



**HAL**  
open science

## Résistance à la bacitracine chez *Bacillus subtilis*

Rémi Bernard

► **To cite this version:**

Rémi Bernard. Résistance à la bacitracine chez *Bacillus subtilis*. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2007. Français. NNT : . tel-00350345

**HAL Id: tel-00350345**

**<https://theses.hal.science/tel-00350345>**

Submitted on 6 Jan 2009

**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.

Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II

Faculté des Sciences de Luminy  
163, Avenue de Luminy  
13288 Marseille Cedex 09

THESE DE DOCTORAT  
Spécialité : Microbiologie et Biotechnologies

présentée et soutenue publiquement par

**BERNARD Rémi**

Le 6 avril 2007

en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée

Résistance à la Bacitracine chez *Bacillus subtilis*

Jury

M. BARRAS Frédéric	Professeur, Université de la Méditerranée	Examineur
M. BOCCARD Frédéric	Directeur de Recherche, CGM Gif-sur-Yvette	Rapporteur
M. DENIZOT François	Directeur de Recherche, CNRS Marseille	Directeur de Thèse
M. NOIROT Philippe	Directeur de Recherche, INRA Jouy-en-Josas	Rapporteur
M. SPRINGER Mathias	Directeur de Recherche, IBPC Paris	Examineur

Introduction Bibliographique	1
I- Les résistances aux antibiotiques : Nature, Emergence et Dissémination	3
<u>A. L'émergence de résistances : un problème de santé publique</u>	3
1. Un phénomène qui dépend des régions géographiques	3
2. Une même tendance : l'augmentation de bactéries résistantes	4
<u>B. Une mauvaise utilisation des antibiotiques</u>	5
1. Dans le milieu médical	5
2. Dans le monde agricole	6
<u>C. Plasticité des génomes bactériens et dissémination de résistances</u>	7
1. Mutation naturelle du génome bactérien	8
2. Les éléments mobiles de dissémination	10
2.1. Les plasmides	10
2.2. Les transposons	11
2.3. Les intégrons	11
3. Les mécanismes de transfert d'ADN	12
<u>D. Les bactéries non pathogènes : un réservoir de déterminants génétiques de résistance</u>	13
1. Le résistome des bactéries du sol	13
2. Des bactéries ubiquitaires au centre des disséminations	14
3. Le groupe de Firmicutes : un groupe ubiquitaire producteur d'antibiotiques et contenant de nombreux pathogènes	14
II- Les antibiotiques naturels ciblant l'enveloppe bactérienne : Diversité, Classification et Mode d'action	16
<u>A. L'enveloppe bactérienne : Importance, Structure et Biosynthèse</u>	16
1. Composition et fonction	16
1.1. La membrane cytoplasmique	17
1.2. La paroi bactérienne	17
2. Synthèse et structuration du constituant majeur de la paroi : le peptidoglycane	19
2.1. Formation du précurseur monomérique	19
2.2. La translocation du précurseur	20
2.3. Polymérisation et structuration du peptidoglycane	21
- Les PBPs ( <u>P</u> enicillin <u>B</u> indin <u>P</u> roteins)	22
- Activité autolytique et renouvellement des couches de la paroi	23
- Structuration de la maille de peptidoglycane	24
2.4. Régénération du translocateur lipidique	24
<u>B. Diversité des antibiotiques ciblant la paroi</u>	27
1. Les antibiotiques peptidiques à synthèse non-ribosomale	27
1.1. Biosynthèse	27
1.2. Une grande diversité de structures	28
2. Les antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomale	29
2.1. Diversité de structures	29
2.2. Les Bactériocines	30
3. Les antibiotiques non peptidiques	31
3.1. Les $\beta$ -lactames	31

3.2. La fosfomycine	32
<u>C. Diversité des Modes d'action</u>	33
1. Perturbation de l'intégrité membranaire par les antibiotiques peptidiques	33
2. Inhibition de la synthèse de la paroi	36
2.1. Fosfomycine, Cyclosérine et Muréidomycine : inhibition des étapes primaires	36
2.2. Inhibition des étapes plus tardives : le lipide II, une cible majeure	37
-Les Ramoplanines : complexation au lipide I et II, un exemple de dualité fonctionnelle	37
-Les Glycopeptides et l'inhibition des étapes de polymérisation	38
-Les $\beta$ -lactames : un ciblage direct des PBPs	38
-Les lantibiotiques : complexation au lipide II	39
2.3. La bacitracine et l'inhibition de la dernière étape dans la biosynthèse de peptidoglycane	40
<b>III- Mécanismes de résistances aux antibiotiques ciblant l'enveloppe Bactérienne et régulation de ces mécanismes</b>	41
<u>A. Diversité de mécanismes liée à la diversité des antibiotiques</u>	41
1. Mécanismes ciblant directement l'antibiotique	41
1.1. Inactivation de l'antibiotique ou modification de l'expression de ses gènes de synthèse	41
-Les $\beta$ -lactamases et la résistance aux $\beta$ -lactames	41
-Résistance à la fosfomycine	43
-Répression de l'expression des gènes codant pour l'antibiotique	43
1.2. Dégradation ou séquestration de l'antibiotique	43
2. Modification de la cible de l'antibiotique	44
2.1. Perte de la cible ou modification de son expression	44
2.2. Altération de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible	45
-Résistance aux glycopeptides	45
-Les PBPs de faibles affinités	46
-Modification de la charge nette de la cible et inhibition des interactions électrostatiques	47
-Résistance à la D-cyclosérine	48
3. Réduction de la pénétration de l'antibiotique	48
3.1. Modifications des constituants de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif	48
3.2. Modifications des constituants de la paroi	49
3.3 Modifications des propriétés de la membrane plasmique	50
4. Les systèmes actifs d'efflux d'antibiotiques, focalisation sur les transporteurs de type ABC	50
4.1. Une grande variété de pompes d'efflux bactériennes	50
4.2. Structure des transporteurs ABC	51
4.3. Classification des transporteurs ABC	52
4.4. Fonctionnement des exporteurs de drogues et antibiotiques	54
<u>B. Mécanismes de régulation permettant une réponse adaptée des bactéries aux stress de l'enveloppe</u>	56
1. Les « Cell-Wall Stress » stimulon	56
2. Les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique ou ECFs	59
2.1. Définition et mécanisme d'action	59



2.2. Répertoire et fonction des ECFs de <i>Bacillus subtilis</i>	60
-Le facteur $\sigma^X$	61
-Le facteur $\sigma^W$	61
-Le facteur $\sigma^M$	62
3. Les systèmes de transmission du signal (ou systèmes à deux composants)	63
3.1. Définition et mécanisme d'action	63
3.2. Répartition et classification de senseurs et régulateurs chez les bactéries	65
3.3. Phosphorelais et antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne	68
-Exemples de résistances spécifiques	68
-Exemples de phosphorelais couplant résistances aux antibiotiques et virulence	69
-Exemples de phosphorelais répondant aux stress de l'enveloppe bactérienne	70
-Phosphorelais, Quorum-sensing et lantibiotiques	71
IV- La Bacitracine	73
<u>A. Mode d'action</u>	73
<u>B. Biosynthèse de la bacitracine et résidus essentiels à son activité</u>	74
<u>C. Mécanismes connus de résistance à la bacitracine</u>	76
1. Transporteur ABC et export potentiel de bacitracine : mécanisme d'immunité de <i>B. licheniformis</i> ?	76
2. Activités antagonistes	77
3. Mécanisme spécifique trouvé chez les bactéries à Gram négatif	77
Résultats	78
<u>Problématique de l'article 1</u>	79
1. Couplage fonctionnel et génétique entre phosphorelais et transporteurs ABC	79
2. Description des constituants de ces systèmes phosphorelais/ABC	79
3. But de l'article : identification de la résistance due à chaque transporteur ABC et régulation des gènes de structure correspondants.	80
<b>Article 1 - YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to <i>Bacillus subtilis</i></b>	80
<u>Conclusion de l'article 1</u>	81
<u>Problématique de l'article 2</u>	83
<b>Article 2 - BcrC from <i>Bacillus subtilis</i> acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance</b>	84
<u>Résultats complémentaires de l'article 2</u>	84
1. Autres UPP Phosphatases chez <i>B. subtilis</i>	84
2. Topologie membranaire de la protéine BcrC	85

<u>Problématique de l'article 3</u>	87
<b>Article 3 - Resistance to bacitracin in <i>Bacillus subtilis</i> : unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes</b>	88
<u>Conclusion de l'article 3</u>	88
<u>Résultats complémentaires de l'article 3</u>	89
1. Senseur BceS et résistance à la bacitracine	89
2. Dans les systèmes couplant génétiquement et fonctionnellement un phosphorelais et un transporteur ABC, ce dernier est-il toujours nécessaire à la réponse ?	90
3. Les senseurs à boucle extracytoplasmique courte dans les génomes bactériens	91
<b>Discussion Générale et Perspectives</b>	92
1. Les UPP phosphatases	93
2. Quelle est l'utilité pour <i>B. subtilis</i> d'avoir deux systèmes de résistance à la bacitracine ?	96
3. Le système BceRSAB	97
<b>Références Bibliographiques</b>	104

# Introduction Bibliographique

La découverte des antibiotiques est considérée comme la plus importante avancée thérapeutique de l'histoire de la médecine, et jusqu'à une période récente les antibiotiques étaient désignés comme « remède miracle ». Cependant, aujourd'hui, l'usage abusif d'antibiotiques a conduit à ce que Stuart Levy nomme « le paradoxe des antibiotiques » : ces substances travaillent à leur propre échec du fait qu'elles sélectionnent inévitablement les rares souches bactériennes qui leur résistent (Levy, 1992). De plus, les éléments génétiques qui confèrent cette aptitude de résistance peuvent être transmis à d'autres bactéries parfois non apparentées. Le microbiologiste britannique Alexander Flemming, qui découvrit la pénicilline, suspectait déjà que les bactéries puissent développer des mécanismes de résistance aux antibiotiques et que les antibiotiques seraient un jour moins efficaces. Cet effet paradoxal des antibiotiques ne signifie pas qu'ils sont inutiles mais il faut en tenir compte et utiliser ces substances à bon escient.

Par définition, les antibiotiques sont des substances détruisant les micro-organismes en ayant une action lytique (Bactéricides ou Fongicides) ou empêchant la prolifération du micro-organisme (Bactériostatique ou Fongistatique). Aujourd'hui plus de 10 000 molécules antibiotiques ont été répertoriées et dans la plupart des cas, ces substances sont synthétisées de façon naturelle par toutes sortes d'organismes répartis dans tous les règnes du vivant. Les microorganismes synthétisent et sécrètent des antibiotiques afin d'obtenir un avantage crucial de croissance dans leur niche écologique. Les organismes supérieurs synthétisent des substances antibiotiques pour contrer l'ensemble des infections microbiennes qui les menacent.

# I - Les résistances aux antibiotiques : Nature, Emergence et Dissémination

## A. L'émergence de résistances : un problème de santé publique

La surconsommation des antibiotiques durant les dernières décennies (10 000 tonnes par an en Europe en 1997) a inévitablement conduit à la sélection naturelle de bactéries résistantes, voire même multi-résistantes, rendant les traitements médicaux plus précaires, plus coûteux et parfois infructueux (Levy and Marshall, 2004). L'émergence de bactéries résistantes est souvent observée très tôt chez les espèces cibles après introduction d'un antibiotique dans les traitements médicaux. Ce fut le cas pour la pénicilline, dont le premier traitement fut administré en 1941, et pour laquelle l'apparition en masse de Staphylocoques pathogènes résistants fut observée en 1957 (Wallmark and Finland, 1961).

Un récent rapport du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) indique que la proportion de *Streptococcus pneumoniae* résistants à la pénicilline et à la cefotaxime a progressé de plus de 20 % entre 1991 et 1998 (Fig.1). Certains pneumocoques sont résistants à tous les agents antibiotiques oraux utilisés à ce jour en médecine (céphalosporine, érythromycine, quinolones...etc...).

### 1. Un phénomène qui dépend des régions géographiques

Ce phénomène d'émergence de bactéries résistantes se manifeste différemment selon les régions géographiques. Il peut s'avérer tout d'abord très local. Archibald *et coll.* ont par exemple observé que la fréquence d'Entérocoques résistants à la vancomycine et de *Pseudomonas aeruginosa* résistants à la ceftazidime était deux fois plus élevée dans une unité de soins intensifs par rapport à la fréquence observée dans les autres unités du même hôpital aux Etats-Unis (Archibald *et al.*, 1997). A un autre niveau, ce phénomène peut être généralisé à un pays entier ; en Europe par exemple, on trouve des fréquences très élevées de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (ou MRSA) dans les pays du sud. 30 à 45% des infections à *S. aureus* sont dues à des MRSA en Espagne, Italie, France et Portugal alors que ces MRSA concernent seulement 1% des souches isolées dans les pays du Nord comme la Finlande et la Suède (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, <http://www.earss.rivm.nl> et Fig.2). Ces souches MRSA sont apparues moins d'un an après

l'introduction de la méthicilline en 1960 (Jevons *et al.*, 1963). Un profil similaire peut être observé avec les souches de *S. pneumoniae* présentant une résistance à la pénicilline ; ces PNSP (Pneumocoques Non Susceptibles à la Pénicilline) représentent 80% des pneumocoques isolés en Corée et au Japon, environ 40% de ceux isolés en France ou en Espagne et seulement 1% des pneumocoques de Scandinavie (Baquero, 1995; Song *et al.*, 1999). Enfin, certaines souches multi-résistantes peuvent se retrouver avec une forte fréquence à l'échelle internationale. C'est le cas en particulier des pneumocoques multi-résistants de sérotype 23F que l'on trouve sur les continents Américain, Africain et Européen (Munoz *et al.*, 1991). De la même façon, 1/5<sup>ème</sup> des pneumocoques de sérotype 6B étaient mondialement reconnus comme résistants à la pénicilline en 1993 (Livermore, 2003).

