montre une augmentation de la résistance des cellules $\Delta tipN$ en présence d'acide nalidixique confirmant que l'inhibition de croissance par l'acide nalidixique est dépendante de l'induction de la pompe.

Cependant, le mécanisme moléculaire permettant à TipN de se protéger contre l'effet toxique de l'induction de l'expression de cette pompe reste mal compris.

Pour étudier ce mécanisme, un criblage moléculaire a été réalisé dans le but de trouver d'autres molécules agissant comme l'acide nalidixique. Pour ce faire, trois conditions ont été testées en parallèle sur une banque de 1280 composés moléculaires à 10 μ M. Ces conditions doivent remplir les critères suivants. La souche sauvage ne doit pas présenter d'effet sur la croissance contrairement à la souche sauvage en présence d'acide nalidixique et le mutant TipN pour lesquelles nous souhaitons obtenir une diminution de la croissance. Le résultat de ce criblage a permis de mettre en évidence, contre toute attente, un antibiotique classiquement utilisé dans le traitement des infections à Gram positif, la vancomycine.

Alexander Fleming a reçu le prix Nobel de médecine en 1945 et a cette même année mis en garde sur les problèmes que l'on rencontre aujourd'hui : « Ceux qui abuseront de la pénicilline seront moralement responsables de la mort des patients qui succomberont aux germes résistants, j'espère que ce fléau pourra être évité. » [24]. En 2014, le Docteur Keiji Fukuda, Sous-Directeur général de l'OMS pour la sécurité sanitaire déclare : « À moins que les nombreux acteurs concernés agissent d'urgence, de manière coordonnée, le monde s'achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer » [25]. Ces déclarations doivent nous faire prendre conscience du danger que représente l'antibiorésistance. De nos jours, environ 80% des infections bactériennes graves sont causées par des espèces à Gram négatif multi-résistantes (MDR). Ces MDRs posent un double problème car leur capacité de résistance est importante et le nombre de candidat-médicaments ciblant ce type de bactéries est relativement faible dans les pipelines de recherche.

A Genève, au Centre Médical Universitaire, l'équipe du professeur Patrick Viollier dont je fais partie, travaille sur *Caulobacter crescentus*. Cette souche est un très bon modèle de bactérie à Gram négatif pour étudier le cycle cellulaire, la division et la différenciation cellulaire, mais aussi la résistance antimicrobienne de par sa sensibilité à l'acide nalidixique et la vancomycine.

Ce travail de thèse a pour but d'explorer et d'expliquer la sensibilité particulière du mutant $\Delta tipN$ de *Caulobacter crescentus*, normalement résistant à un antibiotique utilisé chez l'homme, la vancomycine.

II. Résultats

I. Tests antibiotiques

I. Vancomycine

Nous avons étudié l'effet de la vancomycine sur différentes souches de *Caulobacter*. La souche sauvage (WT), $\Delta tipN$, Δacr et $\Delta tipN \Delta acr$ ont été testés avec des concentrations d'antibiotique allant de 0 (contrôle) à 50 $\mu\text{g/ml}$ pendant une durée de 20h. Les résultats sont donnés en pourcentage de la valeur OD_{600} mesurée sans antibiotique (figure n°6(A)). Une diminution de la valeur indique une diminution de la densité cellulaire causée par l'action de l'antibiotique donc une sensibilité à la vancomycine. La concentration utilisée pour le criblage moléculaire était de 10 μM soit 14,5 $\mu\text{g/ml}$ et nous attendons les mêmes effets sur les souches WT et $\Delta tipN$ lors de cette expérience. Pour la concentration de 3,125 $\mu\text{g/ml}$ nous observons une légère amélioration de la croissance bactérienne comparée à la souche WT. Cet avantage est perdu quand la concentration en vancomycine augmente. A 12,5 $\mu\text{g/ml}$, WT et Δacr ont un pourcentage supérieur aux souches $\Delta tipN$ et $\Delta tipN \Delta acr$. Au-delà de 25 $\mu\text{g/ml}$ nous n'observons plus de croissance dans les différentes cultures.

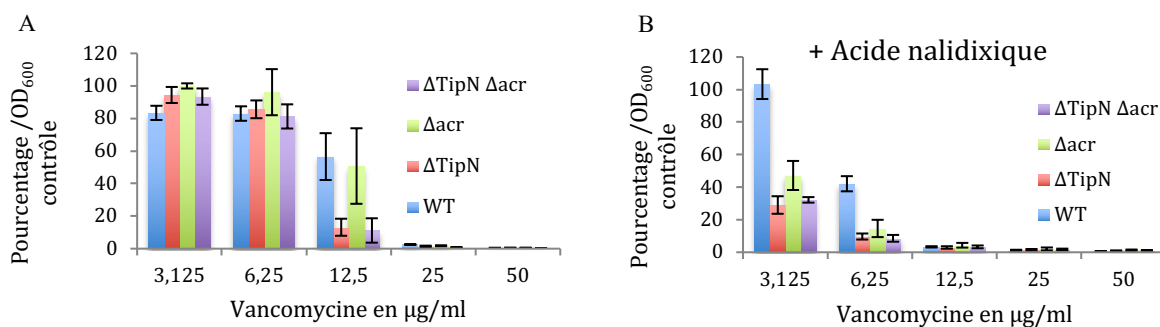


Figure n°6 : Test de résistance à la vancomycine

Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes et sont représentés en pourcentage par rapport à la valeur contrôle (0 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine). (A) Test d'inhibition de croissance de WT, $\Delta tipN$, Δacr et $\Delta tipN \Delta acr$ avec vancomycine à des concentrations croissantes. Le contrôle est la condition 0 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine. (B) Test d'inhibition de croissance de WT, $\Delta tipN$, Δacr et $\Delta tipN \Delta acr$ avec vancomycine et acide nalidixique à 20 $\mu\text{g/ml}$. Le contrôle est la condition 0 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine et 20 $\mu\text{g/ml}$ d'acide nalidixique.

Ces premiers résultats sont en accord avec les résultats observés par Clare Kirkpatrick lors du criblage moléculaire. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de vancomycine pour *Caulobacter crescentus* WT est supérieure à 14,5 µg/ml. Nous observons aussi un effet déterminant de la mutation du gène *tipN* sur la sensibilité à la vancomycine car si la pompe à efflux (AcrAB2-NodT) n'est pas requise pour avoir la même résistance à la vancomycine que la souche WT, ce phénotype est perdu quand nous associons les deux mutations $\Delta tipN$ et Δacr . Pour les souches qui possèdent la mutation $\Delta tipN$, la concentration minimale inhibitrice est proche de 12,5 µg/ml ce qui une fois encore confirme les résultats observés dans le screening par Clare Kirkpatrick.

II. Vancomycine et acide nalidixique

Nous avons ensuite étudié l'effet de la combinaison de l'acide nalidixique à 20 µg/ml et de la vancomycine à des concentrations croissantes (figure n°6(B)). Comme précédemment, les effets de la combinaison de ces antibiotiques confirment ceux observés dans le screening. A partir de 12,5 µg/ml de vancomycine le pourcentage des quatre souches ne dépasse pas les 5%. Pour les concentrations en vancomycine inférieures nous observons que la croissance des souches mutées est réduite de 50% par rapport à la souche sauvage. Un effet synergique des drogues est observé pour les 4 souches, la WT étant la moins affectée par cette combinaison. En effet, l'effet de la vancomycine seul n'est observable qu'à partir de 12,5 µg/ml, celui de l'acide nalidixique à 20 µg/ml est marqué par une diminution de l'OD₆₀₀ supérieure à 50% pour les souches mutées (données non publiées) mais la combinaison des deux antibiotiques produit un effet visible sur les concentrations les plus faibles en vancomycine (3,125 µg/ml pour les souches mutées et de 6,25 µg/ml pour WT). Il semble, là encore, que la mutation du gène *tipN* soit déterminante dans la sensibilité aux deux antibiotiques et que la souche Δacr perde son phénotype de tolérance à la vancomycine quand elle est en présence des 2 antibiotiques.

III. Test sur pastilles d'antibiotiques

Pour vérifier que l'effet des antibiotiques observé sur les souches mutantes est bien dû aux délétions des gènes *tipN* et *acr*, nous avons complété la souche $\Delta tipN$ avec un plasmide portant le gène *tipN*. Nous avons ensuite réalisé un antibiogramme pour mesurer les effets des deux souches pour différents antibiotiques. Les antibiotiques utilisés sont de la famille des bêta-lactamines pour aztréonam, méropénèm et mécillinam ; une polymyxine, la colistine ; acide nalidixique et vancomycine. La figure n°7 indique que les deux souches ne sont pas sensibles aux bêta-lactamines. Pour les trois autres antibiotiques, la sensibilité est diminuée pour la souche complémentée. L'absence de la protéine TipN est responsable d'une augmentation de la sensibilité à la colistine, l'acide nalidixique et la vancomycine.

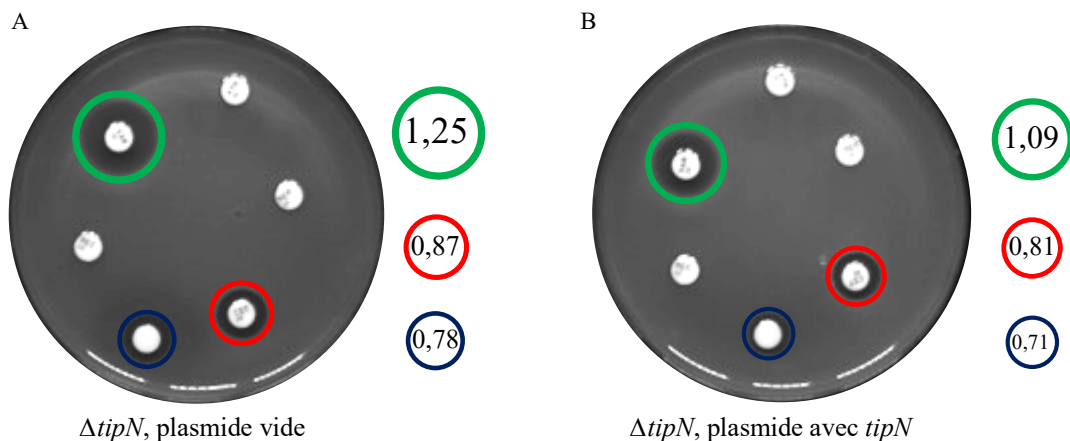


Figure n°7 : Test antibiotiques en disque

Test de sensibilité de $\Delta tipN$ avec plasmide vide (A) et $\Delta tipN$ avec plasmide codant pour la protéine TipN (B) pour 6 antibiotiques : aztréonam, méropénèm, mécillinam, colistine, acide nalidixique et vancomycine. Les cercles indiquent la zone d'inhibition qui est mesurée en unité arbitraire, l'absence de cercles indique une absence d'inhibition. Cercle vert : vancomycine, cercle rouge : colistine, cercle bleu : acide nalidixique.