## 2. Une même tendance : l'augmentation de bactéries résistantes

Si plusieurs profils de résistances sont observables selon l'espèce bactérienne, la tendance semble générale, à savoir, une constante apparition de souches multi-résistantes et une augmentation régulière du nombre de ces bactéries résistantes. Une étude récente a été menée sur l'ensemble des Etats-Unis concernant l'évolution de Staphylocoques MRSA et multi-résistants (MRSA-MDR pour Multi Drug Resistant). L'augmentation de la proportion de ces MRSA-MDR est générale, quelque soit le lieu géographique ou même l'unité hospitalière. Cette proportion est en moyenne passée de 30 à 45% (Fig.3 courbe rouge), entre 1998 et 2005, aussi bien chez les patients pris en charge dans les hopitaux (Fig.3 courbe verte) que ceux présents dans l'ensemble de la communauté (Fig.3 courbe bleue). Dans ces deux populations, la majeure partie des MRSA isolés sont résistants à au moins trois antibiotiques différents (en plus de la méthicilline). Cependant, près de 100% de ces MRSA sont encore sensibles à la vancomycine (Styers *et al.*, 2006). Si certaines études rapportent l'apparition de *S. aureus* résistants à la vancomycine, ou VRSA (Tiwari and Sen, 2006), les auteurs précisent que pour le moment leur fréquence reste faible.

L'apparition de résistances aux glycopeptides (comme la vancomycine) est beaucoup plus fréquente chez les Entérocoques. On parle alors de VRE pour « Vancomycin Resistant Enterococci ». Les *Enterococci* étaient déjà responsables de 12% de l'ensemble des infections nosocomiales observées en milieu hospitalier il y 10 ans (Jones *et al.*, 1997). Ces infections sont dues à deux espèces en particulier : *Enterococcus faecium* (10 à 15%) et *E. faecalis* (85 à 89%) (Ruoff *et al.*, 1990). L'ensemble des souches d'Enterocoques s'avèrent naturellement résistantes à plusieurs antibiotiques comme les  $\beta$ -lactames, la Clindamycine et les Fluoroquinolones (Gold and Moellering, 1996). De plus, environ 50% des isolats d'*E.*

*faecium* issus d'infections nosocomiales étaient parfaitement résistants à la vancomycine dès 1993 (d'après le Centre de Surveillance et de Contrôle des pathogènes). Enfin, ces VRE montrent une forte capacité à acquérir rapidement toutes sortes de résistances et les médecins sont aujourd'hui confrontés à des souches insensibles à de nombreux autres antibiotiques comme le chloramphenicol, la tétracycline, la bacitracine, l'érythromycine ou la rifampicine (Linden and Miller, 1999). Ces VRE multi-résistants sont aujourd'hui classés au troisième rang des causes d'infections nosocomiales après les staphylocoques et les pneumocoques.

## B. Une mauvaise utilisation des antibiotiques

### 1. Dans le milieu médical

Un des rapports du CDC 2006 note que cette émergence de bactéries pathogènes résistantes suit l'augmentation massive de l'utilisation des antibiotiques lors des traitements médicaux. (CDC, mars 2006). Les traitements administrés lors d'infections par des bactéries pathogènes à Gram négatif de l'hôpital de New-york Queens, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, mettent clairement en évidence ce point (Fig.4) (Rahal *et al.*, 2002). Dans une population bactérienne pathogène, la majorité des bactéries sont sensibles à l'antibiotique utilisé mais la faible proportion de variants résistants est sélectionnée par la présence de cet antibiotique. Ainsi, suite aux diverses pressions de sélections engendrées par les traitements antibiotiques, l'unité de soins intensifs de l'hôpital de New-York Queens observe l'émergence de trois souches bactériennes issues de trois espèces différentes et possédant des résistances aux antibiotiques (Fig.4). Les médecins de cette unité ont, par ailleurs, remarqué que dans certains cas, la diminution de l'utilisation de l'antibiotique pouvait diminuer la proportion de bactéries résistantes dans la population bactérienne (Rahal *et al.*, 2002). Ainsi, le phénomène d'émergence ne semble-t-il pas irréversible et la stratégie employée lors de ces traitements doit donc être parfaitement contrôlée et calculée.

Les traitements antibiotiques médicaux sont répartis pour 20% d'entre eux en hôpitaux et 80% dans la communauté. Les statistiques indiquent que dans plus de 40% des cas, ces traitements n'ont pas lieu d'être (par exemple lors de traitements antiviraux, ou lorsque la bactérie cible a de forte chance de résister). Ainsi, depuis quelques années, les communautés scientifiques et médicales s'organisent afin d'identifier les résistances présentes chez les

pathogènes bactériens, de dénombrer ces résistances, de mieux informer les médecins, et enfin de tenter d'adapter chaque stratégie de traitement antibiotique si nécessaire. On peut citer plusieurs organisations participant à ce travail colossal : le CDC (Center for Disease Control) et le NFID (National Foundation for Infectious Diseases) aux USA, l'ANSORP (Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens) en Asie, l'EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) en Europe, ou encore l'ONERBA (Observatoire National de la Résistance Bactérienne) en France. Régulièrement, ces associations organisent des conférences pour étudier l'évolution des émergences et élaborer de nouvelles stratégies. Le rapport de l'une de ces organisations montre que l'utilisation des antibiotiques en Europe varie énormément selon les pays et que ceci corrèle avec les différentes émergences de résistances observées dans ces pays. Il est clair par exemple que les pays d'Europe du sud font face actuellement à un fort taux d'émergence de résistants de tout type (MRSA, PNSP...etc...). Cars *et coll.* montrent que la vente d'antibiotiques est beaucoup plus forte dans ces pays du sud (Cars *et al.*, 2001) (Fig.5). De manière beaucoup plus générale, le CDC corrèle la fréquence d'utilisation d'un antibiotique à l'occurrence de souches résistantes à cet antibiotique (Fig.6).

## 2. Dans le monde agricole

Le deuxième domaine dans lequel les antibiotiques sont fortement employés est l'agriculture et l'agro-alimentaire. On peut distinguer l'utilisation à des fins thérapeutiques (traitement d'une infection bactérienne, qui ne correspond qu'à 20% des cas), l'utilisation à des fins prophylactiques (prévention des infections bactériennes dans un élevage d'animaux par exemple) et enfin l'utilisation en tant qu'additif alimentaire. En effet, certaines substances antibiotiques possèdent d'autres propriétés que celle de combattre un micro-organisme, notamment celle de « facteur de croissance » important permettant une augmentation du poids des animaux d'élevage. Les statistiques concernant ces utilisations dans le monde agricole ne sont pas claires : on estime cependant que dans 40 à 80% des cas, elles doivent être remises en question. Bien qu'utilisés à des doses subthérapeutiques, les antibiotiques employés de façon chronique comme additifs alimentaires entraînent une pression de sélection sur l'ensemble des bactéries présentes dans les tractus digestifs d'animaux. De plus, les préparations de ces antibiotiques sont souvent impures et contiennent des molécules d'ADN provenant du micro-organisme producteur de l'antibiotique. Cet ADN contaminant peut contenir des déterminants génétiques de résistance susceptibles d'être facilement captés et intégrés par d'autres bactéries comme celles de la flore intestinale des animaux d'élevage



(Webb and Davies, 1993). Il est en outre montré que les fréquences de transfert d'ADN sont augmentées de 10 fois dans les milieux agraires riches tels que les sols chargés en nutriment ou les fumiers (Gotz and Smalla, 1997). L'agriculture, enfin, utilise des micro-organismes non-pathogènes comme bio-pesticides. C'est le cas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* ou encore *Paenibacillus popilliae*. Cette dernière a été employée, entre autre, pour combattre les insectes de type coléoptères au Japon et présente un niveau élevé de résistance à la vancomycine. Patel *et coll* supposent que les gènes de résistance à la vancomycine de *P. popilliae* sont à l'origine des gènes trouvés chez les *Enterococci* et conférant le même type de résistance à ces pathogènes (Patel *et al.*, 2000).

### C. Plasticité des Génomes bactériens et dissémination de résistances

On distingue deux types de résistances : les résistances innées ou naturelles et les résistances acquises. Une grande partie des antibiotiques étant produite par les bactéries, ces dernières possèdent des systèmes de résistance naturels leur conférant une immunité contre les antibiotiques qu'elles produisent. Certaines bactéries, bien que ne possédant pas de systèmes d'immunité peuvent, de part leur morphologie, résister naturellement à certains antibiotiques. C'est le cas par exemple des bactéries à Gram négatif qui sont résistantes à plusieurs antibiotiques grâce à l'imperméabilité importante que leur confère la présence de deux membranes. Les résistances innées permettent la sélection d'une bactérie dans un milieu contenant un antibiotique.

Les résistances acquises relèvent, quant à elles, de la grande plasticité des génomes bactériens et de l'adaptation rapide des bactéries à de nouvelles conditions stringentes (dues à la présence d'un antibiotique par exemple). La notion de résistance acquise est à la base de la compréhension de la dissémination des résistances dans plusieurs espèces bactériennes différentes. Quelques études mettent clairement en évidence ces disséminations de résistances à travers plusieurs espèces et écosystèmes différents. La vancomycine est un antibiotique peptidique ciblant la synthèse de la paroi bactérienne et la résistance à cet antibiotique est due à une modification de la machinerie de synthèse de la paroi aboutissant à la modification de la cible de la vancomycine. Les déterminants génétiques de cette résistance ont été identifiés chez les VRE (Entérocoques Résistants à la Vancomycine) comme codés par trois gènes nommés *vanA*, *vanH* et *vanX* (Cetinkaya *et al.*, 2000). La présence de gènes présentant de fortes similarités chez les micro-organismes du sol producteurs de vancomycine (*Streptomyces toyocaensis* et *Amycolatopsis orientali*) semble indiquer que ces gènes *van* ont

été transmis aux VRE à partir de ces microorganismes (Marshall *et al.*, 1998). Une autre étude, concernant la résistance à l'ampicilline, montre que l'utilisation excessive d'ampicilline a probablement entraîné la dissémination des gènes conférant cette résistance à partir d'*Escherichia coli* jusqu'aux pathogènes *Gonococci* et *Haemophilus influenzae* (Jacoby and Archer, 1991).

En réponse à de nouvelles conditions dans leur environnement, les bactéries ont la capacité de s'adapter rapidement. La présence d'un antibiotique dans un milieu peut induire une réponse complexe de la bactérie lui permettant de contrer l'effet de cet antibiotique en exprimant des systèmes de résistances, des systèmes de production d'autres antibiotiques ou encore en mettant en place des mécanismes lui permettant de faire varier son génome pour tenter d'acquérir de nouvelles résistances. L'acquisition d'un système spécifique de résistance donne à la bactérie un avantage sélectif certain en présence de cet antibiotique. Nous allons ici énumérer les différents mécanismes moléculaires présents chez les micro-organismes et responsables de la dynamique importante de leur génome.

## 1. Mutation naturelle du génome bactérien

Les séquençages de génomes bactériens se sont multipliés et accélérés ces dernières années depuis l'obtention du génome de *B. subtilis* par Kunst *et coll.* et d'*E. coli* par Blattner *et coll.* en 1997 (Blattner *et al.*, 1997; Kunst *et al.*, 1997). Des chercheurs ont alors réalisé des alignements multiples sur des génomes de bactéries de la même espèce. Ils ont pu mettre en évidence, pour chacune des espèces étudiées, des zones où le génome est très conservé (nommé génome squelette) mais aussi d'autres parties très variables. Le pourcentage de représentation de ces zones variables est différent selon les espèces. Il peut atteindre 30% du génome entier pour *E. coli*, 14% pour *S. aureus*, et seulement 1% pour *Chlamydomonas reinhardtii* (Chiapello *et al.*, 2005). Ces régions variables sont pour la plupart très petites (inférieures ou égales à 100 pb), intragéniques et ne semblent pas dues à de simples évènements d'insertions ou de délétions. En définitive, cette étude révèle l'existence d'une diversité génétique intra-espèce, et traduit un potentiel important de mutation pour le génome bactérien. Lorsque l'ADN bactérien se réplique, des substitutions de bases peuvent en effet avoir lieu avec une fréquence estimée à  $10^{-9}$  par gène (Bridges, 2001). Drake *et coll.* ont établi que plus un génome est grand moins le taux de mutations spontanées est important. Le génome humain a une fréquence de mutation estimée à  $10^{-11}$  soit 100 fois moins que celle des bactéries, alors que les génomes viraux ont des fréquences de  $10^{-7}$  soit 100 fois plus que celle

des bactéries (Drake *et al.*, 1998). Cette fréquence élevée de mutations permet une adaptation rapide et l'apport de nouveaux déterminants génétiques de résistance comme une augmentation d'expression des systèmes de rejets de l'antibiotique, une modification de certaines voies métaboliques cibles ou encore une modification de la cible même de l'antibiotique.

Les résistances aux fluoroquinolones synthétiques sont un bon exemple de ce dernier cas. Ces antibiotiques ont pour cible la DNA gyrase (sous-unité GyrA) et la topoisomérase IV, inhibant ainsi la réplication de l'ADN et sa ségrégation (Gellert *et al.*, 1977; Peng and Mariani, 1993). Les souches cliniques résistantes à ces fluoroquinolones ont souvent des mutations ponctuelles dans la région N-terminale de la sous-unité GyrA. Cette région a été nommée QRDR pour « Quinolone Résistance Déterminant Région » (Piddock, 1999). D'Costa *et coll.* ont analysé les mutations ponctuelles trouvées dans les régions QRDR des *Streptomyces* résistants à la ciprofloxacine (une fluoroquinolone). Ils ont pu confirmer que certaines mutations ponctuelles dans cette région confèrent une résistance élevée à ces micro-organismes (D'Costa *et al.*, 2006) (Fig.7).

Selon la théorie de Darwin, on peut dire que les antibiotiques ne provoquent pas les mutations mais qu'ils sélectionnent plutôt dans une population bactérienne donnée les variants résistants préexistants. Par ailleurs, les bactéries peuvent acquérir un état d'hypermutation de leur génome afin de favoriser l'apparition de ces variants résistants. (Bridges, 2001). C'est le cas de la bactérie pathogène opportuniste à Gram négatif *P. aeruginosa*. Cette bactérie doit faire face à de nombreux stress lorsqu'elle provoque une infection chronique par exemple dans les poumons de patients à fibroses kystiques. Ces conditions stringentes sont dues à la défense immunitaire du patient mais également aux différents traitements antibiotiques qu'il subit. Oliver *et coll.* ont mis en évidence que 36% des patients subissant une infection chronique à *P. aeruginosa* sont colonisés par une souche hypermutable (Oliver *et al.*, 2000). De plus, les auteurs corrélaient directement les phénotypes d'hypermutation et les résistances multiples aux antibiotiques. Comme on peut le voir sur la figure 8, les souches hypermutables résistent à de nombreux antibiotiques (Fig.8, barres noires). D'autre part, les souches non-hypermutables mais responsables d'infections chroniques (Fig.8, barres grises) semblent mieux résister que les souches isolées à partir de patients à infections aiguës (Fig.8, barres blanches). L'entrée de la bactérie dans un état d'hypermutation en réponse aux stress est connue sous le nom de Réponse SOS. C'est une réponse au stress qui implique des ADN polymérases alternatives et moins fidèles (Friedberg *et al.*, 1995). Certains antibiotiques, comme par exemple les fluoroquinolones, induisent cette réponse SOS et donc cette entrée en hypermutation chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* (Beaber *et al.*, 2004; Ysern *et al.*, 1990).