Ces expériences confirment les résultats déjà observés lors du criblage moléculaire. La CMI de vancomycine pour *Caulobacter crescentus* est supérieure à 14,5 µg/ml. Nous observons aussi un effet déterminant de la mutation du gène *tipN* sur la sensibilité à la vancomycine qui fait diminuer la CMI à la vancomycine pour la souche $\Delta tipN$ (inférieure à 12,5 µg/ml) et qui, une fois complémentée, diminue cette sensibilité. L'ensemble de ces expériences nous montre aussi que la pompe AcrAB2-NodT est requise pour lutter contre l'effet synergique des antibiotiques (vancomycine et acide nalidixique).

II. Rôle de la pompe

I. Activité des promoteurs des gènes *acrA* et *tipR*.

Avant de générer des mutants de la souche $\Delta tipN$ résistants à la vancomycine nous avons d'abord pensé qu'il fallait analyser si la présence de vancomycine entraîne une induction des promoteurs des gènes *acrA* et *tipR*. TipR étant le répresseur endogène de la pompe à efflux. Nous avons donc étudié l'activité des promoteurs de la pompe à efflux P_{acrA} et celui du répresseur TipR, P_{tipR} dans les souches WT et $\Delta tipN$ grâce un test à la bêta-galactosidase (figure n°8). Les promoteurs étudiés dans cette expérience ont montré que leurs activités sont augmentées en présence d'acide nalidixique dans les souches testées dans les travaux de Clare Kirkpatrick [23]. L'ajout de vancomycine ne modifie pas l'activité des différents promoteurs dans les différentes souches. Ni P_{acrA} ni P_{tipR} ne sont affectés. Donc, il n'y a pas de modification de la synthèse de la pompe en présence ou non de vancomycine. Ce qui est intéressant ici, c'est que dans le mutant $\Delta tipN$, le promoteur de la pompe à efflux, celui qui devait être toxique pour la cellule, n'est pas activé par la vancomycine. Cela démontre que la vancomycine utilise des voies d'action différentes pour exercer son effet antibiotique et cela n'implique pas l'induction d'*acrAB2-nodT*.

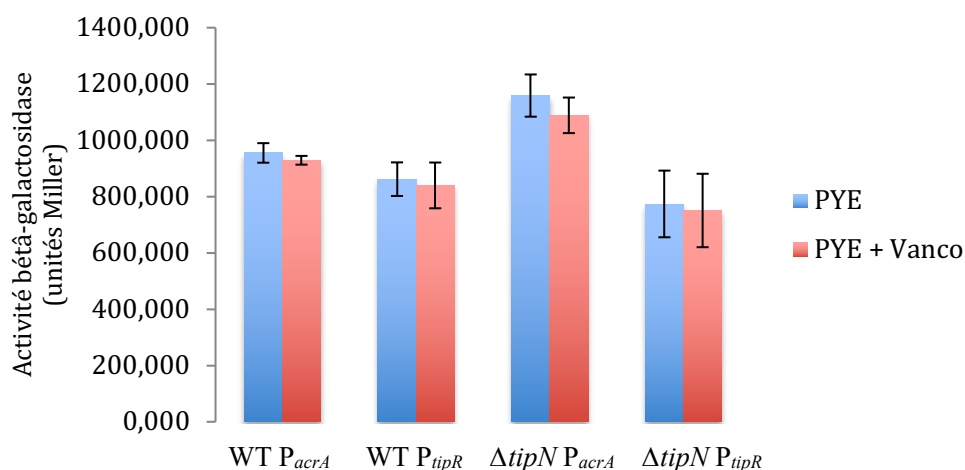


Figure n°8 : Test à la β -galactosidase

Activité des promoteurs des gènes *acrA* et *tipR* (P_{acrA} et P_{tipR}) avec ou sans vancomycine à 15 $\mu\text{g/ml}$ dans les souches WT et $\Delta tipN$. Les résultats présentés sont une moyenne de trois expériences indépendantes.

II. Effet non spécifique de l'acide nalidixique

Maintenant que nous savons que la pompe à efflux est impliquée dans le mécanisme de toxicité, nous voulons savoir si l'acide nalidixique possède un effet non spécifique. Pour cela, nous avons introduit dans la souche $\Delta tipN$ un plasmide inducible par le xylose (pMT-464) qui porte ou non le gène de la pompe *acrAB2-nodT*. Selon des études menées dans notre équipe [23], l'acide nalidixique induit l'expression de la pompe à efflux. Donc en utilisant le plasmide pMT-464 nous pouvons observer l'effet de l'induction de la pompe sans utiliser l'antibiotique et comparer les résultats entre l'induction du plasmide et celle due à la présence d'acide nalidixique. Nous ajoutons au milieu soit du xylose pour induire l'expression de la pompe soit du glucose pour l'inhiber. Ces deux sucres sont neutres vis-à-vis des souches utilisées. Les résultats de cette expérience ne nous ont pas permis de déduire si l'acide nalidixique avait un effet non spécifique mais ont permis de découvrir que le glucose avait un effet toxique sur les souches $\Delta tipN$ pmt464-*acrAB2-nodT* et $\Delta tipN$ pmt464 (figure n°9). Malgré ces résultats surprenants, nous pouvons confirmer que l'induction de la pompe à efflux augmente la sensibilité de *Caulobacter* pour la vancomycine. Ceci confirme le criblage chimique qui montre que l'effet de l'acide nalidixique, par la production de la pompe à efflux, augmente la sensibilité à la vancomycine. Cependant, nos données indiquent (figure n°6) que TipN pourrait être plus important pour la tolérance à la vancomycine que la présence ou l'absence de la pompe à efflux. Nous avons donc cherché des mutants suppresseurs de la souche $\Delta tipN$ résistants à la vancomycine.

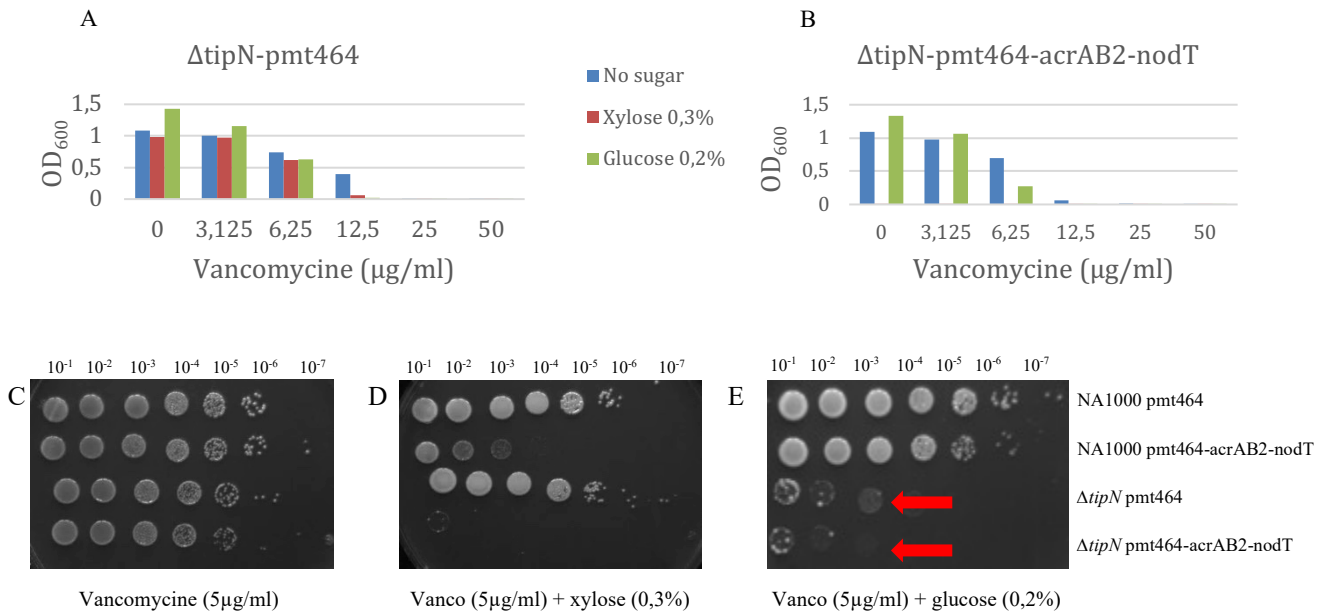


Figure n°9: Test de la surexpression de la pompe à efflux

Test en milieu liquide de résistance à la vancomycine à des concentrations croissantes des souches $\Delta tipN$ -pmt464 (A) et $\Delta tipN$ -pmt464-acrAB2-nodT (B) en présence de xylose 0,3% (orange), glucose 0,2% (gris) et sans sucre (bleu). Les résultats sont exprimés en valeur d'absorbance d'OD₆₀₀. Test sur boîte de Petri des souches NA1000 pmt464, NA1000 pmt464-acrAB2-nodT, $\Delta tipN$ -pmt464 et $\Delta tipN$ -pmt464-acrAB2-nodT avec vancomycine à 5 $\mu\text{g/ml}$ sans sucre (C), avec xylose 0,3% (D) et glucose 0,2% (E). Les souches sont diluées au dixième et déposées de gauche à droite de 10⁻¹ à 10⁻⁷.

III. Surexpression de la pompe à efflux, $\Delta tipR$.

Pour confirmer que la pompe à efflux (AcrAB2-NodT) une fois surexprimée augmente la sensibilité à la vancomycine, nous avons réalisé un test de sensibilité, sur boîte, des différents mutants (figure n°10). La viabilité du mutant $\Delta tipN$ est affectée en présence d'acide nalidixique pour les faibles dilutions de culture. Les autres souches ne sont pas modifiées dans ces trois conditions. Les résultats en PYE, acide nalidixique 20 $\mu\text{g/ml}$ et vancomycine 5 $\mu\text{g/ml}$ sont cohérents avec nos observations précédentes pour les souches testées sauf pour la souche $\Delta tipR$. Contrairement aux résultats observés lors de la surexpression de la pompe par le plasmide pMT464, le mutant $\Delta tipR$, qui est censé lui aussi surexprimer la pompe, montre une résistance à la vancomycine. En présence des deux antibiotiques les phénotypes des souches sont très différents. La souche WT n'est pas affectée par la combinaison des antibiotiques alors que $\Delta tipN$ subit un effet

synergique des molécules. Le mutant Δacr est résistant aux antibiotiques et permet de restaurer un phénotype de résistance au mutant $\Delta tipN$ quand il lui est associé. $\Delta tipR$ ne montre pas plus de sensibilité pour la combinaison d'antibiotiques que la construction $\Delta tipR\Delta tipN$ qui est très peu affectée. Prises séparément, les deux souches mutées $\Delta tipR$ et Δacr sont très peu sensibles aux antibiotiques alors que le double mutant montre une sensibilité plus importante. Le profil de résistance des souches $\Delta tipR$ testées dans cette expérience ne permet pas de conclure à une sensibilité plus importante de la souche $\Delta tipR$ par une simple augmentation de l'expression de la pompe AcrAB2-NodT via la déplétion du répresseur.