## 2. Les éléments mobiles de dissémination

Les bactéries possèdent toute une batterie d'éléments génétiques mobiles dans leur génome. Nous allons nous intéresser à ces éléments mobiles qui contiennent des déterminants de résistances aux antibiotiques. Une revue récente rapporte l'existence d'éléments mobiles contenant chacun plusieurs déterminants de résistances différents chez les bactéries à Gram positif. L'auteur parle d'un phénomène de « Bundling » (packaging ou empaquettement) (Rice, 2000). Ce phénomène optimise les disséminations de résistance par transferts horizontaux. Cette partie n'est pas destinée à expliquer en détail les mécanismes moléculaires de chaque élément mobile mais simplement à citer des exemples de déterminants génétiques de résistances portés par ces éléments.

### 2.1. Les plasmides

Certains plasmides, à spectre large, ont la capacité d'être transférés à plusieurs espèces bactériennes différentes. Un des premiers plasmides identifiés comme portant des déterminants de résistances est le plasmide TEM-1. Celui-ci, qui apporte une résistance aux  $\beta$ -lactames, s'est répandu très largement dans 60% des Enterobactéries et dans quelques souches de *P. aeruginosa* et *H. influenzae* (Livermore, 1995). La plupart des transferts de résistances dus aux plasmides se rencontrent chez les bactéries à Gram positif : des plasmides auto-transférables sont, par exemple, responsables de l'acquisition de résistance à la gentamycine et aux  $\beta$ -lactames chez *E. faecalis* (Rice and Murray, 1995), et de résistances à la gentamycine et à la mupirocine chez les *Staphylococci* (Udo and Jacob, 1998). L'identification de ces plasmides permet de prédire certaines résistances. En effet, les résistances à la gentamycine et aux  $\beta$ -lactames sont souvent codées par le même plasmide chez *E. faecalis*. L'observation simple d'une résistance aux  $\beta$ -lactames est alors synonyme d'une résistance à la gentamycine.

L'origine d'un plasmide codant pour des déterminants de résistance peut être chromosomique. Les résistances aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines sont portées par des plasmides qui semblent avoir pour origine les chromosomes d'espèces du genre *Streptomyces*, espèces qui produisent l'ensemble de ces antibiotiques (Trieu-Cuot *et al.*, 1987). Les facteurs qui déterminent la capacité d'un plasmide à se répandre largement ou non ne sont pas clairs. Bien que les déterminants TEM-1 et TEM-2 soient codés par le même type de plasmides, qu'ils confèrent le même type de résistance (aux  $\beta$ -lactames), et qu'ils diffèrent seulement d'un acide aminé, la dissémination du plasmide portant TEM-2 est dix fois moins importante que celle du plasmide portant TEM-1 (Livermore, 1995).

## 2.2. Les transposons

Leur mobilité n'est pas dépendante de la machinerie de l'hôte. Les transposons codent pour une transposase qui peut reconnaître des séquences appelées séquences d'insertions ou IS. Ces transposons sont très répandus chez les bactéries à Gram positif et sont l'exemple type du phénomène du « Bundling ». Chez *E. faecalis*, le transposon Tn5385 est un élément d'environ 65 kilobases qui code pour les résistances à la streptomycine, la tétracycline, la gentamycine, l'érythromycine, les  $\beta$ -lactames et le mercure chloridrique. Cet élément mobile est en fait un regroupement de plusieurs transposons (Rice, 2000) (Fig.9).

## 2.3. Les Intégrons

Ces éléments sont plus fréquemment rencontrés chez les bactéries à Gram négatif. Ce sont des systèmes de recombinaisons qui peuvent concentrer l'expression de plusieurs déterminants génétiques de résistance en amont d'un seul et même promoteur. Il a été reporté qu'ils intervenaient par exemple pour la dissémination des résistances aux sulfonamides et à la streptomycine (Hall, 1997).

L'identification de l'ensemble de ces éléments mobiles chez les micro-organismes a permis d'observer que les déterminants génétiques de résistances sont souvent concentrés et donc facilement transférables en bloc. Le fait qu'un élément mobile porte plusieurs résistances permet d'accélérer l'identification d'un patron de résistances pour une bactérie. Cependant, les conditions qui activent ou inhibent le transfert d'un élément mobile ne sont pas encore précises. Les plasmides peuvent par exemple être répliatifs, intégratifs, transférables ou non selon les conditions. De manière générale, les déterminants de résistances peuvent être non transférables un jour puis devenir hautement transférables le lendemain du fait d'une nouvelle insertion dans leur structure. En effet tous ces éléments mobiles sont interconnectés : un transposon peut se transposer dans un chromosome, un plasmide, un intégron ou encore dans un autre transposon. Par ailleurs, les bactéries sont capables d'accepter de l'ADN étranger dans leur génome indépendamment ou non de ces éléments mobiles.

### 3. Les mécanismes de transfert d'ADN

La transduction, mécanisme de transfert d'ADN médié par les bactériophages, a été proposée comme étant à l'origine de la dissémination rapide des résistances aux  $\beta$ -lactames chez les *Staphylococci*. La plupart des plasmides codant pour la production de  $\beta$ -lactamases font en effet 35 à 40 kilobases, ce qui correspond à la taille moyenne des génomes de bactériophages (Lyon and Skurray, 1987).

La transformation, capture d'ADN extérieur par la bactérie, est supposée être à l'origine de la résistance à la pénicilline chez *S. pneumoniae* (Dowson *et al.*, 1989). Si peu de bactéries ont la capacité d'être naturellement compétentes pour cette transformation, certaines espèces sont dites à hautes fréquences de transformation : c'est le cas des espèces du genre *Bacillus* ou *Streptomyces*, qui peuvent intégrer ou relâcher une grande quantité d'ADN. Cet ADN relâché dans l'environnement peut résister aux DNases durant plusieurs mois (Lorenz and Wackernagel, 1994).

La conjugaison, enfin, est définie comme le transfert de molécules d'ADN entre deux bactéries en contact direct. Cette conjugaison peut concerner des plasmides (appelés conjugatifs), des transposons ou d'autres segments d'ADN chromosomique. Les transferts par conjugaison sont souvent à spectre très large. Clewell *et coll.*, et Salyer et Schoemaker ont rapporté que le transposon conjugatif Tn916 peut se propager dans 50 espèces bactériennes différentes, réparties sur 24 genres différents (Clewell *et al.*, 1995; Salyers and Shoemaker, 1996).

En conclusion, les génomes bactériens présentent une très grande plasticité et ceci permet aux bactéries d'échanger des déterminants génétiques de résistance. D'autre part, les espèces microbiennes ne sont pas isolées dans leur niche écologique et ceci facilite les disséminations inter-espèces. A cela s'ajoute le fait que les gènes de résistances semblent stables, faciles à acquérir et difficile à perdre (Salyers and Amabile-Cuevas, 1997).

## D. Les bactéries non pathogènes : un réservoir de déterminants génétiques de résistance

Jusqu'à maintenant nous n'avons parlé que des résistances rencontrées dans le milieu médical. Il est évident que ce phénomène d'émergence de résistances concerne également les bactéries non pathogènes (aussi appelées non cliniques) rencontrées dans de nombreux écosystèmes comme le sol, l'eau et le tractus digestif des animaux.

### 1. Le résistome des bactéries du sol

Plusieurs études montrent l'existence de bactéries non pathogènes résistantes : bactéries à Gram négatif résistantes à la tétracycline isolées à partir de sédiments marins (Andersen and Sandaa, 1994), bactéries du sol du genre *Bacillus* résistantes à l'érythromycine (Weisblum, 1995), ou encore des cas de multi-résistances (ampicilline, érythromycine et streptomycine) chez des espèces du genre *Bacillus*, *Aeromonas* et *Enterobacter* isolées à partir de terre de remblais (Nwosu and Ladapo, 1999). Une autre étude a été effectuée sur les *Streptomyces*, micro-organismes du sol et producteurs d'antibiotiques. Les auteurs ont testé la résistance de 480 souches du genre *Streptomyces* à 21 antibiotiques différents (dont des antibiotiques synthétiques et semi-synthétiques c'est-à-dire non naturels). Toutes les souches sont résistantes à au moins 7 antibiotiques différents et deux d'entre elles résistent à 15 antibiotiques différents (y compris des antibiotiques non produits dans leur niche écologique). En outre, la daptomycine, antibiotique très récent encore utilisé en médecine, est déjà inefficace sur ces micro-organismes. Cette étude montre l'ampleur de l'émergence de bactéries résistantes au niveau du sol et la variété des profils de résistances dans une même espèce bactérienne (plus de 200 profils de résistances différents) (D'Costa *et al.*, 2006) (Fig.10).

Le ROAR (pour Reservoir Of Antibiotic Resistance network) est l'une des seules organisations à s'intéresser au dénombrement des résistances dans ces micro-organismes. Il s'attache à le faire à l'aide d'approches globales sur l'ensemble d'un écosystème. Le terme de réservoir de résistances (ou de résistome) est aujourd'hui souvent employé lorsque l'on parle de l'ensemble des déterminants génétiques de résistance présents dans un écosystème. Le sol, nous venons de le voir, en est l'exemple type. L'étude de ces réservoirs de résistances est très récente et encore incomplète. D'Costa *et coll.* précisent que leur étude sur les *Streptomyces* ne reflète qu'une petite partie de ce que doit contenir aujourd'hui le réservoir du sol (D'Costa *et al.*, 2006).

## 2. Des bactéries ubiquitaires au centre des disséminations

L'importance de ces approches globales réside dans le fait que les micro-organismes ne sont pas isolés dans leur niche écologique mais bien en perpétuel contact avec d'autres micro-organismes. Les bactéries non pathogènes et ubiquitaires, comme *Bacillus subtilis*, se retrouvent en contact avec toutes sortes de bactéries diverses, y compris les pathogènes, et jouent donc un rôle primordial dans la dissémination des déterminants génétiques de résistance. De part ces interactions, ces bactéries sont supposées servir de pont entre les différents écosystèmes (Nwosu, 2001) (Fig.11). En observant la figure 11 on peut facilement imaginer que les déterminants génétiques de résistances puissent être transférés d'un écosystème à un autre. D'Costa *et coll.* prédisent par exemple que la résistance à la daptomycine, très présente chez les *Streptomyces*, devrait émerger chez les pathogènes humains (D'Costa *et al.*, 2006).

## 3. Le groupe des Firmicutes, un groupe ubiquitaire producteur d'antibiotiques et contenant de nombreux pathogènes

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à étudier la résistance à un antibiotique peptidique, la bacitracine, chez la bactérie modèle des bactéries à Gram positif, *B. subtilis*. Le groupe *Bacillus/Clostridium*, auquel appartient *B. subtilis*, est également nommé groupe des Firmicutes, et contient exclusivement des bactéries à Gram positif avec un génome à faible pourcentage de G+C. On peut distinguer par analyse phylogénétique trois classes différentes chez les Firmicutes, à savoir, les *Bacilli* (regroupant les espèces de genre *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Listeria*), les *Clostridia*, et enfin les *Mollicutes* (espèces de genre *Mycoplasma*). Cependant, les dernières études de génomique comparative semblent proposer que la classe des *Mollicutes* appartienne à un phylum isolé (Fig.12) (Bern and Goldberg, 2005; Ludwig and Klenk, 2001; Sanchez-Perez *et al.*, 2004).

Outre de nombreuses bactéries non-cliniques et ubiquitaires, telle que *B. subtilis*, le groupe des Firmicutes contient de nombreux pathogènes comme *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis*, *Clostridium tetani* ou encore *S. pneumoniae*.

De plus, la plupart des Firmicutes produisent des antibiotiques et plusieurs études tentent de répertorier ces antibiotiques naturels et d'identifier les gènes codant pour la synthèse de ces antibiotiques. Pour le seul genre *Bacillus* par exemple, on distingue un très grand nombre d'antibiotiques différents (Tagg *et al.*, 1976) avec par exemple :



- la bacitracine et la lichenysine produites par *B. licheniformis* (Froyshov and Laland, 1974; Konz *et al.*, 1999)
- la gramicidine S et la tyrocidine, synthétisées par *B. brevis* (Figenschou *et al.*, 1967; Mootz and Marahiel, 1997)
- la fengycine, la mycosubtiline et la surfactine produites par *B. subtilis* (Chen *et al.*, 1995; Cosmina *et al.*, 1993; Duitman *et al.*, 1999)

De la même manière, une étude récente met en évidence la diversité importante des antibiotiques synthétisés par les Firmicutes de genre *Streptococcus* et *Entérocooccus* (Fig.13) (Nes *et al.*, 2006).

La synthèse d'un antibiotique par la bactérie lui confère un avantage sélectif dans sa niche écologique. Cette synthèse s'accompagne toujours de la mise en place d'un mécanisme d'immunité dirigé contre l'antibiotique produit. Le groupe des Firmicutes constitue donc un réservoir important de déterminants génétiques de production d'antibiotiques et de résistance à ces antibiotiques. De plus, il contient d'une part, des bactéries ubiquitaires qui sont au centre de la dissémination des résistances dans les divers écosystèmes et, d'autre part, de nombreux pathogènes. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la résistance aux antibiotiques chez la bactérie modèle des Firmicutes, *B. subtilis*.

## II - Les Antibiotiques naturels ciblant l'enveloppe bactérienne : Diversité, Classification et Mode d'action

Contrairement aux antibiotiques dits synthétiques ou semi-synthétiques, les antibiotiques dits naturels sont produits par un grand nombre d'organismes répartis dans tous les règnes du vivant. Cependant, les plus grands producteurs d'antibiotiques sont les bactéries et les champignons.

Par définition, les antibiotiques interfèrent avec les mécanismes permettant à la bactérie d'assurer ses fonctions essentielles. Ces dernières sont la réplication de son matériel génétique, la transcription, la synthèse protéique, le métabolisme intra-cellulaire, et enfin le maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne (Fig.14). Le spectre d'action des antibiotiques naturels s'étend sur l'ensemble de ces fonctions (Boman, 1995), cependant, nombre d'entre eux ont pour cible l'intégrité de l'enveloppe bactérienne. Au cours de ma thèse, nous nous sommes principalement intéressés à ces antibiotiques qu'on appelle « Cell Wall active » ou « Membrane active ». Avant de préciser comment les antibiotiques peuvent perturber l'enveloppe bactérienne, nous allons décrire brièvement les constituants de cette enveloppe et les mécanismes nécessaires à leurs biosynthèses.

### A. L'enveloppe Bactérienne : Importance, Structure et Biosynthèse

#### 1. Composition et fonction

C'est une structure entourant et protégeant le cytoplasme de la bactérie. La composition de cette enveloppe différencie fondamentalement les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif (Fig.15). Les deux types d'enveloppe bactérienne sont constitués d'une membrane plasmique interne, d'un espace périplasmique et d'une paroi majoritairement composée de peptidoglycane. L'épaisseur de la paroi est faible pour les bactéries à Gram négatif avec seulement deux couches de peptidoglycane ce qui est dix fois moins épais que pour les bactéries à Gram positif. Cependant, les bactéries à Gram négatif sont dotées d'une membrane externe additionnelle qui renforce leurs imperméabilités à de nombreuses drogues et antibiotiques. La paroi de peptidoglycane est en effet perméable aux petites molécules. De

cette différence d'enveloppe dépend donc directement d'une différence de sensibilité entre les deux groupes (Nikaido, 1999).

### 1.1. La membrane cytoplasmique

Elle est composée d'une bicouche de phospholipides et contient des protéines intrinsèques. Parmi les phospholipides on trouve surtout chez *B. subtilis* les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylglycérols (PG) qui représentent à eux deux 65 % des phospholipides membranaires (Mendoza *et al.*, 2002). La proportion restante correspond à des cardiolipines et à une forme estérifiée du PG (Mendoza *et al.*, 2002). Cette membrane est hydrophobe, fluide et fonctionne comme une barrière qui empêche la fuite des constituants hydrophiles cytoplasmiques. D'autre part, cette membrane est à la base de tous les échanges s'effectuant entre la bactérie et son milieu extérieur. Elle contient donc, et nous y reviendrons, des protéines de détection des conditions du milieu extérieur (senseurs) ainsi que des protéines de transports intervenant dans l'obtention de nutriments essentiels (Fig.16). Une des caractéristiques importantes de la membrane cytoplasmique est qu'elle est imperméable aux protons. Cette propriété est utilisée par la bactérie afin d'énergiser la membrane par le gradient de protons qui en résulte. On trouve ainsi dans la membrane les systèmes enzymatiques nécessaires à la transmission d'énergie et à la phosphorylation oxydative (Fig.16). Ces enzymes permettent à la bactérie de synthétiser l'ATP, molécule énergétique indispensable à de nombreux transports et beaucoup d'activités enzymatiques cellulaires.

Contrairement aux membranes plasmiques des cellules eucaryotes qui sont neutres, les membranes plasmiques bactériennes ont la caractéristique propre de présenter à leur surface une charge nette négative due aux divers groupements phosphates des phospholipides anioniques. Cette propriété est largement utilisée par de nombreux antibiotiques ciblant spécifiquement ces membranes bactériennes.

### 1.2. La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est principalement formée d'un polymère de peptidoglycane. Les monomères de peptidoglycane sont assemblés de façon ordonnée afin de former plusieurs couches rigides qui entourent la bactérie et lui confèrent une résistance essentielle pour contrer la forte pression osmotique intra-cellulaire. Cette pression varie énormément suivant le type de bactéries. Elle est mesurée à 3 atmosphères (atm) pour *E. coli* alors qu'elle atteint

25 atm chez *B. subtilis*. L'absence de paroi provoque ainsi une lyse rapide de la cellule. La mobilité bactérienne nécessite également la présence de cette paroi. En effet, les structures flagellaires permettant cette mobilité ont besoin d'exercer une force sur une surface solide (la paroi) afin de permettre le mouvement. Enfin, la paroi joue un rôle prépondérant lors de la division cellulaire ou encore de la sporulation, essentiellement chez les bactéries à Gram positif. Chez ces dernières, la formation du septum de division, et donc la séparation finale des deux cellules filles, se fait par synthèse de peptidoglycane. D'autre part, l'étape de confinement de la spore naissante (« engulfment ») est également dépendante d'une synthèse accrue de peptidoglycane.

Outre le peptidoglycane, on peut trouver dans la paroi d'autres molécules et leur nature diffère énormément entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, on trouve essentiellement une molécule lipoprotéique nommée lipoprotéine de Braun. Cette protéine a un rôle structural car elle relie la mince couche de peptidoglycane à la membrane externe maintenant ainsi un espace constant entre ces deux structures (Fig.15). Elle contribue donc à la stabilité et à la rigidité de l'enveloppe (Braun, 1975). Chez les bactéries à Gram positif, on trouve dans la paroi d'autres polymères appelés polymères secondaires (en référence au polymère primaire constitué par le peptidoglycane) : les acides téichoïques, teichuroniques et lipotéichoïques (Fig.15). Les acides téichoïques sont formés d'un squelette d'alditol (glycérol ou ribitol) connecté par liaisons phosphates. Ils sont reliés aux résidus N-acétylmuramique du peptidoglycane et chargés négativement. Ils sont insérés dans les mailles de peptidoglycane. Les acides teichuroniques sont constitués du même squelette glycérol ou ribitol non plus connecté par le phosphate mais par l'acide uronique, ce qui maintient la charge nette négative de la paroi. Ainsi, les acides teichuroniques sont-ils souvent substitués aux acides téichoïques en condition de carence en phosphate. Les acides lipotéichoïques, enfin, sont aussi très similaires aux acides téichoïques mis à part qu'une de leur extrémité possède un acide gras qui permet d'ancrer la molécule au niveau de la membrane plasmique. Ceci augmente la stabilité et le maintient du peptidoglycane autour de la membrane plasmique.

## 2. Synthèse et structuration du constituant majeur de la paroi : le peptidoglycane

Le mécanisme de synthèse du peptidoglycane est conservé dans l'ensemble des bactéries et est un processus biochimique spécifique non retrouvé chez les autres organismes. De plus, ce processus est crucial pour l'ensemble des bactéries. Ces caractéristiques en font une cible majeure pour les antibiotiques (Koch, 2003).

Les précurseurs monomériques de peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme bactérien puis transloqués au niveau de l'espace périplasmique afin de renouveler constamment le peptidoglycane préexistant. Les couches naissantes sont donc du côté de l'espace périplasmique et les anciennes couches font face au milieu extra-cellulaire. Chez *B. subtilis*, la synthèse de peptidoglycane se fait de manière hélicoïdale (Jones *et al.*, 2001; Leaver and Errington, 2005). Des auteurs sont parvenus à la suivre en utilisant notamment des antibiotiques peptidiques ciblant cette synthèse de paroi et marqués avec des fluorochromes (Tiyanont *et al.*, 2006). Cette synthèse ordonnée de peptidoglycane détermine la forme de la bactérie (un batonnet dans le cas de *B. subtilis*).

On distingue plusieurs étapes dans cette synthèse de peptidoglycane suivant leur localisation cellulaire. Les étapes primaires ont pour but la synthèse du précurseur monomérique de peptidoglycane ; l'étape secondaire consiste en la translocation de ces monomères à travers la membrane plasmique vers l'espace périplasmique ; et les dernières étapes consistent en l'assemblage des polymères et des couches de peptidoglycane.

### 2.1. Formation du précurseur monomérique

Tous les enzymes participant à la synthèse du précurseur monomérique de peptidoglycane sont cytoplasmiques. Le processus débute par la formation d'UDP-N-acétylglucosamine-énolpyruvate qui est transformé en UDP-N-acide-acétylmuramique (UDP-NAM), auquel est ensuite ajouté une chaîne pentapeptidique. L'UDP-NAM-pentapeptide ainsi formé est localisé au niveau de la membrane plasmique par fixation à l'Undécaprénol-Phosphate (ou UP). Cette molécule lipidique joue un rôle de translocateur essentiel, nous le verrons, dans le transport du précurseur du cytoplasme vers l'espace périplasmique. De cette fixation de l'UDP-NAM-pentapeptide à l'UP résulte une molécule à localisation subcellulaire, l'UPP-NAM-pentapeptide, ou lipide I, et où le translocateur lipidique est sous forme pyrophosphorylée (UPP pour Undécaprényl-PyroPhosphate). La dernière étape de

formation du précurseur se fait par liaison d'une molécule d'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-NAG) à l'UPP-NAM-pentapeptide donnant la molécule UPP-NAM-NAG-pentapeptide, appelée plus simplement Lipide II (Archibald *et al.*, 1993) (Fig.17). Suivant les espèces bactériennes, quelques différences apparaissent au niveau de la composition du pentapeptide. Chez *S. aureus* par exemple, le résidu L-Lysine remplace le résidu meso-acide-diaminopimélique (Archibald *et al.*, 1993). Les enzymes clés intervenant dans les étapes primaires de la synthèse de peptidoglycane ont été en grande partie identifiées chez *B. subtilis* et *E. coli* (Foster and Popham, 2002).

## 2.2. La translocation du précurseur

L'assemblage du lipide II, en particulier réalisé par les enzymes MraY et MurG, se déroule entièrement du côté cytoplasmique (Bupp and van Heijenoort, 1993) (Fig.18). Par ailleurs, la polymérisation des monomères de peptidoglycane ne se déroule pas du côté interne de la membrane. Les enzymes catalysant l'assemblage du peptidoglycane ont en effet été localisées du côté externe chez *B. subtilis* (Harrington and Baddiley, 1983). Ainsi, une des étapes majeures de la synthèse du peptidoglycane consiste en la translocation du lipide II du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane et les mécanismes impliqués dans cette translocation sont largement inconnus (Fig.18).

Le lipide d'ancrage du précurseur, l'undécaprénylpyrophosphate (ou UPP), appartient à la famille des polyisoprénylphosphates. Ces molécules fortement hydrophobes sont constituées d'un assemblage de sous-unités isoprènes avec une extrémité hydrophile formée de deux groupements phosphates. Cette famille regroupe un grand nombre de molécules lipidiques qui se différencient par le nombre de sous-unités isoprènes qui les constitue et donc par la taille de leur chaîne carbonée. L'UPP, quant à lui, est constitué de 11 sous-unités isoprènes constituant une chaîne de 55 carbones ce qui a conduit à le nommer également C<sub>55</sub>-Isoprénylpyrophosphate. L'enzyme catalysant la polymérisation finale de ces sous-unités en UPP a été caractérisée chez *E. coli* et se nomme UppS pour UPP synthase (Fujihashi *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1999). Les premières études biochimiques du comportement de ces lipides polyisoprènes dans la bicouche lipidique ne mettent pas en évidence leur possible capacité à se transloquer entre les deux feuillets de la bicouche (Hanover and Lennarz, 1979; McCloskey and Troy, 1980). Cependant, les propriétés physiques de l'UPP et sa grande chaîne hydrophobe sont compatibles avec une translocation par diffusion passive du lipide (Koch, 1995). D'autres études structurales montrent en outre que le précurseur monomérique NAM-NAG-pentapeptide fixé à l'UPP adopte une conformation compacte avec une surface

fortement hydrophobe, ce qui pourrait faciliter la diffusion passive du lipide II entre les feuillets membranaires (Koch, 1991; Labischinski *et al.*, 1985). Cette hypothèse de diffusion passive est fortement contestée par le rendement important nécessaire à la cellule pour renouveler constamment son peptidoglycane. L'activité importante nécessaire à cette synthèse favorise l'hypothèse d'un mécanisme actif de transport du lipide II avec l'intervention d'une flippase membranaire (Nanninga, 1998), dont l'existence n'a pas été démontrée.

L'UPP est également impliqué dans la synthèse des autres constituants de la paroi bactérienne, les acides téichoïques, lipotéichoïques mais également les oligosaccharides. Les précurseurs de ces constituants sont également synthétisés au niveau du cytoplasme, puis ancrés au niveau du feuillet interne de la membrane par le lipide UPP. Des transporteurs membranaires ont été identifiés comme jouant un rôle dans la translocation de ces précurseurs vers l'espace périplasmique. Le transporteur de type ABC TagGH hydrolyse l'ATP afin d'exporter les précurseurs de l'acide téichoïque Poly(glucosyl-NAG-1-phosphate) fixé à l'UPP vers le feuillet externe membranaire (Freymond *et al.*, 2006). De la même manière, la translocation des précurseurs d'oligosaccharides fixés à leur lipide d'ancrage est réalisée par la translocase Wzx chez les bactéries à Gram négatif, par l'ABC transporteur PglK chez les bactéries à Gram positif et par la flippase Rft1 chez les eukaryotes (Alaimo *et al.*, 2006). Cependant, aucune protéine membranaire pouvant jouer un rôle de translocation lors de la synthèse de peptidoglycane n'a été mise en évidence à ce jour.

### 2.3. Polymérisation et structuration du peptidoglycane

Les étapes de polymérisation se déroulent du côté externe de la membrane plasmique. Elles font intervenir deux types de réaction. Les transglycosylations, catalysées par les transglycosylases, permettent tout d'abord de relier les composés sucrés des précurseurs (NAM-NAG) entre eux afin de former une chaîne glycosidique entre les différents monomères (NAM-NAG-NAM-NAG...). Ces liaisons sont de type  $\beta$ 1-4 et leur longueur peut varier d'une bactérie à l'autre. *S. aureus* assemble par exemple 20 unités disaccharidiques (NAM-NAG) alors que *B. subtilis* polymérise jusqu'à 100 unités de ce type (Tipper and Strominger, 1968; Ward, 1973). Puis, les réactions de transpeptidations, catalysées par les transpeptidases, forment les liaisons covalentes entre les différentes unités pentapeptidiques des précurseurs. Cette liaison est directe chez *B. subtilis* ou *E. coli* : le résidu D-alanine en 4<sup>ème</sup> position d'un premier précurseur est ainsi relié au résidu meso-acide diaminopimélique en 3<sup>ème</sup> position d'un autre précurseur. Chez *S. aureus*, comme chez beaucoup d'autres

bactéries à Gram positif, la liaison peptidique entre deux précurseurs fait intervenir un pont peptidique formé de 5 résidus glycine (Archibald *et al.*, 1993).

Enfin, la maturation du peptidoglycane est complétée par des carboxypeptidases pouvant cliver les résidus D-alanine sur les pentapeptides. Suivant les bactéries, la proportion de chaînes pentapeptidiques reliées entre elles dans la paroi varie énormément. Elle est généralement faible (20 %) pour les bactéries à Gram négatif (à fine couche), alors qu'elle est maximale (proche de 100%) chez les bactéries à Gram positif (à couche épaisse) (Labischinski and Maidhof, 1994). Ces liaisons nécessitent la présence de chaîne pentapeptidique complète comme donneuse. Ainsi, la proportion de transpeptidation dans une paroi dépend entre autres de l'activité des carboxypeptidases qui peuvent rendre les chaînes pentapeptidiques inaptées à cette transpeptidation (Delcour *et al.*, 1999).