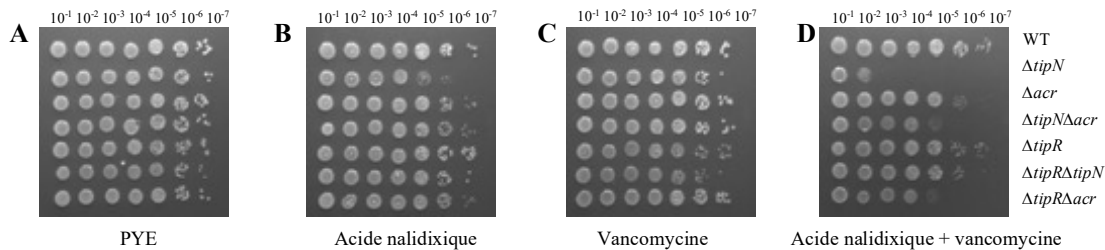


Figure n°10 : Surexpression de la pompe sur boîte de Petri

Souches testées WT, $\Delta tipN$, Δacr , $\Delta tipN\Delta acr$, $\Delta tipR$, $\Delta tipR\Delta tipN$ et $\Delta tipR\Delta$ sur boîtes avec PYE (A), acide nalidixique 20 $\mu\text{g/ml}$ (B), vancomycine 5 $\mu\text{g/ml}$ (C) et acide nalidixique 20 $\mu\text{g/ml}$ + vancomycine 5 $\mu\text{g/ml}$ (D). Les souches sont diluées au dixième et déposées de gauche à droite de 10⁻¹ à 10⁻⁷.

III. Mutagénèse

I. Mutagénèse par insertion de transposon

Pour comprendre comment la vancomycine inhibe la croissance de $\Delta tipN$, nous avons généré des mutants résistants à la vancomycine grâce à l'utilisation d'un transposon sur une culture de $\Delta tipN$. Cette technique utilise la capacité d'insertion d'un élément mobile, le transposon, pour muter tous les gènes dans le génome. Le transposon possède un gène de résistance à la gentamicine et son promoteur (figure n°11(A)). Nous sélectionnons les mutants qui ont intégré le transposon et qui sont résistants à la vancomycine en ajoutant de la gentamicine et de la vancomycine dans le milieu de culture que nous inoculons de bactéries précédemment mutées par les transposons.

Nous commençons nos investigations en utilisant une banque de mutants *ΔtipN* générés par transposons et sélectionnés avec gentamicine 1 µg/ml et vancomycine 15 µg/ml. Pour déterminer la position du transposon, il est possible d'utiliser la technique du sauvetage plasmidique qui a pour but de verrouiller la localisation du transposon dans un plasmide. Le séquençage de ce dernier nous révélera la position du transposon dans le génome. Malheureusement la bactérie *Escherichia coli* qui devrait porter le plasmide ne pousse pas sur boîte LB avec gentamicine et nous n'avons pas trouvé l'origine de ce problème.

Souche	Sélection	Gène	Longueur du gène / position (en pb)	Sens	Fonction
NVR C	+Acide nalidixique	CCNA_00851, Lipoprotéine périplasmique d'efflux multimoléculaire	1167 / 308	>>	Transport transmembranaire
NVR E		CCNA_03810, Protéine de liaison à l'ATP du système de transport pour la résistance des solvants organiques	771 / 714	>>	Transport transmembranaire
NVR K		CCNA_02115, Protéine de la famille lyase sécrétant des pectates	1632 / 1143	>>	Lyase
1h15	-Acide nalidixique	CCNA_03108, Récepteur de la membrane externe dépendent de TonB	3282 / -104 (région promotrice)	>>	Récepteur transmembranaire
3115			3282 / 960	<<	
2u15			3282 / 1607	<<	
2v15				<<	

Tableau I : Insertions des transposons

Insertions des transposons localisés par PCR avec amorces dégénérées. Premier groupe avec l'utilisation de l'acide nalidixique pour la contre sélection, second groupe sans utilisation de l'acide nalidixique. Position de l'insertion du transposon par rapport au début du gène en pair de base. Sens, >> : transposon inséré dans le même sens que le gène, << : transposon inséré dans le sens opposé au gène.

Nous reconstruisons par conjugaison la banque de mutants *ΔtipN* résistante à la vancomycine avec la souche *E.coli* S17-1 qui porte le plasmide pMAR-2XT7. La contre-sélection des bactéries se fait avec l'acide nalidixique 20 µg/ml et la sélection des mutants *ΔtipN* qui ont reçu le transposon et qui ont acquis une résistance à la vancomycine se fait

avec gentamicine 1 µg/ml et vancomycine 15 µg/ml. Nous avons obtenu beaucoup de colonies sur nos boîtes gentamicine et vancomycine. Une PCR de contrôle nous confirme que le transposon est bien présent dans nos bactéries *Caulobacter* mutées (figure n°11 (B)). Pour contourner le problème précédent, nous préférons utiliser ici une autre technique pour déterminer la position du transposon. Une fois l'ADN extrait des cellules mutées nous effectuons deux PCR à amorces dégénérées (ARB PCR) (figure n°11 (C)). Cette technique nous a permis de déterminer la localisation des transposons dans les souches NVR C, NVR E et NVR K (tableau I). Respectivement, les transposons se sont insérés dans les gènes CCNA_00851, CCNA_03810, impliqués dans le transport transmembranaire, et CCNA_02115 qui code pour une enzyme, la lyase. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus lors des expériences réalisées par Clare Kirkpatrick pour la souche *ΔtipN* (transporteurs) car la contre sélection qui vise à éliminer *E.coli* de la conjugaison se fait en ajoutant de l'acide nalidixique. En effet c'est en cherchant des mutants de *ΔtipN* résistants à l'acide nalidixique que les résultats ont montré l'intérêt du transporteur [23]. Pour éviter le biais de sélection dû à l'acide nalidixique nous reprenons la banque de transposons sans utiliser d'acide nalidixique lors de la contre-sélection. Les résultats obtenus par la technique ARB PCR se concentrent sur un gène en particulier : CCNA_03108. Trois souches ont le transposon dans le gène avec une insertion opposée au sens de lecture du gène et une souche avec un transposon inséré dans le sens de lecture, dans la région promotrice du même gène. Nous pouvons en déduire que le gène CCNA_03108 qui code pour un récepteur protéique de la membrane externe de la bactérie, TonB, joue un rôle dans la résistance à la vancomycine pour la souche *ΔtipN*. Les résultats du tableau qui concernent les souches NVR ne nous permettent pas de conclure que les deux gènes impliqués dans le transport et le gène qui code pour la lyase ont un rôle dans la résistance à la vancomycine car l'acide nalidixique a été utilisé pendant l'étape de sélection. A l'inverse le gène du récepteur membranaire CCNA_03108 semble être impliqué dans la résistance à la vancomycine chez *ΔtipN*.

II. Transduction

Afin de tester le phénotype nouvellement acquis nous devons nous assurer que la modification apportée par le transposon est la seule responsable de la résistance à la vancomycine. Nous procédons donc à un *backcrossing*, une transduction bactériophagique des souches mutées dans la souche de départ, $\Delta tipN$ et WT. Ceci permet de s'assurer qu'il n'y a pas de mutation autre que celle due au transposon dans notre bactérie. La transduction est effectuée sur les souches NVR-A à NVR-L dans $\Delta tipN$ et les souches 1h15, 2v15 et 3l15 dans $\Delta tipN$ et WT. Pour contrôler notre transduction nous faisons deux boîtes, une avec la gentamicine qui confirmera la présence du transposon grâce à la cassette de résistance et une autre boîte gentamicine-vancomycine qui prouvera la résistance à la vancomycine. Avec le même cône en plastique, nous piquons une colonie NVR que nous inoculons sur la boîte PYE-agar gentamicine puis, sans changer de cône, nous inoculons la deuxième boîte PYE-agar gentamicine-vancomycine (figure n°11(D)). Toutes les souches transduites ont intégré le transposon et présentent une résistance à la vancomycine. Ceci confirme que l'insertion du transposon est bien le seul responsable de la résistance à la vancomycine.

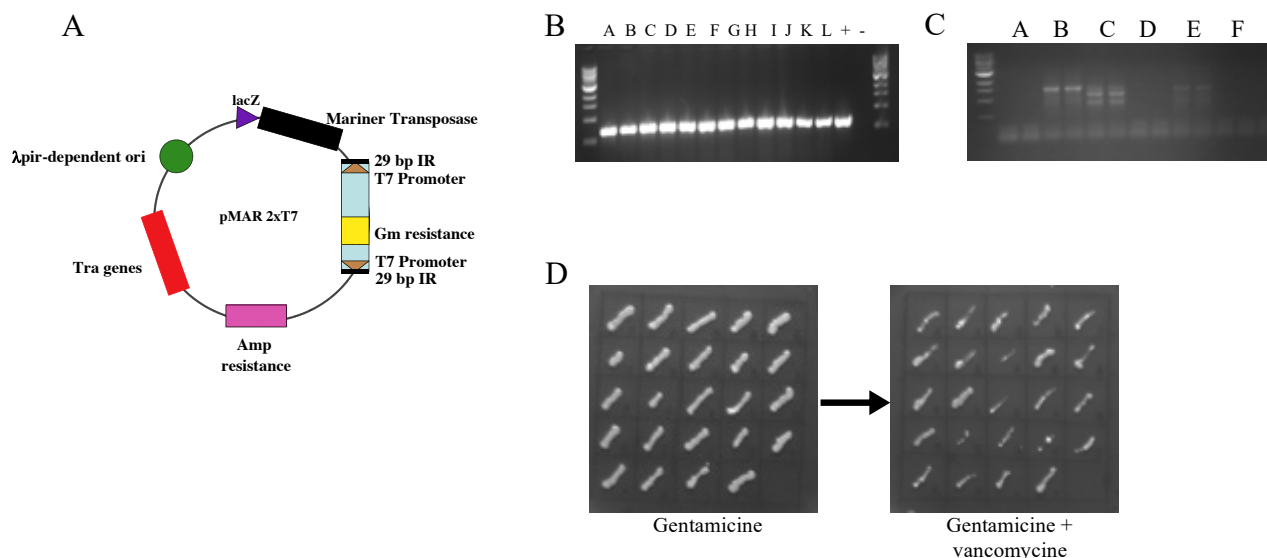


Figure n°11 : Transposon insertion

(A) Carte de pMAR-2XT7 avec la cassette de résistance à la gentamicine. (B) Gel de confirmation de PCR avec les amorces Mar-Gm1 et 2, polymérase GoTaq pour les souches NVR A à L. (C) Gel après les deux PCR à amorces dégénérées : pmar-2XT7-Arb1-A et B pour la première PCR et pmar-2XT7-Arb2-A et B pour la seconde. (D) Test des 12 souches NVR A à L en double sur boîtes de Petri avec gentamicine 1 μ g/ml et gentamicine 1 μ g/ml + vancomycine 15 μ g/ml.