#### - Les PBPs (Penicillin Binding Proteins)

Les enzymes participant à la polymérisation du peptidoglycane sont des protéines appartenant à la famille des PBPs, tirant leur nom du fait qu'elles sont les cibles d'antibiotiques de la famille de la pénicilline, les  $\beta$ -lactames. Ces enzymes ont été réparties en trois classes. Les classes A et B regroupent les PBPs à hauts poids moléculaires (> à 60 kDa), multimodulaires et plurifonctionnelles. La troisième classe contient des PBPs à petits poids moléculaires (< à 60 kDa) et monofonctionnelles.

Les PBPs de classe A sont bi-fonctionnelles avec une activité transglycosylase portée par leur partie N-terminale et une activité transpeptidase sur leur partie C-terminale (Goffin and Ghuysen, 1998). Les Firmicutes ont pour la plupart plusieurs PBPs de classe A. Cette redondance vient probablement du fait que ces PBPs interviennent dans une fonction essentielle de la bactérie (Foster and Popham, 2002). Les PBPs de classe B ont également un domaine C-terminal à activité transpeptidase mais la fonction de leur domaine N-terminal est encore inconnue. Il est supposé qu'il intervienne dans la localisation d'autres protéines ou encore que son rôle soit uniquement structural et permette à la protéine d'avoir une conformation correcte (Goffin *et al.*, 1996). Beaucoup de PBPs de classe B interviennent dans la formation de peptidoglycane lors de processus cellulaires spécifiques. Chez *B. subtilis* par exemple, la protéine PBP 2b est nécessaire à la formation du septum lors de la division cellulaire (Yanouri *et al.*, 1993), alors que la PBP SpoVD est requise pour la synthèse du peptidoglycane du cortex recouvrant la spore (Daniel *et al.*, 1994).

On trouve par ailleurs six gènes codant pour des PBPs à bas poids moléculaires chez *B. subtilis*. Deux d'entre elles, PBPs 5 et 5\*, ont été montrées comme étant des D-D-carboxypeptidases clivant les chaînes pentapeptidiques non reliées en les réduisant en



tripeptides (Lawrence and Strominger, 1970; Todd *et al.*, 1985). PBPs 5\* intervient plus spécifiquement lors de la synthèse de peptidoglycane de la spore naissante. Par homologie de séquences, deux autres protéines DacC et DacF sont prédites comme ayant les mêmes fonctions que PBPs 5 et PBPs 5\* respectivement. Les deux dernières PBPs à bas poids moléculaires de *B. subtilis*, codées par *pbpE* et *pbpX*, sont supposées agir comme des endopeptidases pouvant cliver les liaisons croisées reliant les différentes chaînes pentapeptidiques et ceci par homologie à une PBP d'*E. coli* (Korat *et al.*, 1991).

#### - Activité autolytique et renouvellement des couches de la paroi

Le renouvellement des couches de peptidoglycane se fait au niveau des couches préexistantes les plus proches de la membrane plasmique. Il a été montré que les couches les plus anciennes sont poussées vers la surface externe de la paroi au fur et à mesure que de nouvelles couches sont ajoutées du côté interne. Les couches parvenant à la surface externe sont dégradées et relâchées dans le milieu extracellulaire. L'activité de synthèse de peptidoglycane n'est pas uniforme sur toute la surface cellulaire. Pendant la croissance, elle est par exemple plus faible au niveau des pôles. Par ailleurs, lors de la division cellulaire, l'activité est concentrée au centre de la cellule et permet la formation du septum. Ceci a été montré en observant notamment que les PBPs de classe A localisent généralement au site de septation (Pedersen *et al.*, 1999). Ce renouvellement constant des couches de peptidoglycane nécessite, outre les carboxypeptidases, l'action d'autres protéines appelées autolysines. Ces enzymes peuvent cliver spécifiquement certaines liaisons au niveau du polymère de peptidoglycane. Il existe de nombreuses enzymes de ce type chez *E. coli* et *B. subtilis* et elles sont classées suivant leur spécificité de substrat. On trouve des muramidases, des hydrolases, des transglycosylases lytiques, des amidases et plusieurs endopeptidases (Holtje, 1998; Smith *et al.*, 2000). Le renouvellement des couches de peptidoglycane nécessite l'action de ces autolysines car elles ouvrent de nouveaux espaces dans la structure. Si des complexes PBPs/Autolysines ont bien été mis en évidence chez *E. coli* (Romeis and Holtje, 1994; Vollmer *et al.*, 1999), ce n'est pas le cas chez *B. subtilis*. Les mécanismes de localisation spatiale et temporelle des autolysines, déterminant une croissance ordonnée du peptidoglycane, sont peu documentés. Chez *B. subtilis*, cependant, il a été montré que des structures filamenteuses de type « actine » interagissent avec les autolysines et interviennent dans la croissance hélicoïdale de la paroi (Carballido-Lopez *et al.*, 2006).

## - Structuration de la maille de peptidoglycane

La première modélisation physique du peptidoglycane supposait que les chaînes glycosidiques forment une hélice tournant dans le sens des aiguilles d'une montre. Les chaînes pentapeptidiques émergent successivement de cette hélice des sous-unités NAM et forment, si on les compare l'une avec l'autre, un angle de 90° dans l'espace (Holtje, 1998; Labischinski and Johannsen, 1986). Dans un même plan, les polymères de peptidoglycane forment alors une structure appelée « Tessera ». C'est une structure hexagonale à 6 côtés, dont 4 sont formés par les chaînes glycosidiques NAG-NAM, et 2 par des liaisons croisées entre chaînes pentapeptidiques (Koch, 1998) (Fig.19). Les « tessera » connectés entre eux sur un même plan forment une structure en mailles similaire aux structures observées dans les nids d'abeilles. Les longueurs des chaînes glycosidiques étant variables suivant les bactéries, la répétition des hexagones est supposée non parfaite mais suffisante pour couvrir et protéger la membrane plasmique. Le diamètre de l'hexagone est estimé entre 3 et 5 nm ce qui est en accord avec les études de perméabilité du peptidoglycane qui ont montré que les macromolécules de plus de 25 kDa ne peuvent franchir ces mailles (Demchick and Koch, 1996). D'autres études structurales plus récentes ont permis de modéliser l'architecture du peptidoglycane. Les auteurs montrent que la structure n'est pas parfaite car certaines liaisons croisées entre pentapeptides sont absentes et de ce fait la taille des pores formés varie (Meroueh *et al.*, 2006). Ce résultat corrèle avec une autre observation effectuée par microscopie à force atomique sur la paroi de *S. aureus*. Cette étude montre que la taille des pores du peptidoglycane de *S. aureus* varie de 5 à 50 nm (Touhami *et al.*, 2004). Ainsi, le peptidoglycane est à la fois une structure rigide, mais non parfaite, et donc élastique. Ces propriétés lui permettent de résister et de s'adapter à la pression osmotique et aux diverses tensions de surface dues notamment à la morphologie bactérienne (Dmitriev *et al.*, 2005).

### 2.4. Régénération du translocateur lipidique

La biosynthèse du peptidoglycane est un mécanisme cyclique permettant une constante régénération des couches de la paroi (Fig.20). L'étape qui termine ce cycle est la régénération de l'Undécaprénylmonophosphate ou UP, seule molécule capable de fixer un nouveau précurseur NAM-pentapeptide. Une fois le précurseur monomérique (NAG-NAM-pentapeptide) transloqué et incorporé dans la paroi, l'UPP doit, d'une part, se transloquer à nouveau dans le feuillet interne de la membrane et, d'autre part, retrouver sa forme monophosphorylée, UP (Fig.20). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette dernière

étape restent très largement inconnus. On ignore encore si la réaction de déphosphorylation de l'UPP en UP prend place i) du côté externe de la membrane et donc avant sa translocation ii) au même moment que la translocation de l'UPP dans le feuillet interne de la membrane ou enfin iii) du côté interne de la membrane après sa translocation. En outre, le mécanisme agissant dans la translocation de l'UPP libre dans le feuillet interne de la membrane reste également inconnu et les hypothèses sur l'intervention ou non d'un mécanisme de transport actif restent non démontrés.

De nombreuses études, par contre, ont permis de caractériser les enzymes intervenant dans la déphosphorylation de l'UPP en UP. Ces enzymes sont des protéines membranaires nommées UPP Phosphatases (UppP sur la Fig.20). Leur activité est essentielle pour la bactérie et, de ce fait, les microorganismes possèdent de manière redondante plusieurs UPP phosphatases différentes. Ceci a clairement été mis en évidence chez *E. coli* par El Ghachi *et coll.* Les auteurs ont caractérisé chez cette bactérie 4 UPP phosphatases nommées BacA, PgpB, YbjG et YeiU. L'absence de trois d'entre elles (BacA, PgpB et YbjG) est létale pour la cellule (El Ghachi *et al.*, 2005). Ces protéines ont toutes 5 à 8 fragments transmembranaires et appartiennent à deux familles différentes.

BacA, appartenant à la première famille, prend en charge à elle seule 75% de l'activité UPP phosphatase de la cellule et est très similaire aux protéines BacA identifiées respectivement chez *S. aureus* et *S. pneumoniae* (Chalker *et al.*, 2000). La protéine hypothétique YubB de *B. subtilis* est un homologue de BacA et est supposée comme essentielle à la survie de cette bactérie (Cao and Helmann, 2002). Cependant, El Ghachi *et coll.* ont montré que la délétion du gène codant pour BacA n'est pas létale pour *E. coli*, étant donné la présence de 3 autres UPP phosphatases chez cette bactérie (El Ghachi *et al.*, 2004).

La deuxième famille, à laquelle appartiennent PgpB, YbjG et YeiU, est très bien caractérisée et appelée famille des Phosphatases Acides Phosphatidiques ou PAP<sub>2</sub>. Cette famille regroupe un grand nombre de protéines impliquées dans de nombreuses voies métaboliques différentes. On y trouve la Glucose-6-phosphatase de *Homo sapiens* (Lei *et al.*, 1993), une phosphatase acide de *Mus musculus*, la protéine PgpB d'*E. coli* qui a une double activité UPP phosphatase et phosphatidylglycérolphosphate phosphatase (Icho and Raetz, 1983), la phosphatase acide non-spécifique PhoN de *Salmonella typhimurium* (Kasahara *et al.*, 1991), la sphingosine-1-phosphate phosphatase de *H. sapiens* (Ogawa *et al.*, 2003) ou encore la phosphotyrosyl phosphatase de *Prevotella intermedia* (Chen *et al.*, 1999). La première protéine de type PAP<sub>2</sub> a été caractérisée à partir de fractions membranaires de l'archaebactérie *Sulfolobus acidocaldarius* comme ayant une activité pyrophosphatase sur une molécule phospholipidique, le dolicholpyrophosphate (Meyer and Schafer, 1992). Un peu plus tard, Stukey et Carman ont mis en évidence que toutes les protéines de type PAP<sub>2</sub> ont un

motif caractéristique très conservé dans leur séquence peptidique et rassemble des protéines présentes aussi bien chez l'homme, la souris, les bactéries et les archaebactéries (Stukey and Carman, 1997) (Fig.21). Ce motif **(K/G)X<sub>6</sub>RP-(X<sub>12-54</sub>)-PSXH-(X<sub>31-54</sub>)-SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D** est notamment retrouvé chez les trois UPP phosphatases caractérisées chez *E. coli*.

Comme nous l'avons dit plus haut, l'UPP appartient à la famille des polyisoprénylpyrophosphates dont font partie également le farnésylpyrophosphate (FPP), le géranylpyrophosphate (GPP) ou encore le diméthyl-allyl-pyrophosphate. Toutes ces molécules diffèrent au niveau de la longueur de leur chaîne carbonée hydrophobe. Des études ont montré que plus la chaîne carbonée du polyisoprénylpyrophosphate est longue, plus la phosphatase qui hydrolyse cette molécule est spécifique de son substrat (Bohnenberger and Sandermann, 1976; Goldman and Strominger, 1972).

## B. Diversité des antibiotiques ciblant la paroi

Aujourd'hui, plusieurs centaines de substances naturelles à activité antibiotique sont répertoriées. Il existe plusieurs méthodes de classification de ces antibiotiques, à savoir selon leur similarité de structure, leur origine, leur mécanisme d'action ou leur cible. Les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne sont de toute nature à savoir non-peptidiques, peptidiques à synthèse ribosomale et enfin peptidiques à synthèse non-ribosomale (Fig.22).

### 1. Les antibiotiques peptidiques à synthèses non-ribosomales

Ils sont exclusivement synthétisés par les Bactéries et les Champignons. Leur composition en acides aminés ne dépend pas d'un transcrit de type ARN messenger, ainsi, ils peuvent contenir des acides aminés inhabituels tels que les aminoacides hydroxylés, les L- ou D-aminoacides ou les aminoacides déshydratés. Ils sont également l'objet d'importantes modifications telles que glycosylation, acylation, cyclisation ou méthylation. De ce fait, leur diversité est très grande et, dans la plupart des cas, un seul antibiotique est synthétisé sous forme d'un mélange de plusieurs molécules différentes plus ou moins actives. Les ramoplanines, par exemple, sont synthétisées par les *Actinomycetes* sous trois formes A1, A2 et A3, présentant des différences au niveau de la taille de leur chaîne N-terminale, mais ayant une activité antimicrobienne très similaire (McCafferty *et al.*, 2002). La bacitracine, antibiotique produit par *B. licheniformis* et certaines souches de *B. subtilis*, est également synthétisée sous différentes formes A, B, D, E, H et F. Il a clairement été montré que ces multiples formes de l'antibiotique diffèrent énormément quant à leur activité antibiotique et leur interaction avec la cible (Ming and Epperson, 2002).

Ces antibiotiques à synthèses non-ribosomales sont tous de petite taille. La plus grande molécule qui ait été découverte est constitué de 20 résidus. Il s'agit de l'alaméthicine synthétisé par le champignon *Trichoderma viride* (Mohr and Kleinkauf, 1978).

#### 1.1. Biosynthèse

La biosynthèse des peptides non-ribosomaux est bien décrite et appelée mécanisme «multi-carrier thiotemplate» (Stein *et al.*, 1996). Ce mécanisme fait intervenir des complexes multienzymatiques appelés peptides synthétases contenant plusieurs modules dont la fonction permet la synthèse ordonnée du peptide. Chaque module enzymatique a la capacité de

reconnaître un résidu aminoacide, de l'activer et de le modifier si nécessaire, puis de l'ajouter à la chaîne peptidique naissante. Ainsi, la taille du gène codant pour une seule peptide synthétase est très grande (13 kb pour le gène *grsB* de l'opéron de biosynthèse de la gramicidine S) (Stachelhaus and Marahiel, 1995).

Lors de la biosynthèse non-ribosomale, chacun des résidus aminoacides est tout d'abord activé par adénylation d'une molécule d'ATP, puis fixé au domaine A de leur module respectif (Fig.23). Cette fixation est ensuite stabilisée par une liaison thioester faisant intervenir un groupe thiol (-SH) d'un cofacteur pantéthéine et le domaine T de chaque module (Fig.23). Enfin, l'assemblage de la chaîne peptidique se fait par des réactions successives et ordonnées de transpeptidations (Fig.23) (Konz and Marahiel, 1999; Stein *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1996). Par ailleurs, dans le cas de modifications des résidus, les modules peuvent contenir des domaines enzymatiques supplémentaires portant des activités de modifications. La formation de la chaîne peptidique se faisant de manière ordonnée de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, il est supposé que ce mécanisme présente des similarités avec le mécanisme de synthèse ribosomale dans lequel on trouve un site donneur et un site accepteur au niveau du ribosome.

## 1.2. Une grande diversité de structure

Plus de 300 résidus différents ont été identifiés dans l'ensemble des antibiotiques peptidiques non ribosomaux résultant en une grande diversité de structure. Ceci est expliqué par une grande diversité d'activité des modules enzymatiques formant les peptides synthétases (Konz and Marahiel, 1999). On peut distinguer plusieurs types de squelettes peptidiques : les peptides linéaires, les peptides cycliques, ou à branches cycliques, et les depsipeptides.

Parmi les antibiotiques à squelette linéaire on trouve par exemple l'alaméthicine, ou les gramicidines (autres que la gramicidine S). Les antibiotiques cycliques ont tous une structure similaire à celle de la cyclosporine de *Beauveria nivea* ou la mycosubtiline de *B. subtilis* (Fig.24 ci-après). On y trouve également la gramicidine S de *B. brevis* et la cyclopeptine de *Penicillium cyclopium*. Cette structure diffère légèrement des peptides à branches cycliques qui font également l'objet de cyclisations mais non totales (Fig.25 ci-après). C'est le cas de la polymixine de *Bacillus polymixa* ou de la bacitracine de *B. licheniformis* et *B. subtilis*.

Les antibiotiques depsipeptidiques sont souvent cycliques mais leur chaîne structurale est très spécifique (Fig.26 ci-après). On y trouve l'enduracidine de *Streptomyces fungicidus* et les ramoplanines des *Actinomyces*.

Les modifications particulières au sein d'autres antibiotiques, comme la vancomycine de *Nocardia orientalis* et la téicoplanine synthétisée par un autre *Actinomyces*, font qu'ils sont classés dans un groupe particulier de peptides à synthèse non-ribosomale appelé les Glycopeptides. Ces derniers sont constitués de chaînes hexa- ou heptapeptidiques sur lesquelles viennent se greffer un ou des sucres (Fig.27). Nous verrons un peu plus loin que ces antibiotiques, tous structurellement très proches, ont un mode d'action très similaire.

## 2. Les antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomale

### 2.1. Diversité de structures

Ils sont aussi bien synthétisés par les microorganismes, les plantes, les insectes et les animaux. Nombre d'entre eux sont cationiques avec une charge nette positive à pH neutre. Ceci est dû à leur composition en acides aminés enrichie en résidus lysine et arginine ou à la présence de résidus inhabituels appelés lanthionines. Les similarités de séquences primaires de ces peptides sont cependant très faibles ce qui suggère que chacun est adapté à l'environnement dans lequel il est produit ou à l'espèce bactérienne cible de la niche écologique (Hancock and Chapple, 1999). Leur grande répartition dans le monde du vivant est directement liée à leur capacité d'apporter à l'organisme producteur une immunité innée contre une menace microbienne spécifique (Boman, 1995). En outre, ces antibiotiques cationiques sont très largement synthétisés par les cellules immunitaires chez les eucaryotes (macrophages, neutrophiles...) et ont parfois des propriétés chemo-attractives pour faciliter les réponses immunitaires. C'est le cas du LL-37, synthétisé par les cellules neutrophiles humaines, et qui, en plus de son activité antimicrobienne, participe à l'attraction des leucocytes au site d'infection (Durr and Peschel, 2002).

On distingue 4 classes de peptides cationiques suivant leur structure tertiaire (Hancock, 1997) (Fig.28). On peut remarquer que ces peptides ont des topologies amphiphiles avec une surface polaire chargée et une surface opposée hydrophobe. Nous verrons plus loin que ces structures amphiphiles sont parfaitement adaptées à leur mode d'action.

## 2.2. Les Bactériocines

Les peptides antimicrobiens à synthèse ribosomale produits par les bactéries sont nommés bactériocines. La plupart des bactéries à Gram positif qui produisent des bactériocines appartiennent au sous groupe des Firmicutes lactiques, telle que *Lactococcus lactis* (Sablon *et al.*, 2000). Une classification plus détaillée de ces bactériocines a été proposée suivant leur séquence primaire.

Les bactériocines de classe I regroupent les peptides sujets à d'importantes modifications post-traductionnelles. Les modifications les plus courantes sont les déshydratations de résidus sérine ou thréonine conduisant respectivement aux résidus inhabituels déhydroalanine (Dha) ou déhydrobutyrine (Dhb). L'addition supplémentaire d'un résidu cystéine sur ces résidus déshydratés par liaison thioester conduit aux résidus nommés lanthionines (Dha+Cys) ou méthyl-lanthionine (Dhb+Cys). Ainsi, les bactériocines de classe I sont-elles plus généralement appelées lantibiotiques. Ces lantibiotiques sont très répandus dans le groupe des Firmicutes. On y trouve par exemple la nisine de *L. lactis*, la subtiline de *B. subtilis*, l'épidermine de *S. epidermidis*, la mutacine de *Streptococcus mutans* ou encore la mersacidine de *Bacillus sp.*

De nombreuses revues décrivent bien les biosynthèses ribosomales de ces bactériocines (Sahl *et al.*, 1995; Sahl and Bierbaum, 1998). Les clusters de gènes de synthèse de lantibiotiques contiennent toujours un gène de structure, codant pour un polypeptide précurseur ou pro-peptide, plus long que le peptide mature, des gènes codant pour les enzymes nécessaires aux multiples modifications du pro-peptide (déshydratase, thioestérase, protéase...), des gènes codant pour la sécrétion du peptide dans le milieu extérieur et enfin des gènes codant pour un système d'immunité conférant une résistance innée à l'antibiotique produit (Fig.29) (Baba and Schneewind, 1998; Garrido *et al.*, 1988; Sahl *et al.*, 1995). Ces clusters de gènes de synthèse de lantibiotiques présentent de grandes similarités et De Vos *et coll.* ont proposé une nomenclature pour en désigner les différents composants génétiques : *lanA* pour le gène codant le pro-peptide ; *lanB*, *C*, *D* et *M* codant les enzymes de modifications ; *lanP*, codant la protéase clivant le pro-peptide (maturation) ; *lanT*, codant les protéines de sécrétions du peptide ; *lanI*, *F*, *E* et *G* codant les protéines d'immunités ; et enfin *lanR* et *K* codant les protéines régulatrices du cluster (n'apparaissant pas sur la Fig.29) (de Vos *et al.*, 1995).

L'étude de la structure et du mode d'action des lantibiotiques a permis à Jung, G. de définir deux sous-types A et B (Jung, 1991). Les lantibiotiques de type A, ou Nisin-like, ont un spectre d'action assez large et ont comme cible la membrane bactérienne en interagissant avec plusieurs types de molécules présentes au niveau de cette membrane. Ce sont des



peptides linéaires et amphiphiles (Jung, 1991). Les lantibiotiques de type B, ou Cinnamycin-like, sont à spectres plus étroits, surtout actifs contre les espèces proches de l'organisme producteur. Ce sont des peptides globulaires pouvant affecter spécifiquement une fonction essentielle chez la bactérie cible (Fig.30). Ils peuvent également perturber l'intégrité membranaire mais en interagissant alors avec une cible spécifique au niveau de la membrane.

La seule caractéristique qui différencie les clusters de synthèse de lantibiotiques (bactériocines de classe I) des clusters de synthèse d'autres bactériocines (classe II) est l'absence dans ces derniers des gènes codant pour les enzymes de modifications post-traductionnelles (*lanB*, *C*, *D* et *M*). Ainsi, la nomenclature établie par De Vos *et coll.* est également employée lorsque l'on parle des gènes de synthèse des bactériocines de classe II. Ces dernières sont des petits peptides à la fois cationiques et hydrophobes de 20 à 60 aminoacides. De manière générale, ils sont actifs sur les Firmicutes. On peut distinguer 4 sous-classes nommées IIa, IIb, IIc et IId (Fig.22) (Nes and Holo, 2000). La sous-classe IIa est la mieux caractérisée car on y trouve des peptides présentant une forte similarité aussi bien au niveau de leur séquence primaire qu'au niveau de leur activité dirigée contre les espèces du genre *Listeria* (Ennahar *et al.*, 2000). Les bactériocines de classe IIb, ou synergistines, ont la particularité de fonctionner par paires complémentaires de deux peptides dont les deux gènes de structures se trouvent dans un même cluster de synthèse. La lactacine F, par exemple, produite par *Lactobacillus johnsonii*, provient de l'action simultanée des deux peptides LafA et LafX, dont les gènes de structures sont tous deux présents dans l'opéron *laf* codant leur synthèse (Abee *et al.*, 1994). On classe globalement dans les bactériocines de type IIc celles qui présentent la particularité d'être sécrétées par la voie générale de sécrétion Sec-dépendante. Enfin, la dernière sous-classe, IId, regroupe d'autres bactériocines ne présentant pas de similarité particulière.

### 3. Les antibiotiques non-peptidiques

#### 3.1. Les $\beta$ -lactames

Bien que n'étant pas des chaînes peptidiques, les  $\beta$ -lactames ont tous un site actif identique constitué de l'association d'une cystéine et d'une valine donnant une structure type lactone et nommé anneau  $\beta$ -lactame (Fig.31). Ces antibiotiques ont un mode d'action très spécifique que nous détaillerons plus loin. L'exemple le plus connu de  $\beta$ -lactame est la

pénicilline synthétisée par le champignon *Penicillium chrysogenum*. On y trouve également les céphalosporines et les pénèmes.

### 3.2. La fosfomycine

La fosfomycine ou acide phosphonique-(3-méthoxyoxiran-2-yl) est synthétisée par les *Streptomyces*. Le mécanisme de synthèse est bien décrit et fait intervenir des réactions d'oxydations catalysées par des époxydases à Fer (Liu *et al.*, 2004). La caractéristique structurale de cet antibiotique est la présence d'un anneau oxirane (Fig.32).

## C. Diversité des Modes d'action

L'enveloppe bactérienne est une cible majeure de nombreux antibiotiques répartis dans toute la classification présentée plus haut. Certains antibiotiques ciblent directement la membrane plasmique et perturbent son intégrité, d'autres ont des cibles spécifiques et affectent drastiquement les mécanismes de synthèse de la paroi de peptidoglycane.

### 1. Perturbation de l'intégrité membranaire par les antibiotiques peptidiques

Comme nous l'avons précisé plus haut, une grande partie des antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomale, de même que certains peptides à synthèse non-ribosomale ont une conformation amphiphile. Cette conformation est à la base de leur mode d'action qui s'avère très similaire. La membrane plasmique bactérienne est composée en majeure partie de phospholipides présentant une charge nette négative (due au groupement phosphate) à la surface. Il a clairement été montré que la partie hydrophile et cationique des antibiotiques peptidiques peut interagir avec ces groupements phosphates de la membrane plasmique par liaisons électrostatiques et former plusieurs types de pores (Hancock, 1997; Zasloff, 2002). Les interactions des antibiotiques cationiques avec la membrane cytoplasmique ont fait l'objet de nombreuses études (Matsuzaki, 2001; Oren and Shai, 1998; Shai, 1999; Yang *et al.*, 2000) et l'on distingue deux mécanismes de formation de pores membranaires (Fig.33). Dans les deux cas, la charge nette positive de ces peptides et leur interaction électrostatique avec les phospholipides membranaires permettent l'initiation du mécanisme.

Le premier mécanisme, appelé « à barres » (Ehrenstein and Lecar, 1977), se rencontre seulement avec les peptides cationiques ayant une structure en hélices  $\alpha$  et amphiphile (Fig.33, à droite). Ces hélices  $\alpha$  se fixent au niveau des phospholipides membranaires sous forme monomérique, puis interagissent entre elles à la surface de la membrane. Leur face hydrophobe leur permet alors de s'insérer dans la membrane et de former un pore. La taille du pore est ensuite agrandie par recrutement d'autres monomères et peut être maintenue grâce à la face hydrophile de chaque hélice  $\alpha$  qui exerce une force d'opposition avec ses partenaires. Ce mécanisme est notamment observé pour l'alaméthicine (Huang, 2000).

Le deuxième mécanisme d'action ne nécessite pas une structure en hélice  $\alpha$  et concerne un grand nombre d'antibiotiques peptidiques. Il est appelé mécanisme de « tapissage » et a été observé pour la première fois avec la dermaseptine S (Pouny *et al.*, 1992). Il est également observé avec les cécropines (Gazit *et al.*, 1995), le peptide antimicrobien humain LL-37 (Oren *et al.*, 1999) ou encore la caérine de l'amphibien *Litoria splendida* (Wong *et al.*, 1997). Ce

mécanisme propose que les peptides cationiques interagissent de manière électrostatique avec les groupements phosphates des phospholipides membranaires, puis adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  et tapissent la membrane (Fig.33, à gauche). Ceci nécessite l'action d'une grande concentration de peptides. Suite à ce tapissage, la propriété amphiphile des peptides cationiques permet une réorientation des phospholipides membranaires engendrant des ruptures de la bicouche lipidique. La taille importante de ces ruptures au niveau de la membrane plasmique entraîne la lyse rapide de la cellule. Ce mécanisme de tapissage explique également que certains peptides cationiques puissent franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif afin d'atteindre la membrane plasmique. Une des étapes préalables à la rupture membranaire est la formation de pores, appelés toroïdaux, dans lesquels les hélices  $\alpha$  de l'antibiotique restent fixées aux groupements phosphates de phospholipides et modifient la courbure de la bicouche. Les pores formés par la magainine sont de types toroïdaux et ils diffèrent des pores « à barres » formés par l'alaméthicine (Huang, 2000) (Fig.34).