La résistance à la vancomycine des souches mutées obtenues par transposon ont des profils d'insertion différents. Nous voulons tester les différentes souches transduites en présence de vancomycine en milieu liquide. Les souches WT 1h15 et $\Delta tipN$ 1h15 ont le promoteur du gène ciblé par le transposon et les souches WT 2v15, WT 3l15 et $\Delta tipN$ 2v15, $\Delta tipN$ 3l15 ont le transposon inséré dans le gène. Pour les souches transduites dans WT ou $\Delta tipN$ le profil de résistance est quasiment le même. Nous n'observons pas de variations importantes des pourcentages de croissance pour les concentrations inférieures ou égales à 6,25 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine (figure n°12(A et B)). En revanche à 12,5 et 25 $\mu\text{g/ml}$ les souches avec le transposon présentent une résistance plus importante que les souches WT et $\Delta tipN$. A 50 $\mu\text{g/ml}$ aucune souche ne pousse. Cette expérience confirme l'importance du gène *tonB* dans la résistance à la vancomycine.

Un transposon possède un promoteur pour le gène de résistance. Étant donné que le transposon s'est inséré dans la région promotrice du gène *tonB* de la souche 1h15, nous avons voulu tester l'activité de ce promoteur par un test à la β -galactosidase (figure n°12(C)). Que ce soit avec la souche WT ou $\Delta tipN$, qu'il y ait de l'acide nalidixique, de la vancomycine ou aucun antibiotique, nous observons une perte quasiment totale de l'activité du promoteur quand le transposon est inséré à l'intérieur de celui-ci. Le promoteur n'étant plus actif, la protéine TonB n'est plus produite. Les phénotypes de résistance à la vancomycine des souches mutées et la mutation « perte de fonction » 1h15 nous permettent de conclure que la diminution ou l'absence de la protéine TonB est responsable de la résistance à la vancomycine chez *Caulobacter crescentus* NA1000 et $\Delta tipN$.

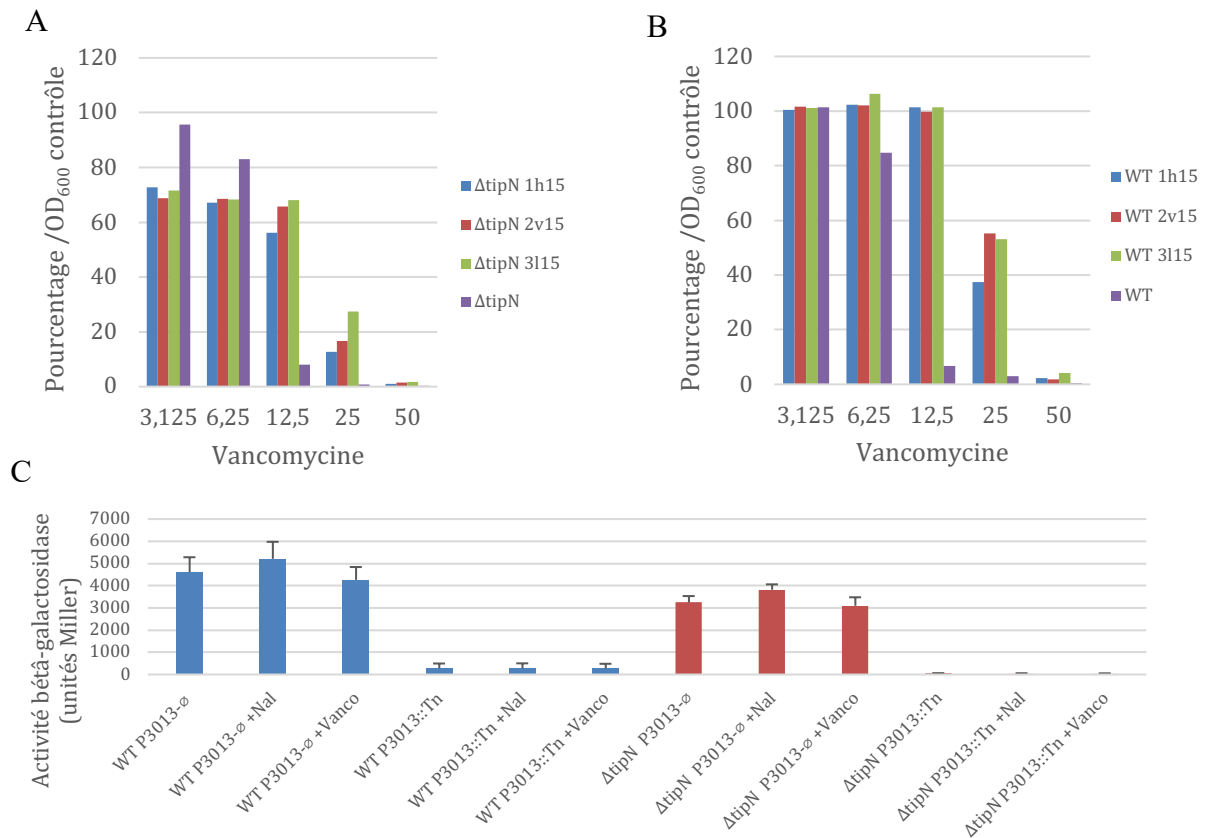


Figure n°12 : Test de résistance des transposons

Test de résistance à la vancomycine des souches mutées transduites dans $\Delta tipN$ (A) et WT (B) avec insertion de transposons dans le gène CCNA_03108. 1h15 = transposon dans la région promotrice, 2v15 et 3l15 dans le gène. Le contrôle est la condition 0 µg/ml de vancomycine. (C) Test à la β -galactosidase du promoteur du gène CCNA_03108 avec l'insertion de transposon (Tn) dans $\Delta tipN$ (rouge) et WT (bleu) avec acide nalidixique 20 µg/ml, vancomycine 15 µg/ml ou PYE.

III. Génération de mutants spontanés

La génération de mutants spontanés par passage successif d'une culture de $\Delta tipN$ en milieu liquide avec de la vancomycine 15 µg/ml est un autre moyen d'obtenir des mutants résistants à la vancomycine (SVRM). La même expérience a été menée sur une souche WT afin d'obtenir des bactéries mutantes résistantes à la vancomycine et à l'acide nalidixique (SNVRM). Nous avons obtenu des colonies sur les différentes boîtes (boîtes vancomycine et boîtes vancomycine et acide nalidixique). Nous avons séquencé deux répliquats distincts des souches SVRM et en ce qui concerne SNVRM, nous avons focalisé notre attention sur le gène CCNA_03108.

Réplicat	Gène	Position	Mutation	Fonction
581- $\Delta tipN$ vancomycine suppresseur réplicat 1	<i>exbD</i>	338192	Glu → Asp	Protéine de transport, membrane interne, sécrétion.
	<i>lysR</i>	897688	Asp → Gly	Régulateur transcriptionnel, fixation à l'ADN, famille LysR
	DHADH	3289002	Val → Leu	Acide dihydroxique déhydratase
	<i>mhpC</i>	3712343	Lys → Glu	Pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase, coenzyme du transport et du métabolisme général.
	<i>araC</i>	3209501	Asp → Asn	Régulateur transcriptionnel, famille AraC
	<i>araC</i>	3209503	Asp → Glu	Régulateur transcriptionnel, famille AraC
582- $\Delta tipN$ vancomycine suppresseur réplicat 2	PHC ; élément SI	108632	Arg → Pro	Hypothétique protéine conservée et élément SI (transposable)
	<i>lysR</i>	897688	Asp → Gly	Régulateur transcriptionnel, fixation à l'ADN, famille LysR
	PH	1196269	His → Glu	Protéine hypothétique
	Isomérase	2116249	Thr → Met	Isomérase cis-trans peptidyl- prolyl
	DHADH	3289002	Val → Leu	Acide dihydroxique déhydratase
	<i>araC</i>	3209501	Asp → Asn	Régulateur transcriptionnel, famille AraC
	<i>araC</i>	3209503	Asp → Glu	Régulateur transcriptionnel, famille AraC

Tableau II : Mutations des souches SVRM.

Le tableau renseigne sur les mutations des deux réplicats 581 et 582, le nom du gène, la position dans le génome de *Caulobacter crescentus* NA1000, la modification de l'acide aminé et la fonction du gène touché par la mutation. PH = hypothétique protéine, PHC = hypothétique protéine conservée, SI = séquence d'insertion, DHADH = Acide dihydroxique déhydratase.

L'alignement des deux séquences a été réalisé sur la plateforme Galaxy avec notre génome de référence NA1000. Les mutations récurrentes de notre souche de laboratoire NA1000 ont été supprimées des résultats qui sont caractérisées par leur fréquence et par leur nombre d'apparition lors de l'alignement. Une première observation rapide nous indique que les mutations observées sont des polymorphismes d'un nucléotide (SNP) qui modifie l'acide aminé concerné dans le triplet de nucléotides (tableau II). Ce changement d'acide aminé est à l'origine d'une modification de la fonction de la protéine qui induit la résistance à la vancomycine. La technique utilisée ici est un procédé sur deux semaines et ne permet pas l'apparition de mutations plus importantes comme des délétions de plusieurs nucléotides et ces observations confirment les résultats de la technique. Ces premières observations sont identiques dans les résultats des deux répliquats de l'expérience. Nous observons aussi la récurrence de certaines mutations au sein du même répliquat et entre les deux répliquats. Nous pouvons noter que le gène *araC* est muté deux fois dans les résultats de chaque expérience. Les gènes *lysR* et *DHADH* sont apparus dans les deux expériences. Les autres gènes qui sont apparus lors de l'alignement sont *exbD*, *mhpC*, trois gènes codant pour des protéines hypothétiques, des éléments transposables et une enzyme, l'isomérase. Nous avons aussi observé des mutations récurrentes dans des régions non codantes (NCR) et dans des séquences d'éléments transposables du génome de *Caulobacter* identiques aux deux répliquats ainsi qu'à l'intérieur de séquences de petits ARNs non codants qui ne sont pas représentées dans le tableau. En ce qui concerne la souche SNVRM, nous n'avons séquencé que le gène *tonB*. Aucune mutation dans ce gène. Ces mutations qui modifient les protéines de ces gènes permettent d'obtenir une résistance à la vancomycine. Les fonctions des protéines produites sont très différentes et d'autres techniques comme la délétion et la complémentation doivent être réalisées pour confirmer ces résultats.

IV. Test de mobilité, FACS et imagerie

I. Mobilité

La mobilité est un paramètre inhérent aux cellules flagellées et son analyse est importante pour comprendre comment se comporte notre modèle en présence ou en absence d'antibiotiques. Dans cette expérience nous souhaitons observer la mobilité des souches WT, $\Delta tipN$ et Δmob (contrôle négatif de mobilité) après une incubation en milieu liquide avec antibiotiques (vancomycine et/ou acide nalidixique). Nous observons que la mobilité de la souche $\Delta tipN$ en présence ou en absence d'antibiotique est identique à celle du contrôle négatif Δmob (figure n°13(C)). Cette observation est en accord avec les analyses de Hubert Lam [26] qui montrent un défaut du nombre ou un défaut du placement du flagelle chez $\Delta tipN$. Un dysfonctionnement de cette organelle ou son défaut de positionnement n'est pas compatible avec une mobilité cellulaire normale. Pour la condition acide nalidixique 20 $\mu\text{g/ml}$ et vancomycine 40 $\mu\text{g/ml}$, l'absence de colonies est due à la combinaison d'antibiotiques à fortes concentrations. Quand la concentration en vancomycine est de 40 $\mu\text{g/ml}$ la mobilité de la souche WT est diminuée, voire nulle quand nous combinons les deux antibiotiques. Cette modification n'est pas due à un dysfonctionnement du flagelle car la souche WT n'a pas de défaut sur cette organelle. La mobilité de la souche WT est donc modifiée en fonction de la concentration en vancomycine et par la combinaison avec l'acide nalidixique.