Les interactions électrostatiques à la surface de la membrane sont essentielles à ces mécanismes d'action. Ainsi, ces antibiotiques peptidiques et cationiques ont une action spécifique sur les membranes bactériennes. En effet, les membranes de cellules eucaryotes n'exposent pas (ou moins) de charges négatives à leurs surfaces : d'une part, elles contiennent des molécules de cholestérols et, d'autre part, elles exposent leurs phospholipides chargés négativement à la surface interne de la membrane (Zasloff, 2002). Des études thermodynamiques récentes ont permis d'analyser plusieurs profils d'interaction lipides-peptides et de différencier notamment les interactions exclusivement hydrophobes (cas de la cyclosporine A) des interactions électrostatiques et hydrophobes (cas des antibiotiques peptidiques et cationiques). L'auteur précise en outre que les profils thermodynamiques d'interactions diffèrent également suivant que l'antibiotique présente une structure en hélice  $\alpha$ , adopte une conformation en hélice  $\alpha$  en interagissant avec la membrane, ou présente une structure en feuillet  $\beta$  (Seelig, 2004).

La modification de l'intégrité de la membrane plasmique peut avoir plusieurs conséquences létales pour la cellule. Avant la lyse de la cellule proprement dite, la formation de pores au niveau de la membrane provoque la fuite inévitable du matériel hydrophile cytoplasmique (cations, anions, aminoacides...). On observe trois types de résultantes à ces fuites membranaires : la dissipation du gradient de pH et donc de la force proton motrice, la rupture du potentiel transmembranaire ( $\Delta\phi$ ) ou enfin, une diminution rapide du pool de l'ATP intracellulaire. Les antibiotiques peptidiques cationiques peuvent engendrer une seule ou plusieurs de ces fuites suivant leur nature, la taille des pores qu'ils forment et leur mode

d'action. Ceci a été observé en étudiant les bactériocines de classe II (Hechard and Sahl, 2002). La lactacine F, bactériocine de classe IIb, formée de deux peptides agissant en synergie, est un bon exemple d'antibiotique engendrant de multiples fuites au niveau de la membrane (Abee *et al.*, 1994). De nombreux autres antibiotiques de classe IIb ont été caractérisés comme agissant par paires et en synergie sur la membrane plasmique. C'est le cas des thermophilines  $\alpha$  et  $\beta$  (Marciset *et al.*, 1997), des lactococcines H, M et N (van Belkum *et al.*, 1991) ou encore des staphylococcines C55  $\alpha$  et  $\beta$  (Navaratna *et al.*, 1999). Cette synergie d'action proviendrait du fait que les deux peptides adoptent leur conformation en hélice  $\alpha$  en présence de leur partenaire (McCafferty *et al.*, 1999).

Certains antibiotiques formant des pores membranaires ont des cibles spécifiques parmi les constituants de la membrane. Les antibiotiques de type A, tels que la nisine ou l'épidermine, lorsqu'ils sont en faibles concentrations (nanomolaires) s'ancrent au niveau du lipide II (UPP-NAM-NAG-pentapeptide) et forment des « pores ciblés » ou « pores à hautes spécificités » (Breukink *et al.*, 1999) (Fig.35). Il a été montré que l'ouverture de ces pores est stable pendant plusieurs secondes et que leur diamètre est de 2 à 2,5 nm (Wiedemann *et al.*, 2004). Par ailleurs, de part leur propriété cationique, la nisine et l'épidermine, à fortes concentrations (micromolaires), ont également la capacité de cibler les phospholipides membranaires et de former des pores moins spécifiques (Van Den Hooven *et al.*, 1996).

Il a également été proposé un mode d'action spécifique pour certaines bactériocines de classe IIa qui ont un spectre d'action assez étroit sur les espèces du genre *Listeria*. Il semble que l'interaction de ces bactériocines avec la membrane se fasse par l'intermédiaire de la perméase à mannose du système des phosphotransférases (PTS), ceci ayant été observé pour la mésentéricine (Dalet *et al.*, 2001), la leucocine A (Ramnath *et al.*, 2000) et la lactococcine A (Diep *et al.*, 2007). Cette interaction pourrait engendrer un changement de conformation de la perméase, qui, s'ouvrant, participerait à la perméabilisation de la membrane. Cependant, de la même manière que les antibiotiques de type A, beaucoup de bactériocines de classe IIa peuvent perméabiliser des liposomes en absence d'une protéine réceptrice spécifique. C'est par exemple le cas de la pédiocine PA-1 (Chen *et al.*, 1997).

Un dernier exemple de cible relativement spécifique au niveau de la membrane concerne les antibiotiques de type B similaires à la cinnamycine. Ces antibiotiques ont un spectre d'action assez étroit sur les bactéries à Gram positif du genre *Bacillus*, et leurs actions affectent les échanges membranaires ATP dépendants (Navarro *et al.*, 1985) et augmente fortement la perméabilité membranaire (Racker *et al.*, 1984). Leur mode d'action s'explique par une interaction avec les phosphatidyléthanolamines de la membrane cytoplasmique (Machaidze and Seelig, 2003).

Si la majeure partie des antibiotiques affectant l'intégrité membranaire est synthétisée de façon ribosomale, on trouve des peptides synthétisés de façon non-ribosomale qui ont une action similaire. C'est le cas notamment de deux antibiotiques ayant une charge nette hautement positive, la polymyxine B et la gramicidine S et bénéficiant également d'une structure amphiphile (Hancock and Chapple, 1999). Un dernier exemple concerne un antibiotique cyclique fortement hydrophobe, la cyclosporine A. Ce peptide de 11 acides aminés, dont 7 sont méthylés, est fortement lipophile (Schote *et al.*, 2002). Cette propriété lui permet d'interagir avec les membranes lipidiques aussi bien de cellules bactériennes qu'eucaryotes et les études thermodynamiques ont mis en évidence que ces interactions étaient exclusivement de type hydrophobe, contrairement à l'ensemble des peptides cationiques vus précédemment (Seelig, 2004).

## 2. Inhibition de la synthèse de la paroi

De manière plus générale, la biosynthèse de la paroi de peptidoglycane est la cible de nombreux antibiotiques à synthèse non-ribosomale et une grande partie des étapes de cette biosynthèse peut être inhibée par un ou plusieurs de ces antibiotiques (Fig.36).

### 2.1. Fosfomycine, Cyclosérine, et Muréidomycine: inhibition des étapes primaires

Ces antibiotiques ont pour cible les étapes primaires essentielles à la synthèse du précurseur monomérique de peptidoglycane, l'UPP-NAM-NAG-pentapeptide ou lipide II. Leur mode d'action réside dans le fait qu'ils sont des inhibiteurs compétitifs des différentes enzymes impliquées dans la formation du lipide II. Ainsi, la fosfomycine possède une structure très similaire au phosphoénolpyruvate ce qui lui permet d'inhiber la première réaction de la synthèse de peptidoglycane, à savoir, la formation d'UDP-NAM à partir de l'UDP-NAG et du phosphoénolpyruvate, réaction catalysée par l'UDP-NAM énoylpyruvate transférase MurA (Fig.36) (Kahan *et al.*, 1974).

La D-cyclosérine, anciennement appelée oxamycine, est un analogue rigide du résidu D-alanine et inhibe les deux réactions permettant la formation du dipeptide D-ala-D-ala ajouté à l'extrémité du pentapeptide. Les enzymes cibles de la D-cyclosérine sont, d'une part, la D-alanine racémase (formant la D-alanine à partir de L-alanine) et, d'autre part, la D-alanine

ligase, qui procède à la dimérisation des résidus D-alanine (Fig.36) (Feng and Barletta, 2003; Lambert and Neuhaus, 1972).

L'antibiotique peptidique muréidomycine, enfin, est également un compétiteur structural des substrats de l'enzyme *MraY*, la phospho-N-acétylmuramyl-pentapeptide translocase, qui catalyse la fixation de l'UDP-NAM-pentapeptide à la membrane par l'intermédiaire de l'Undécaprényl-phosphate. Lorsque l'on regarde la structure de la muréidomycine, on y trouve une similarité importante avec les deux substrats de l'enzyme *MraY*, l'UDP-NAM-pentapeptide et l'undécaprénylphosphate (Brandish *et al.*, 1996; Isono and Inukai, 1991) (Fig.37).

## 2.2. Inhibition des étapes plus tardives : le lipide II, une cible majeure

La molécule précurseur UPP-NAM-NAG-pentapeptide, ou lipide II, est une cible majeure d'antibiotiques appartenant à de nombreuses familles différentes. On parle alors de synergie moléculaire (McCafferty *et al.*, 1999).

- Les Ramoplanines : complexation aux lipides I et II, un exemple de dualité fonctionnelle

On parle de dualité ou de pluralité fonctionnelle lorsqu'un même antibiotique possède plusieurs cibles différentes ou qu'il inhibe plusieurs réactions différentes dans une voie de biosynthèse. Les antibiotiques de la famille des lipoglycodepsipeptides, dont font partie les ramoplanines, ont été montrés comme reconnaissant et complexant la partie NAM-Ala-D-Glu-pyrophosphate retrouvée dans les deux intermédiaires lipidiques de synthèse de la paroi, le lipide I et le lipide II (Cudic *et al.*, 2002). Les résidus importants pour cette complexation ont été identifiés et proposés comme faisant partie d'un motif consensus retrouvé chez d'autres antibiotiques depsipeptidiques tels que l'enduracidine ou la janiemycine (Cudic *et al.*, 2002). Les ramoplanines sont un bon exemple de dualité fonctionnelle car elles se complexent à la partie commune au lipide I et au lipide II. Ceci leur permet d'inhiber deux étapes différentes dans la synthèse de la paroi (Fig.36). Premièrement, leur complexation au lipide I rend ce substrat inaccessible à l'enzyme *MurG* qui catalyse l'addition de l'UDP-NAG au niveau de ce substrat afin de former le lipide II (Reynolds and Somner, 1990; Somner and Reynolds, 1990). Deuxièmement, leur complexation au lipide II inhibe les réactions de transglycosylations permettant l'initiation de la polymérisation du peptidoglycane (Lo *et al.*, 2000).

## - Les Glycopeptides et l'inhibition des étapes de polymérisation

La vancomycine, et globalement tous les antibiotiques glycopeptidiques, ont pour cible le dipeptide D-ala-D-ala au niveau du précurseur monomérique de peptidoglycane. Ces antibiotiques peuvent se fixer sur cette cible très spécifique aussi bien au niveau du lipide II, qu'au niveau des précurseurs partiellement rattachés du peptidoglycane. Il a été montré que la complexation de la vancomycine au dipeptide D-ala-D-ala fait intervenir 5 liaisons hydrogènes, ce qui traduit une grande affinité de l'antibiotique pour sa cible (Williams, 1996) (Fig.38). Cette complexation vancomycine/dipeptide permet la séquestration du substrat des transglycosylases et transpeptidases (PBPs), enzymes nécessaires à la polymérisation du peptidoglycane. Si le dipeptide D-ala-D-ala du lipide II semble être la cible principale des glycopeptides, une étude assez récente suggère qu'ils peuvent également avoir une action inhibitrice directe sur les transglycosylases. Les auteurs ont utilisé une molécule de vancomycine tronquée ne pouvant se complexer au dipeptide D-ala-D-ala et ont montré que cette molécule avait une action inhibitrice sur les étapes de transglycosylations (Ge *et al.*, 1999).

## - Les $\beta$ -lactames : un ciblage direct des PBPs

Les étapes de polymérisation par transpeptidations sont également la cible des antibiotiques les plus connus à ce jour, les  $\beta$ -lactames, dont fait partie la pénicilline, et qui interagissent directement avec les enzymes qui procèdent à ces polymérisations, les PBPs. L'ensemble des PBPs (classe A, B ou C) sont touchés par les  $\beta$ -lactames, cependant, on observe seulement un effet létal de ces antibiotiques lorsque les PBPs à hauts poids moléculaires sont touchés (classe A et B) (Josephine *et al.*, 2006). Selon le modèle de Tipper et Strominger, les  $\beta$ -lactames peuvent interagir et inactiver les domaines transpeptidases des PBPs du fait de la forte similarité de l'anneau  $\beta$ -lactame avec le dipeptide D-ala-D-ala (Tipper et Strominger, 1968). Le complexe formé entre l'antibiotique et sa cible est stabilisé assez facilement par une acylation du site actif du domaine transpeptidase de la PBP et ouverture de l'anneau  $\beta$ -lactame (Fig.39 ci-après). Le produit de cette acylation, appelée transpeptidase penicilloylée, est un intermédiaire inactif et la réaction de déacylation permettant la réactivation de l'enzyme est très lente. Le rendement de la transpeptidation est alors fortement affecté et la formation des liaisons peptidiques croisées permettant le rattachement des nouvelles couches de peptidoglycane est fortement ralentie (Tipper and Strominger, 1968; Waxman and Strominger, 1983).



## - Les lantibiotiques : complexation au lipide II

Nous avons déjà observé plus haut que certains lantibiotiques de type A (nisine, épidermine) ont la capacité de former des complexes de hautes affinités avec le lipide II membranaire afin de perméabiliser la membrane cytoplasmique par formation de pores. La nisine a fait l'objet de nombreuses études qui ont pu montrer que ce lantibiotique est un exemple frappant de pluralité fonctionnelle. Outre la formation de pores membranaires, la complexation de la nisine au lipide II séquestre ce dernier et inhibe fortement la synthèse de peptidoglycane de manière similaire aux glycopeptides et aux ramoplanines (Wiedemann *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été montré que la nisine a une action inhibitrice sur la formation de la paroi de la spore naissante, action qui dépend de la présence du résidu déhydroalanine en position 5 du peptide (Pag and Sahl, 2002). Un dernier mode d'action avait été mis en évidence par Bierbaum et Sahl en 1985. La nisine, et également le peptide Pep5, peuvent activer les autolysines chez les bactéries à Gram positif, ce qui engendre notamment la dégradation prématurée de la paroi formant le septum de division cellulaire (Bierbaum and Sahl, 1985).