II. Phénotype

En parallèle nous avons réalisé des clichés des deux souches en microscopie à contraste de phase pour observer le phénotype des cellules en présence de vancomycine. L'aspect de la souche non mutée WT n'est pas modifié après une incubation de 20h en présence vancomycine, néanmoins nous observons l'apparition de quelques cellules mortes dites fantômes et une diminution de la densité cellulaire dans cette condition (figure n°13(D1 et 2)). L'aspect filamentueux de $\Delta tipN$ dans le PYE est le phénotype normal décrit dans les recherches de Hubert Lam [26], et de Patrick Viollier [27] (figure n°13(D3 et 4)). Après traitement le nombre de cellules a diminué très fortement par rapport aux cellules non traitées. Ce qui est intéressant ici est l'apparition de vacuoles de lyse qui sont situées sur

la surface des cellules mutées en présence de vancomycine. Les bactéries *ΔtipN* arborent ces vacuoles au niveau des pôles et du plan de division cellulaire, c'est-à-dire là où la protéine TipN est localisée dans une souche non mutée. En plus d'observer ces cellules bourgeonnantes, nous notons la présence de cellules mortes qui portent encore les traces de vacuoles. La vancomycine semble être active sur les cellules mutées au niveau de ces vacuoles entraînant la mort cellulaire.

III. Analyse du stade du cycle cellulaire

Comme nous avons observé un changement dans la mobilité, nous avons voulu soumettre nos cellules à la cytométrie en flux (FACS) car ce défaut peut être dû à un changement de la fraction de cellules en phase G1 (1N) par rapport à la phase G2 (2N). Cette expérience a été menée en phase exponentielle en traitant au préalable ou non nos cellules avec de la vancomycine pendant 20h (figure n°13(A et B)). Nous observons que le traitement à la vancomycine entraîne une inversion du ratio G1:G2 pour la souche WT. Pour autant les deux populations sont toujours répliquatives car il y a des cellules en phase S, entre G1 et G2. Du fait du caractère filamentueux du mutant *ΔtipN*, il est normal de constater la présence de cellules en 3, 4 voire 5N. Comme pour la WT, le ratio G1:G2 de la souche mutée *ΔtipN* est inversé entre les conditions traité et non traité à la vancomycine. Là encore les populations sont répliquatives avec une nette augmentation de cellules en phase S pour les mutants traités. Ces observations combinées à ce que nous avons constaté sur le test de mobilité et les images en microscopie confirment que l'action de la vancomycine diminue la population de cellules en phase G1 (nageuses et pédiculées, 1N) ce qui a pour effet de diminuer la mobilité des bactéries et d'augmenter la population de cellules en phase G2, donc des cellules qui sont en fin de cycle cellulaire. Les cellules en G2 sont des cellules qui peuvent être en phase tardive de pré-division avec les caractéristiques des cellules nageuses sur un pôle et pédiculées sur l'autre pôle mais aussi des cellules qui ont un défaut du cycle cellulaire avec une élongation et une synthèse non contrôlée de l'ADN. Nous pouvons aussi déduire de ces résultats que la vancomycine ne stoppe pas directement la répllication cellulaire car la fraction de cellules en phase S est toujours présente quelle que soit la souche testée.

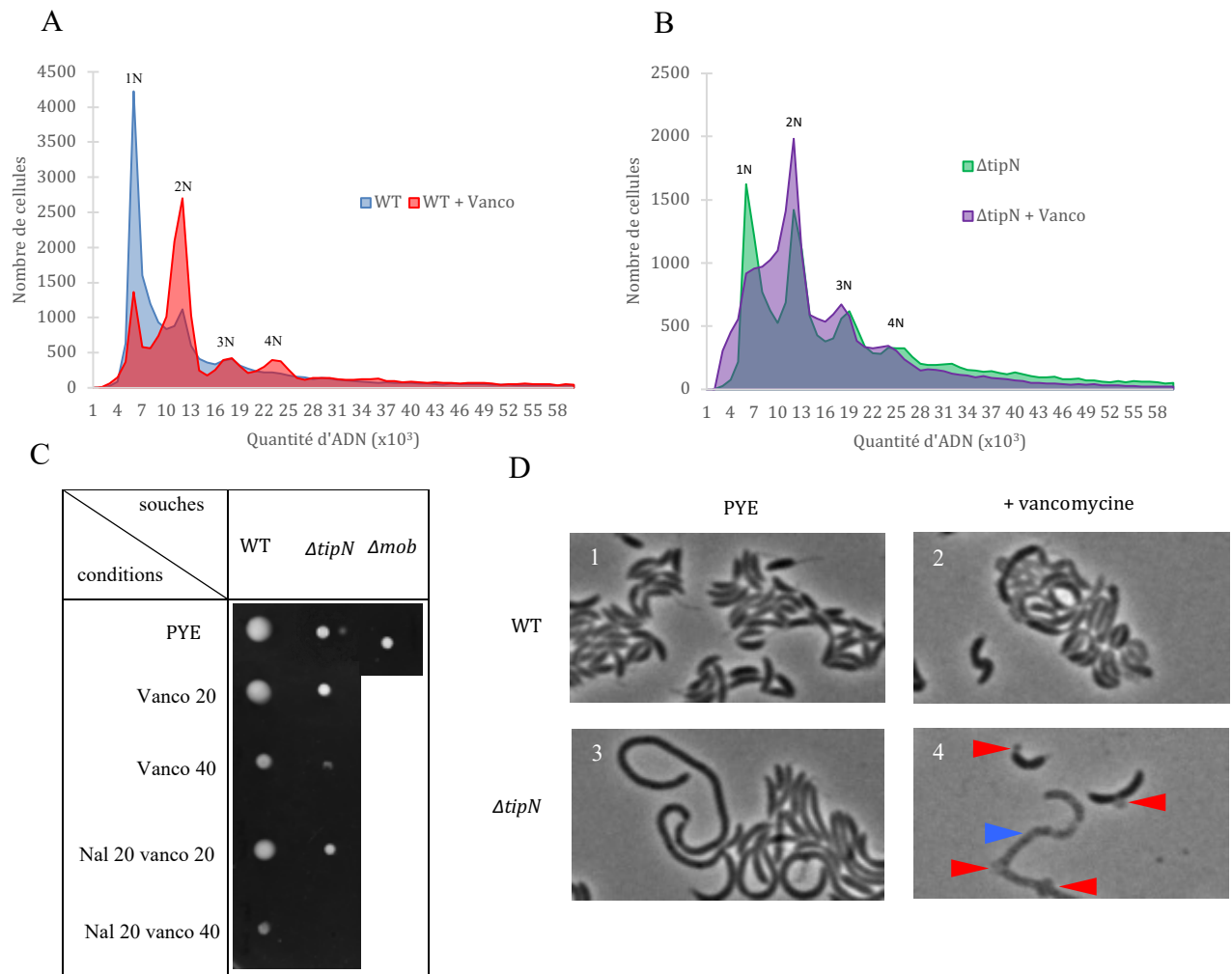


Figure n°13 : Cytométrie, microscopie et test de mobilité

Graphiques des moyennes de trois expériences indépendantes des cytométries en flux avec et sans vancomycine à 15 $\mu\text{g/ml}$ pour WT (A) et pour *ΔtipN*. 1N, 2N, 3N et 4N représente le nombre de chromosomes bactériens. (C) Test de mobilité cellulaire sur PYE agar à 0,3% pour 5 conditions : PYE, vancomycine 20 $\mu\text{g/ml}$, vancomycine 40 $\mu\text{g/ml}$, acide nalidixique 20 $\mu\text{g/ml}$ + vancomycine 20 $\mu\text{g/ml}$ et acide nalidixique 20 $\mu\text{g/ml}$ + vancomycine 40 $\mu\text{g/ml}$. Souches testées : WT, *ΔtipN* et *Δmob* le contrôle négatif. (D) Photo en microscopie en contraste de phase, grossissement x100 sur WT PYE (D1), WT + vancomycine 20 $\mu\text{g/ml}$ incubation 20 heures (D2), *ΔtipN* PYE (D3) et *ΔtipN* + vancomycine 20 $\mu\text{g/ml}$ incubation 20 heures (D4).

III. Discussion

La sensibilité à la vancomycine est très différente selon les espèces bactériennes. Chez les bactéries à Gram positif, elle est très élevée sur des souches qui n'ont pas acquis de résistance. Sur *Staphylococcus aureus* nous observons une concentration minimale inhibitrice de 1 µg/ml [28]. A l'inverse pour les bactéries à Gram négatif la CMI est très élevée. La présence de la membrane externe des bactéries à Gram négatif joue un rôle de bouclier contre l'entrée de la vancomycine dans la cellule. Nous dépassons les 400 µg/ml de CMI chez *E. coli* [29] idem chez *Pseudomonas aeruginosa*. Nous rapportons dans cette étude que *Caulobacter crescentus* qui est une bactérie à Gram négatif possède une sensibilité intermédiaire à la vancomycine. La CMI pour notre modèle d'étude WT est comprise entre 14,5 et 25 µg/ml.

Les mutants que nous avons testés ont des profils de sensibilité différents suivant la mutation ou la combinaison des mutations. La mutation sur le gène *tipN* semble être un facteur déterminant pour la sensibilité à la vancomycine comme nous l'indique notre test de complémentation avec les disques imprégnés d'antibiotiques. Cette mutation rend notre mutant plus sensible à l'action de la vancomycine que la bactérie WT. Le test à la β-galactosidase en présence de vancomycine nous a permis d'éliminer l'hypothèse d'une action sur la production de la pompe par cet antibiotique. Étant donné que l'activité de la vancomycine est un blocage de la synthèse du peptidoglycane alors l'absence de la protéine TipN joue un rôle plus ou moins important dans le transport de cette molécule à travers la membrane externe.

A l'inverse l'absence de la pompe à efflux, *Δacr*, n'a pas d'incidence sur la sensibilité à l'antibiotique. Ce phénotype n'est plus vrai quand nous ajoutons l'acide nalidixique à l'expérience. Cette quinolone est un substrat de la pompe qui, une fois absente de la membrane, n'expulsera plus l'antibiotique. Une accumulation du Nal semble potentialiser un effet synergique des deux antibiotiques sur le mutant *Δacr*. Cet effet synergique sur le mutant *Δacr* n'est pas le même que celui qui touche les bactéries *ΔtipN*. En effet nous savons qu'en l'absence de la protéine TipN, la présence de Nal favorise la synthèse de la pompe via l'activation de son promoteur ce qui est toxique pour la cellule. La sensibilité du double mutant *ΔacrΔtipN* vis à vis des deux antibiotiques peut s'expliquer par les deux mutations de notre bactérie, une accumulation toxique du Nal par un défaut d'expulsion et une entrée facilitée de vancomycine due à l'absence de la protéine TipN.

La surexpression de la pompe AcrAB2-NodT par un plasmide nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la sensibilité à la vancomycine que ce soit chez notre

mutant *ΔtipN* ou chez la souche WT. Ce qui est paradoxal car une augmentation de la production d'un système de résistance aux antibiotiques ne devrait pas produire ce phénotype. Notons aussi que les travaux menés par Clare Kirkpatrick [22] sur la sensibilité du mutant *ΔtipN* nous ont permis de conclure que l'activité d'efflux de la pompe n'était pas nécessaire à l'obtention de la sensibilité en présence de Nal et seule la présence de la protéine AcrAB2-NodT complète dans les membranes suffisait. De plus la vancomycine est une grosse molécule qui ne passe pas les membranes des bactéries et de ce fait n'est pas un substrat naturel pour la pompe. Il n'y a donc pas d'interaction directe entre la pompe et l'antibiotique. Rappelons que la vancomycine agit sur le peptidoglycane qui se situe entre les deux membranes des bactéries à Gram négatif et qu'une augmentation de la production de la pompe tend à augmenter la sensibilité à la vancomycine. En d'autres termes, une forte augmentation du nombre de pompes provoquerait un défaut structurel dans les membranes et faciliterait le passage de la vancomycine à travers la membrane externe pour atteindre son site actif, le peptidoglycane.

D'un autre côté, les résultats utilisant la surexpression de la pompe via la mutation du répresseur TipR ne convergent pas dans le même sens. Nous n'observons pas d'augmentation de la sensibilité pour la vancomycine sur les souches *ΔtipR*. La méthode de production de la pompe diffère de celle obtenue avec le plasmide et met en jeu le répresseur transcriptionnel TipR. Ce dernier est absent et ne joue plus son rôle de répresseur sur le promoteur de la pompe. Or, il est fort probable que ce répresseur possède d'autres cibles sur le génome. Ces autres cibles potentielles masqueraient le phénotype observé lors d'une surexpression de la pompe et l'étude de ces cibles nous renseignerait sur ce phénotype contradictoire.

Les résultats de la mutagenèse nous guident aussi vers l'enveloppe bactérienne. La mutagenèse spontanée nous donne une série de gènes qui se trouvent modifiés pour obtenir un phénotype de résistance à la vancomycine sur le mutant *ΔtipN*. Les mutants obtenus sont des mutants avec des modifications simples d'acides aminés mais suffisantes pour obtenir une résistance. Ces résultats doivent être confirmés par des tests de croissance en milieux liquides et solides en présence de vancomycine. Néanmoins, certains gènes modifiés sont en lien avec l'enveloppe bactérienne. Les deux familles de facteurs de transcription *lysR* et *araC* ont de multiples cibles comme par exemple, pour

araC les gène *acrAB* et *tolC* qui codent pour la pompe à efflux chez *E. coli* [30]. Pour *lysR* peu de couples facteurs-cibles ont été étudiés sur les 11 facteurs potentiels donc nous ne pouvons pas exclure une cible membranaire. Le gène *exbD* code pour une protéine transmembranaire qui fait partie d'un complexe qui relie les deux membranes de l'enveloppe. Un défaut de structure ou de synthèse de ce complexe membranaire pourrait avoir les mêmes conséquences que celles rencontrées avec une modification de l'expression de la pompe. C'est aussi ce gène qui est muté lors de la mutagénèse par transposon et qui donne une résistance aux souches WT et $\Delta tipN$ lors des tests en milieu liquide. Ces observations renforcent l'hypothèse d'un rôle majeur de cette protéine dans l'accès de la vancomycine à son site actif.

Les tests de mobilité et de cytométrie nous indiquent que la vancomycine affecte les cellules qui sont en phase G1 avec une diminution de la mobilité. Ceci peut être dû à une action de la vancomycine sur une période du cycle cellulaire qui ne permet pas la régénération de cellules en phase G1. Autrement dit une action sur les cellules en phase de division cellulaire (phase M). Cette hypothèse est confortée par l'augmentation de cellules en phase S et de cellules allongées avec plusieurs chromosomes. La capacité des cellules à continuer leur réplication est guidée par une pression de sélection de la vancomycine qui les force à ne pas se diviser. Vivre allongées ou mourir en se divisant. Cette pression de sélection est visible sur les images en microscopie du mutant $\Delta tipN$, où nous pouvons voir des cellules allongées qui portent les stigmates d'une lyse cellulaire. Des bulles de lyses sont aussi visibles au niveau du plan de division cellulaire de cellules en division et au niveau du pôle d'autres cellules. Ces points faibles par lesquelles la vancomycine semble pénétrer la bactérie et être active sont localisés au même endroit que la protéine TipN quand elle est synthétisée.

Les travaux de Yi-Chun Yeh ont démontré l'importance du complexe Tol-Pal dans l'intégrité de la membrane chez *Caulobacter* [31]. L'absence d'un des composants du complexe montre un défaut structurel de la membrane externe de la bactérie. Le complexe est essentiel et il interagit directement ou indirectement avec la protéine TipN en maintenant sa position dans la cellule. En ajoutant nos observations collectées durant ce projet aux conclusions de l'étude sur Tol-Pal, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence de TipN provoque un défaut d'intégrité membranaire, à l'image des mutants du complexe Tol-Pal, et de ce fait facilite la pénétration de la vancomycine dans notre bactérie.

IV. Conclusions

L'accumulation du système d'efflux AcrAB2-NodT dans la membrane, l'absence de la protéine de marquage TipN, la modification de facteurs de transcription et la modification de gènes qui occupent une place dans l'organisation de l'enveloppe bactérienne augmentent la sensibilité à la vancomycine dans notre modèle d'étude *Caulobacter crescentus*. Cette sensibilité est le résultat de l'entrée de l'antibiotique dans la cellule à travers la membrane externe. La vancomycine va donc pouvoir agir sur sa cible, le peptidoglycane, et non sur l'ADN chromosomique, comme nous l'ont démontré les expériences en cytométrie. Les images en microscopie renforcent l'idée que l'enveloppe bactérienne est au centre de ce nouveau mécanisme et que la protéine TipN joue un rôle plus important que ce que nous pensions dans le maintien de l'intégrité de la membrane. Nos données suggèrent que le lien entre la protéine TipN et le complexe Tol-Pal n'est pas simplement une aide à la localisation de la protéine comme décrit dans la littérature mais que les deux entités jouent un rôle dans le maintien de l'imperméabilité de l'enveloppe cellulaire au niveau du pôle et du plan de division cellulaire.

L'existence d'une nouvelle cible potentielle, $\Delta tipN$, qui, en agissant sur la membrane bactérienne rendrait les bactéries à Gram négatif sensibles aux antibiotiques utilisés classiquement pour les bactéries à Gram positif, ouvre la voie à de nouvelles possibilités de traitement dans les infections à Gram négatif résistants.

V. Perspectives

Pour mieux comprendre le rôle de TipN dans le maintien de l'imperméabilité de l'enveloppe nous voulons observer en microscopie nos bactéries en présence de vancomycine conjuguée à un fluorochrome (VAN-FL) et d'un colorant de membrane, le FM4-64. La caractérisation de l'interaction entre la membrane, la vancomycine et le Nal dans le mutant $\Delta tipN$ et la souche sauvage aiderait à la compréhension du rôle de TipN dans ce mécanisme.

Des images en microscopie électronique de l'enveloppe du mutant $\Delta tipN$ ou de la souche WT, en modifiant l'expression de la pompe, avec ou sans antibiotiques nous permettraient de visualiser en détail les effets de ces modifications sur la membrane bactérienne.

D'un autre côté, l'étude des cibles des facteurs de transcription *lysR* et *araC* à l'aide de la technique Chip-seq serait un excellent moyen d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de résistance dus à ces modifications. Ceci permettrait de confirmer l'existence de cibles impliquées dans le maintien de l'intégrité membranaire ou, à l'inverse, d'explorer d'autres mécanismes de résistance. Il est aussi important de confirmer les résistances obtenues par mutations spontanées en réalisant des tests simples de croissance avec antibiotique. La technique du Chip-seq sera aussi très utile pour déterminer les cibles potentielles du répresseur TipR et comprendre les phénotypes contradictoires que nous avons observés.

Pour aller plus loin dans l'étude de l'enveloppe, une expérience visant à évaluer la résistance de la membrane à la pression osmotique nous apporterait un élément de réponse sur la capacité de nos mutants à maintenir l'intégrité membranaire.

Enfin une mutagénèse par transposon couplée à un séquençage à haut débit sur le mutant $\Delta tipN$ et la souche WT en présence de vancomycine révélerait d'autres gènes impliqués dans ce mécanisme de résistance ainsi que des gènes qui augmenteraient la sensibilité à la vancomycine.

VI. Matériels et méthodes

I. Souches bactériennes, solutions d'antibiotiques, milieux et conditions de culture

I. Souches bactériennes

Nous avons résumé dans ce tableau les souches utilisées pour le projet qui sont stockées dans 10% de DMSO (diméthyle sulfoxyde, (CH₃)₂SO) à -80°C au laboratoire. La plupart des souches ont été créées au laboratoire avant le début du projet. La délétion de gènes est principalement obtenue par recombinaison homologue. Nous obtenons donc une souche totalement dépourvue de la séquence nucléotidique du gène concerné.

Souches	Description	Provenance
<i>Caulobacter crescentus</i>		
NA1000	Souches <i>Wild-type Caulobacter crescentus</i> (Evinger and Agabian, 1977) [33]	Laboratoire
$\Delta tipN$	Mutant de NA1000 pour le gène <i>tipN</i>	Laboratoire
Δacr	Mutant de NA1000 pour le gène <i>acrAB-nodT</i>	Laboratoire
$\Delta tipR$	Mutant de NA1000 pour le gène <i>tipR</i>	Laboratoire
$\Delta tipN\Delta acr$	Double mutant de NA1000 pour les gènes <i>tipN</i> et <i>acrAB2-nodT</i>	Laboratoire
$\Delta tipR\Delta acr$	Double mutant de NA1000 pour les gènes <i>tipR</i> et <i>acrAB2-nodT</i>	Laboratoire
$\Delta tipN\Delta tipN$	Double mutant de NA1000 pour les gènes <i>tipR</i> et <i>tipN</i>	Laboratoire
SNVRM	Mutants spontanés de $\Delta tipN$ résistant à la vancomycine	Projet
<i>Escherichia Coli</i>		
E.Coli S17-1	Souche utilisée pour générer des mutants transposon	Laboratoire

Tableau III : Souches utilisées pour l'étude

Souches utilisées chez *Caulobacter crescentus* et chez *Escherichia Coli*, description des modifications et provenance.

II. Culture bactérienne et antibiotiques

Caulobacter crescentus est cultivé dans du milieu *Peptone-Yeast-Extract* (PYE) à 30°C tandis que *Escherichia Coli* est cultivé en *Lysogeny Broth* (LB) à 37°C. Pour les cultures en boîte, 15 g/L d'agar sont ajoutés au milieu liquide. Les antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture en diluant 1000 fois la solution mère d'antibiotique qui est de 20 mg/ml pour la vancomycine et pour l'acide nalidixique et de 1 mg/ml pour la gentamicine.