D'autres lantibiotiques, de type B, comme la mersacidine ou l'actagardine, ont pour cible spécifique le lipide II. Contrairement à la nisine, ces lantibiotiques ne forment pas de pores, leur action étant plus spécifique à l'inhibition de la synthèse de la paroi. La séquestration du lipide II par ces lantibiotiques bloque les réactions de transglycosylation (Brotz *et al.*, 1997; Brotz *et al.*, 1998) et n'est pas dépendante du dipeptide D-ala-D-ala comme pour les glycopeptides. En effet, l'activité de la mersacidine ou de l'actagardine n'est pas inhibée par d'autres molécules contenant ce dipeptide, notamment le précurseur monomérique UDP-NAM-pentapeptide non relié à l'Undécaprényl pyrophosphate. De plus, la mersacidine n'est pas affectée par la présence de vancomycine ce qui confirme que son interaction avec le lipide II se fait sur un site différent de celui employé par les glycopeptides (Brotz *et al.*, 1998). Il a également été observé que ces lantibiotiques, même en fortes concentrations, n'interagissent pas avec le lipide I et n'inhibent pas la translocase MurG, contrairement aux ramoplanines (Brotz *et al.*, 1997). Ce résultat suppose donc que la mersacidine et l'actagardine interagissent spécifiquement avec le lipide II au niveau du disaccharide NAM-NAG. Les deux lantibiotiques présentent de fortes similarités structurales avec un motif en anneau conservé (Zimmermann *et al.*, 1995). Si ces lantibiotiques de type B diffèrent des ramoplanines pour leur mode d'action, leur similarité de structure avec ces dernières est étonnante et a été mise en évidence par résonance magnétique nucléaire (Fig.40) (Cudic *et al.*, 2002).

### 2.3. La Bacitracine et l'inhibition de la dernière étape dans la biosynthèse de peptidoglycane

Au cours de ma thèse je me suis principalement intéressé à cet antibiotique qui inhibe une étape cruciale dans la voie de biosynthèse de la paroi. Nous consacrerons la dernière partie de cette introduction à la bacitracine qui touche spécifiquement la dernière étape du cycle de biosynthèse du peptidoglycane, la régénération du translocateur lipidique, l'undécaprénylphosphate.

Face à la grande diversité des antibiotiques peptidiques affectant l'intégrité membranaire et la synthèse de peptidoglycane, face aux diverses actions synergiques ou aux pluralités fonctionnelles de certains antibiotiques, les bactéries ont su s'adapter et développer une grande diversité de mécanismes de résistance indispensables à leur survie. Nous allons décrire ces divers mécanismes et mettre en exergue la capacité des bactéries à réguler ces mécanismes en réponse à la présence de ces antibiotiques.

# III - Mécanismes de Résistance aux Antibiotiques Ciblant l'Enveloppe Bactérienne et Régulation de ces Mécanismes

## A- Diversité de mécanismes liée à la diversité des antibiotiques

L'efficacité d'un antibiotique dépend de sa capacité à franchir les différentes barrières de l'enveloppe bactérienne, de son affinité avec sa cible et enfin de son spectre d'action. En se basant sur ces caractéristiques, de nombreux mécanismes de résistances ont été identifiés chez les bactéries et, dans la plupart des cas, les processus moléculaires impliqués ont été décryptés. On peut distinguer plusieurs types de mécanismes de résistances. Certains ciblent directement l'antibiotique, d'autres aboutissent à la modification ou à la disparition de la cible de l'antibiotique, d'autres enfin empêchent sa pénétration (Lewis *et al.*, 2002). En ce qui concerne les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne, la plupart des mécanismes de résistances cités sont retrouvés. Nous verrons qu'un même mécanisme de résistance peut être efficace contre plusieurs antibiotiques, et, inversement, que des mécanismes différents sont utilisés pour contrer l'action d'un même antibiotique.

### 1. Mécanismes ciblant directement l'antibiotique

#### 1.1. Inactivation de l'antibiotique ou modification de l'expression de ses gènes de synthèse

##### - Les $\beta$ -lactamases et la résistance aux $\beta$ -lactames

Un des meilleurs exemples de mécanisme d'inactivation d'antibiotiques concerne les  $\beta$ -lactames, antibiotiques inhibant les réactions de transpeptidation dans la synthèse de peptidoglycane (voir partie II). De nombreuses bactéries, aussi bien à Gram négatif qu'à Gram positif, synthétisent des  $\beta$ -lactamases qui sont capables d'hydrolyser l'anneau  $\beta$ -lactame des antibiotiques de type pénicilline ou céphalosporine. Cette hydrolyse conduit à une conformation ouverte et inactive de l'antibiotique, l'acide penicilloïque (Fig.41). Ces  $\beta$ -lactamases, produites et sécrétées dans l'espace périplasmique, peuvent donc inactiver l'antibiotique avant qu'il atteigne sa cible, les PBPs de la membrane cytoplasmique. Une

seule molécule enzymatique peut hydrolyser jusqu'à 1000 molécules d'antibiotiques par seconde, ce qui en fait un mécanisme d'action rapide et efficace (Walsh, 2000). La production de ces enzymes peut être constitutive ou induite notamment par des stress de la paroi. Les plus grands producteurs de  $\beta$ -lactamases sont les bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif les espèces *Staphylococci* et *Enterococci* en produisent également (Massova and Mobashery, 1998). Aujourd'hui plus de 530  $\beta$ -lactamases sont répertoriées et l'on distingue 4 classes différentes suivant leur spécificité de substrat, leur paramètre catalytique, leur masse moléculaire et leur similarité de structure (Babic *et al.*, 2006). La plupart d'entre elles (classes A, C et D) ont un résidu sérine au niveau de leur site actif leur permettant d'interagir avec l'anneau  $\beta$ -lactame (similairement à une PBP) et donc de procéder à l'ouverture de l'anneau  $\beta$ -lactame à l'aide d'une molécule d'eau (Golemi-Kotra *et al.*, 2004; Meroueh *et al.*, 2005). D'autres (classe B) utilisent un cofacteur métallique comme l'ion  $Zn^{2+}$  et leur présence dans les archaebactéries supposent une origine lointaine (Garau *et al.*, 2005a; Garau *et al.*, 2005b).

La classe A regroupe les pénicillinases ayant une action spécifique sur les antibiotiques proches de la pénicilline et une faible activité sur les céphalosporines. On y trouve par exemple la protéine PC1 de *S. aureus* ou TEM-1 d'*E. coli* (Bush *et al.*, 1995). La classe B regroupe l'ensemble des  $\beta$ -lactamases actives sur les pénicillines et les céphalosporines (Walsh *et al.*, 2005). De nombreux exemples sont trouvés chez la bactérie *P. aeruginosa*. La majorité des  $\beta$ -lactamases de classe C sont dirigées contre les céphalosporines et sont globalement appelées de type AmpC, car le mécanisme contrôlant la production de ces protéines est relativement bien conservé (Jacobs *et al.*, 1997). Enfin, on trouve dans la classe D des  $\beta$ -lactamases spécifiquement dirigées contre les  $\beta$ -lactames de type oxacilline.

Les gènes codant ces  $\beta$ -lactamases, nommés gènes de type *bla*, peuvent être situés sur le chromosome, dans des plasmides ou sur des éléments transposables. De tous les déterminants génétiques de résistance, les gènes *bla* ont le spectre de dissémination le plus grand et qui évolue le plus vite. En effet, bien que tous ces enzymes aient une spécificité de substrat relativement étroite, des études récentes montrent l'apparition de nouvelles  $\beta$ -lactamases à spectre large. Ces enzymes possèdent une certaine flexibilité au niveau de leur site actif leur permettant de s'adapter à un grand nombre de substrats différents (Chen *et al.*, 2005; Nukaga *et al.*, 2003; Orenca *et al.*, 2001). Ainsi, chez *Mycobacterium tuberculosis*, une  $\beta$ -lactamase a été identifiée comme similaire aux enzymes de classe A (40 % de similarités) mais présentant un spectre d'action très différent (Wang *et al.*, 2006).

#### - Résistance à la fosfomycine

La fosfomycine, antibiotique inhibant la formation de l'UDP-NAM à partir de l'UDP-NAG, est également la cible de mécanismes d'inactivation. L'ajout d'un groupement thiol sur l'anneau oxirane de la fosfomycine inactive l'antibiotique (Fig.42). On trouve deux types de gènes codant pour des fosfomycine-thiol-transférases dans les génomes bactériens. Toutes sont des métalloenzymes dont l'activité dépend d'un cofacteur métallique cationique, et présentent de fortes similarités (Armstrong, 2000). Les enzymes de type FosA sont des glutathiones-S-transférases et sont trouvés chez les bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa*. Leur activité dépend de la présence de  $Mn^{2+}$  ou  $K^+$  (Bernat *et al.*, 1999; Pakhomova *et al.*, 2004). Les bactéries à Gram positif, ne synthétisant pas de glutathione, possèdent des enzymes de type FosB, utilisant le résidu L-cystéine comme donneur de groupement thiol et le cofacteur  $Mg^{2+}$ . L'enzyme FosB de *B. subtilis* a bien été caractérisé et est très similaire à l'enzyme FosB identifié chez *S. aureus* (Cao *et al.*, 2001). Récemment, un troisième type d'enzyme, nommé FosX, a été identifié chez *Mesorhizobium meliloti* et *L. monocytogenes*. FosX catalyse l'inactivation de la fosfomycine par hydratation de l'anneau oxirane à l'aide du cofacteur métallique  $Mn^{2+}$  (Fig.42) (Fillgrove *et al.*, 2003; Partridge and Hall, 2005).

#### - Répression de l'expression des gènes codant pour l'antibiotique

Si la plupart des mécanismes d'inactivation ont pour cible directe l'antibiotique, il existe également un autre mode d'inactivation utilisé par les bactéries pathogènes intracellulaires comme *Shigella spp.*. Cette dernière peut réprimer, au début de l'infection, l'expression des gènes codant pour le peptide cationique antimicrobien LL-37 et la défensine HBD-1 des cellules épithéliales humaines. Le mécanisme moléculaire reste inconnu et les auteurs supposent que cette répression est médiée par l'ADN plasmidique de la bactérie (Islam *et al.*, 2001).

### 1.2. Dégradation ou séquestration de l'antibiotique

On trouve de nombreux exemples de ce type de mécanisme dans les résistances aux antibiotiques cationiques et aux lantibiotiques. Les antibiotiques cationiques à structures linéaires en  $\alpha$ -hélices, comme le LL-37, sont hautement sensibles aux protéases et aux peptidases. De nombreuses bactéries peuvent synthétiser et sécréter de telles enzymes afin

d'augmenter leur résistance à ces antibiotiques. Les protéases V8 et auréolysine de *S. aureus*, et la protéase PgtE de la membrane externe de *Salmonella enterica* sont par exemple capables de cliver le peptide LL-37 (Guina *et al.*, 2000; Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004). Beaucoup d'autres espèces bactériennes comme *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis* mettent en place le même type de mécanisme de résistance (Nyberg *et al.*, 2004; Schmidtchen *et al.*, 2002). Cependant, ces mécanismes ne sont efficaces que sur les peptides à structure linéaire et de nombreux autres antibiotiques peptidiques, ayant une structure globulaire renforcée par la présence de ponts dissulfures, sont insensibles à ces protéases (Fig.43) (Peschel and Sahl, 2006). Certaines bactéries peuvent alors synthétiser des protéines capturant et séquestrant l'antibiotique afin de le détourner de sa cible (Fig.43). *S. aureus* sécrète une protéine nommée staphylokinase, capable de séquestrer l' $\alpha$ -défensine des cellules neutrophiles humaines (Bokarewa *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2004). De la même façon, *S. pyogenes* sécrète deux protéines de séquestration : la protéine SIC (pour Streptococcal Inhibitor Complement) ayant pour cible les défensines et le LL-37, et la protéine M1 ancrée au niveau de la paroi et ayant pour cible le LL-37 (Frick *et al.*, 2003; Nizet, 2005).

D'autres protéines de séquestrations ont été décrites en étudiant les mécanismes d'immunité aux antibiotiques de type A. *B. subtilis*, qui produit et sécrète la subtiline, et *L. lactis*, produisant la nisine, possèdent des mécanismes leur conférant une résistance innée aux antibiotiques qu'ils produisent. Un de ces mécanismes implique des lipoprotéines ancrées dans la membrane cytoplasmique et interagissant avec le lantibiotique afin de le séquestrer. C'est le cas de la protéine membranaire NisI de *L. lactis*, séquestrant la nisine (Siegers and Entian, 1995), et de la protéine SpaI de *B. subtilis*, capturant la subtiline (Stein *et al.*, 2005). Ces séquestrations mettent en jeu des liaisons de type électrostatique ; cependant, il est supposé que la conformation de la région C-terminale de la protéine NisI confère à cette protéine sa spécificité d'interaction avec la nisine (Takala and Saris, 2006).

## 2. Modification de la cible de l'antibiotique

### 2.1 Perte de la cible ou modification de son expression

L'exemple le plus caractéristique de mécanisme aboutissant à la disparition de la cible de l'antibiotique concerne une PBP identifiée récemment chez *E. faecium*. La protéine Ldt<sub>fm</sub> de cette bactérie est une PBP catalysant un nouveau type de transpeptidation à partir du dipeptide L-lysyl-D-alanine de chaîne donneuse térapeptidique. Cette réaction de

transpeptidation diffère totalement de celle catalysée par les PBPs classiques à partir du dipeptide D-ala-D-ala d'une chaîne donnatrice pentapeptidique. En conséquence, la protéine Ldt<sub>fm</sub> est une PBP complètement insensible aux β-lactames et a été renommée de ce fait protéine « non-PBP » (Mainardi *et al.*, 2005).

Deux autres exemples de disparition de cible sont observés chez *L. monocytogenes* et *Staphylococcus simulans*. *L. monocytogenes* est la bactérie cible des bactériocines de classe IIa qui forment des pores membranaires en interagissant avec la perméase à mannose du système PTS. Des mutants de *L. monocytogenes*, résistants à ces bactériocines, ont un taux d'expression très réduit du gène *mptA* codant pour la sous-unité EIIAB de la perméase à mannose (Vadyvaloo *et al.*, 2004a; Vadyvaloo *et al.*, 2004b). Ce mécanisme s'accompagne de la surexpression d'autres perméases du système PTS qui palie au manque de la sous-unité EIIAB (Gravesen *et al.*, 2002). *S. simulans* sécrète une bactériocine de classe II, la lysostaphine, qui clive les ponts peptidiques pentaglycines trouvés dans le peptidoglycane des *Staphylococci* (Schindler and Schuhardt, 1964). Le gène *lif* de *S. simulans* code pour un facteur d'immunité permettant l'incorporation de résidus sérines dans les ponts pentaglycines du peptidoglycane, modifiant ainsi totalement la cible de la bactériocine (Baba