II. Tests de croissance

I. Test de croissance en milieu liquide

A partir d'une culture O/N nous prélevons x ml suivant la formule $OD_{600} \times X = 5 \times 0,001$ où OD_{600} est la densité optique de la solution mère. Nous inoculons ensuite ce volume aux solutions filles qui contiennent ou non (contrôle) l'antibiotique et qui sont incubées sous agitation à 30°C pendant 20h puis nous mesurons l' OD_{600} . Les contrôles doivent être en phase stationnaire avec une OD_{600} supérieure à 1.

II. Test de croissance en milieu solide

Les cultures O/N des différentes souches sont diluées dans 5ml de PYE (0,5ml de culture O/N dans 4,5ml de milieu PYE à 30°C pendant 3h) pour atteindre la phase exponentielle. Les OD_{600} sont mesurées pour toutes les cultures et sont normalisées à l' OD_{600} la plus basse (ou $OD_{600}=0,5$). Nous complétons tous les volumes à 1ml avec du milieu PYE. Ces suspensions sont ensuite diluées en série à 1:10 dans du PYE pour obtenir 6 dilutions (10^{-1} à 10^{-6}). Des boîtes de Petri avec antibiotiques sont préparées. Nous déposons ensuite des gouttes de 5 μ l de chaque dilution et de chaque souche sur des boîtes de Petri suivant une grille d'un cm. Les gouttes doivent être sèches avant de retourner les boîtes pour les mettre à incuber à 30°C pendant 3 jours. Des photos sont prises avec le même temps d'exposition et sauvegardées sur un stockage externe.

III. Test de mobilité

Les tests de mobilité sont réalisés sur des boîtes PYE-agar à 0,3%. 1 µl de culture O/N à 30°C de chaque souche est déposé sur le PYE-agar 0,3% puis la boîte est incubée à 30°C pendant 2 ou 3 jours.

III. Test à la bêta-galactosidase

Ce test nous permet de mesurer l'activité transcriptionnelle du promoteur d'un gène via la régulation du gène qui code pour l'enzyme de la bêta-galactosidase. Le substrat ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) est hydrolysé par la bêta-galactosidase et produit deux molécules, le galactose et l'ortho-nitrophenol (ONP). Cette dernière molécule, quand elle est dans une solution alcaline, possède une couleur jaune et peut donc être quantifiée par absorbance à 420nm.

L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le lysat cellulaire et par extension à sa transcription et sa traduction [34].

I. Solutions utilisées pour le test enzymatique

Nous utilisons le tampon Z pour éliminer les variations de l'activité de la β-galactosidase due aux effets des différentes sources de carbone dans le milieu de culture. Ce tampon est composé de Na₂HPO₄ à 60 mM, NaH₂PO₄-H₂O à 40 mM, KCl à 10 mM et de MgSO₄-7H₂O à 1 mM. Le pH est ajusté à 7 par l'addition de NaOH.

La solution d'ONPG est composée de 4 mg/ml d'ONPG dans 0,1 M KPO₄ à pH 7 et la solution d'arrêt de la réaction est composée de Na₂CO₃ à 1M.

II. Protocole du test enzymatique

Pour une analyse linéaire, 3 à 5 heures de cultures avec ou sans antibiotique de *Caulobacter* sont préparées afin d'obtenir une OD₆₆₀ située entre 0,1 et 0,4. Nous ajoutons 30 µl de chloroforme pour lyser les bactéries au vortex. Ensuite nous mélangeons le tampon Z pour un volume final de 800 µl (cellules lysées + tampon Z). Pour *PacrA* et *PtipR*

nous avons utilisé 200 µl de culture cellulaire et 600 µl de tampon Z. 200 µl d'ONPG sont ajoutés au mélange qui est vortexé 10 secondes. La solution est placée dans un bain-marie à 30°C et le temps est mesuré au début de la réaction. Nous arrêtons la réaction en ajoutant 500 µl de la solution d'arrêt quand la réaction est devenue jaune et enregistrons le temps. Enfin nous mesurons l'OD₄₂₀ de la réaction enzymatique, l'OD₄₂₀ doit être comprise entre 0,2 et 1 pour garantir la linéarité de la mesure. Pour chaque échantillon l'activité du promoteur est calculée comme suit :

$$\text{Activité du promoteur} = \frac{OD_{420} \times 1000}{OD_{660} \times t \times V}$$

T est le temps de la réaction enzymatique en minutes, *V* est le volume de culture cellulaire ajouté à la réaction en ml. L'activité du promoteur est exprimée en unité Miller.

IV. Mutagénèse et transduction

I. Mutagénèse par transposon et localisation du transposon par PCR à amorces dégénérées

La mutagénèse par transposon est créée en transférant par conjugaison le plasmide pMAR-2XT7 qui porte le transposon himar1 de la souche donneuse *E. coli* S17-1 à la souche receveuse *ΔtipN*. Nous centrifugeons 250 µl de *E. coli* S17-1 à 8000 rpm pendant 2 min et resuspendons dans 1 ml de PYE. La suspension est lavée une deuxième fois dans 1 ml de PYE en centrifugeant à 8000 rpm pendant 2 min. Ensuite nous resuspendons dans 1 ml de culture *ΔtipN* O/N. Nous centrifugeons à 8000 rpm pendant 2 min et resuspendons dans 40 µl de PYE. Nous déposons ensuite la suspension sur une boîte de PYE-agar pendant 5h à 30°C. Les cellules sont récupérées dans 500 µl et sont étalées par fraction de 100 µl sur boîtes PYE-agar avec gentamicine 1 µg/ml, acide nalidixique 20 µg/ml et vancomycine 15 µg/ml pour une durée de 3 à 6 jours. Environ 50 000 colonies individuelles sont collectées et stockées à -80°C sous forme d'aliqots de 1 ml contenant 10% de DMSO.

La PCR à amorces dégénérées est réalisée sur des cultures provenant des aliqots stockés à -80°C et elle s'effectue en deux étapes [32]. 70 µl de culture mutée sont incubés à 90°C

pendant 10 minutes pour lyser les cellules. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes, 3 µl de surnageant (ADN) sont utilisés pour la première réaction de la PCR dégénérée (ARB 1) de 25 µl avec 5 µl de tampon GoTaq, 10% DMSO, 2,5 µM d'oligonucléotides, 1,25 unités de polymérase GoTaq et 1,0 ng/µl de chaque amorce pMAR 2XT7-ARB1-A et pMAR 2XT7-ARB1-B, l'amorce dite dégénérée (tableau). Le cycle de ARB 1 est défini par une première phase de dénaturation longue de 5 minutes à 95°C suivie d'une phase courte de 30 secondes. L'appareillement des amorces s'effectue à 47°C pendant 45 secondes puis l'élongation à 72°C pendant 1 minutes finit le premier cycle qui sera répété 29 fois depuis la phase de dénaturation courte. Cette première PCR se termine par 5 minutes d'élongation à 72°C.

Pour la deuxième étape PCR (ARB2), nous utilisons 5 µl de ARB 1 comme échantillon à amplifier. Le mélange réactionnel de ARB 2 contient les mêmes concentrations en oligonucléotides, DMSO et polymérase. Les amorces utilisées sont pMAR 2XT7-ARB2-A et pMAR 2XT7-ARB2-B. Le cycle de ARB 2 diffère de ARB 1 par une première phase de dénaturation de 30 secondes, une température d'hybridation de 45°C et un nombre de 39 cycles.

Nous ajouterons l'amorce pMAR 2XT7-ARB3 au produit purifié sur gel d'agarose de ARB 2 pour le séquençage.

Amorce	Séquence (5' - 3')
pMAR 2XT7-ARB1-A	TACAGTTTACGAACCGAACAGGC
pMAR 2XT7-ARB1-B	GGCCAGGCCTGCAGATGATGNNNNNNNNNNGTAT
pMAR 2XT7-ARB2-A	TGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCG
pMAR 2XT7-ARB2-B	GGCCAGGCCTGCAGATGATG
pMAR 2XT7-ARB3	CCGGGGACTTATCAGCCAACCTGT

Tableau IV : Amorces utilisées pour la PCR à amorces dégénérées

II. Génération de mutants spontanés

Générer des mutants spontanés pour un antibiotique donné ou une combinaison d'antibiotiques chez *Caulobacter* est possible en faisant une succession de passages en

milieu liquide. Trois cultures O/N sont préparées à partir de différents aliquots congelés. Les cultures sont ensuite diluées au 1/1000 dans une solution de PYE avec de la vancomycine à 15 µg/ml et incubées pendant trois jours à 30°C. Des fractions de 100 µl sont étalées sur PYE solide contenant de la vancomycine à 15 µg/ml et sont incubées pendant 3 jours à 30°C. Ensuite nous inoculons une solution de PYE plus vancomycine à 15 µg/ml avec une colonie individuelle de la boîte précédente. Après une incubation à 30°C pendant une nuit nous diluons au 1/1000 la culture dans une nouvelle solution de PYE plus vancomycine à 15 µg/ml. Cette étape est répétée trois fois après une croissance pendant 24h. Nous procédons à une congélation de 1 ml de culture avec 10% DMSO à -80°C avant d'étaler 100 µl sur du PYE solide plus vancomycine à 15 µg/ml que nous incubons à 30°C pendant trois jours. Trois colonies individuelles sont finalement piquées pour inoculer trois milieux PYE contenant de la vancomycine à 15 µg/ml. 1 ml des cultures ainsi obtenues sont congelées à -80°C avec 10% de DMSO et deux échantillons sont envoyés pour un séquençage complet du génome.

III. Transduction

Nous utilisons la transduction pour transférer du matériel génétique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse par l'intermédiaire d'un bactériophage. Dans cette étude nous avons utilisé la transduction généralisée qui se décompose en deux étapes : la préparation du lysat et la transduction du lysat.

Nous mélangeons 0,5 ml de culture O/N avec 5 µl de φCR30 pendant 5 minutes à température ambiante. Notre solution de phages est mélangée avec du PYE-agar mou (50% PYE liquide avec 50% PYE-agar) qui est versée sur des boîtes de Petri que nous plaçons à 30°C pendant une nuit. Le lendemain, nous recouvrons le PYE mou avec du PYE liquide et incubons à 4°C pendant une nuit. Les boîtes sont agitées lentement pendant 4 heures puis le liquide est récupéré dans un tube de 15 ml. Nous obtenons le lysat en ajoutant 1 ml de chloroforme que nous vortexons.

La deuxième étape est la transduction à proprement parler. Nous commençons par centrifuger à 6000 rpm pendant 10 min le tube de 15 ml pour éliminer le chloroforme puis 1 ml du lysat est exposé aux UV. Ensuite nous mixons 50 µl des phages inactivés avec 500 µl de culture O/N receveuse et incubons à 30°C pendant 2 heures pour que les

bactériophages ϕ CR30 s'attachent aux bactéries. Les cellules sont finalement étalées sur des boîtes PYE-agar avec gentamycine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et incubées à 30°C pendant 3 jours pour la formation de colonies puis congelées en liquide à -80°C avec 10% de DMSO.

V. Extraction d'ADN

Cette technique utilise le tampon P1 du kit Qiagen plasmide qui est composé de 50 mM de Tris-HCl et 10 mM d'EDTA. Nous préparons 500 μl de tampon P1 avec de la poudre de lysozyme à 5 mg/ml. Une culture O/N de 6-7 ml est centrifugée (6000 rpm pendant 10 minutes) puis resuspendue dans le tampon P1 puis est incubée à 37°C pendant 1 heure. Nous ajoutons 1 ml de DNazol pour isoler l'ADN en remuant doucement. Nous ajoutons 3 ml d'éthanol 100% pour précipiter l'ADN et lavons le précipité deux fois dans de l'éthanol à 70%. L'ADN est ensuite dissout dans 1 ml de NaOH à 8 mM pendant 4-5 heures sur une balance. La solution est centrifugée (14000 rpm pendant 2 min) et le surnageant est transféré dans un Eppendorf propre et neutralisé avec 30 μl d'Hepes à 1 M, pH 7.

VI. Préparation pour microscope

Nous devons immobiliser les cellules pendant l'observation et la prise de photo en microscopie. Dans un premier temps nous préparons une solution d'eau de 1% d'agarose. 200 à 400 μl de la solution chaude sont déposés sur une lame et nous recouvrons immédiatement avec une lamelle. Après 10 minutes la lame est prête à être utilisée.

Pour de l'imagerie, nous diluons une culture O/N au dixième dans un milieu PYE liquide pendant 4-6 heures pour obtenir des cellules en phase exponentielle.

Il faut ensuite retirer la lamelle avec une lame de scalpel pour déposer une goutte de 1 à 10 μl de culture cellulaire sur l'agarose. Nous laissons sécher quelques minutes. Une nouvelle lamelle est placée sur la goutte. Enfin une goutte d'huile d'immersion est déposée sur la lamelle avant de placer la lame sur la platine.

VII. Cytométrie en flux

I. Solutions

Quatre solutions sont nécessaires pour la cytométrie en flux. Une solution à 77% d'éthanol stockées à -20°C, une solution de RNase A à 10 mg/ml dans de l'eau, du SYTOX Green à 5 mM et du tampon FACS stocker à 4°C. Le tampon FACS est composé de Tris-HCl 10 mM à pH 7,5, EDTA à 1 mM, Na-citrate 50 mM et de Triton X-100 0,01%.

II. Préparation pour fixer les cellules

Nous avons dilué nos cultures O/N WT et *ΔtipN* au dixième dans du PYE avec ou sans vancomycine à 15 µg/ml. Ces nouvelles cultures sont mises à incuber à 30°C pendant trois heures puis nous les diluons au dixième dans l'éthanol 77% à -20°C. Après avoir vortexé les cellules, elles sont stockées à -20°C.

III. Traitement des cellules fixées

800 µl de cellules fixées sont transférées dans un Eppendorf, centrifugées pendant 3 minutes à 8000 rpm et le surnageant est éliminé. Ensuite nous lavons dans 1 ml de tampon FACS, centrifugeons et éliminons le surnageant. Nous préparons une solution de tampon FACS avec 0,1 mg/ml de RNase A et resuspendons 600 µl que nous incubons 30 min à température ambiante. Nous centrifugeons nos échantillons, éliminons le surnageant puis ajoutons 50 µl de tampon FACS pour resuspendre. Nous ajoutons 195 µl de tampon FACS dans lesquels nous diluons 10 000 fois du SYTOX Green dans des tubes vides que l'on protège de la lumière. 10 minutes avant les mesures, nous ajoutons 5 µl des échantillons cellulaires fixés aux 195 µl de solution FACS + SYTOX Green. Nous incubons les tubes 5 minutes dans le noir puis nous procédons à l'acquisition des données.

VII. Bibliographie

1. Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2017 Jan 30;16(1):15.
2. Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev*. 2011 Jul 1;69(7):392–403.
3. Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr Protoc Microbiol*. 2009 Nov;Appendix 3:Appendix 3C.
4. Mohr KI. History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;398:237–72.
5. Recktenwald J, Shawky R, Puk O, Pfennig F, Keller U, Wohlleben W, et al. Nonribosomal biosynthesis of vancomycin-type antibiotics: a heptapeptide backbone and eight peptide synthetase modules. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2002 Apr;148(Pt 4):1105–18.
6. Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989 Nov 1;8(11):943–50.
7. VIDAL - Vancomycine [Internet]. [cited 2019 Jul 12]. Available from: <https://www.vidal.fr/substances/6898/vancomycine/>
8. Levine DP. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis*. 2006 Jan 1;42 Suppl 1:S5-12.
9. Notice patient - VANCOMYCINE MYLAN 500 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion ou pour solution buvable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cited 2019 Jul 12]. Available from: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=69031610&typedoc=N>
10. Tillotson GS. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *Journal of Medical Microbiology*. 1996;44(5):320–4.
11. PopioÅ,ek Å, GawroÅ,ska-Grzywacz M. The Impact of Modifying the Chemical Structure of Nalidixic Acid on the Antimicrobial Activity of Its Derivatives: A Review. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*. 2015 Apr 29;7(4):191–202.

12.
Gleckman R, Alvarez S, Joubert DW, Matthews SJ. Drug therapy reviews: Nalidixic acid. *Am J Hosp Pharm.* 1979 Aug 1;36(8):1071–6.
13.
Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology.* 2007 Sep;3(9):541–8.
14.
Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016;4(2).
15.
Nikaido H. RND transporters in the living world. *Research in Microbiology.* 2018 Sep 1;169(7):363–71.
16.
McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med.* 2017;90(2):269–81.
17.
Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol.* 2017 May;66(5):551–9.
18.
Ruggerone P, Murakami S, Vargiu KMP and AV. RND Efflux Pumps: Structural Information Translated into Function and Inhibition Mechanisms [Internet]. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2013 [cited 2019 Jul 12]. Available from: <http://www.eurekaselect.com/117588/article>
19.
Udho E, Jakes KS, Buchanan SK, James KJ, Jiang X, Klebba PE, et al. Reconstitution of bacterial outer membrane TonB-dependent transporters in planar lipid bilayer membranes. *PNAS.* 2009 Dec 22;106(51):21990–5.
20.
Moore GM, Gitai Z. Both clinical and environmental *Caulobacter* species act as opportunistic pathogens. *bioRxiv.* 2019 May 23;645515.
21.
Balhasteros H, Shipelskiy Y, Long NJ, Majumdar A, Katz BB, Santos NM, et al. TonB-Dependent Heme/Hemoglobin Utilization by *Caulobacter crescentus* HutA. *J Bacteriol.* 2017 15;199(6).
22.
Subramanian K, Tyson JJ. Spatiotemporal Models of the Asymmetric Division Cycle of *Caulobacter crescentus*. In: Tassan J-P, Kubiak JZ, editors. *Asymmetric Cell Division in Development, Differentiation and Cancer* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 23–48. (Results and Problems in Cell Differentiation). Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-53150-2_2

23.
Kirkpatrick CL, Viollier PH. Synthetic Interaction between the TipN Polarity Factor and an AcrAB-Family Efflux Pump Implicates Cell Polarity in Bacterial Drug Resistance. *Chemistry & Biology*. 2014 May 22;21(5):657–65.
24.
PENICILLIN'S FINDER ASSAYS ITS FUTURE; Sir Alexander Fleming Says Improved Dosage Method Is Needed to Extend Use Other Scientists Praised Self-Medication Decried. *The New York Times* [Internet]. 1945 Jun 26 [cited 2019 Jul 12]; Available from: <https://www.nytimes.com/1945/06/26/archives/penicillins-finder-assays-its-future-sir-alexander-fleming-says.html>
25.
OMS | Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale [Internet]. WHO. [cited 2019 Jul 12]. Available from: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>
26.
Lam H, Schofield WB, Jacobs-Wagner C. A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell*. 2006 Mar 10;124(5):1011–23.
27.
Huitema E, Pritchard S, Matteson D, Radhakrishnan SK, Viollier PH. Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell*. 2006 Mar 10;124(5):1025–37.
28.
Watanakunakorn C. Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *J Antimicrob Chemother*. 1984 Dec;14 Suppl D:7–18.
29.
Zhou A, Kang TM, Yuan J, Beppler C, Nguyen C, Mao Z, et al. Synergistic interactions of vancomycin with different antibiotics against *Escherichia coli*: trimethoprim and nitrofurantoin display strong synergies with vancomycin against wild-type *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jan;59(1):276–81.
30.
Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Apr;28(2):337–418.
31.
pubmeddev, al YY et. The caulobacter Tol-Pal complex is essential for outer membrane integrity and the positioning of a polar localization factor. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jul 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693330>
32.
Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, et al. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Feb 21;103(8):2833–8.

33.

Evinger M, Agabian N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol.* 1977 Oct;132(1):294–301.

34.

Miller, J.H. (1972). Assay of β -galactosidase. In *Experiments in Molecular Genetics*, J.H. Miller, ed. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 352–355.

THÈSE SOUTENUE PAR : Simon-Ulysse VALLET

TITRE :

L'ABSENCE D'UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS LE MAINTIEN DE LA POLARITE CHEZ LA BACTERIE GRAM-NEGATIF CAULOBACTER CRESCENTUS INDUIT UNE SENSIBILITE A LA VANCOMYCINE

CONCLUSION :

L'accumulation du système d'efflux AcrAB2-NodT dans la membrane, l'absence de la protéine de marquage TipN, la modification de facteurs de transcription et la modification de gènes qui occupent une place dans l'organisation de l'enveloppe bactérienne augmentent la sensibilité à la vancomycine dans notre modèle d'étude Caulobacter crescentus. Cette sensibilité est le résultat de l'entrée de l'antibiotique dans la cellule à travers la membrane externe. La vancomycine va donc pouvoir agir sur sa cible, le peptidoglycane, et non sur l'ADN chromosomique, comme nous l'ont démontré les expériences en cytométrie. Les images en microscopie renforcent l'idée que l'enveloppe bactérienne est au centre de ce nouveau mécanisme et que la protéine TipN joue un rôle plus important que ce que nous pensions dans le maintien de l'intégrité de la membrane. Nos données suggèrent que le lien entre la protéine TipN et le complexe Tol-Pal n'est pas simplement une aide à la localisation de la protéine comme décrit dans la littérature mais que les deux entités jouent un rôle dans le maintien de l'imperméabilité de l'enveloppe cellulaire aux niveaux du pôle et du plan de division cellulaire. L'existence d'une nouvelle cible potentielle, $\Delta tipN$, qui, en agissant sur la membrane bactérienne rendrait les bactéries à Gram négatif sensibles aux antibiotiques utilisés classiquement pour les bactéries à Gram positif, ouvre la voie à de nouvelles possibilités de traitement dans les infections à Gram négatif résistants.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 9 Juillet 2019 .

LE DOYEN



Michel SEVE

LE DIRECTEUR DE THESE :



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :

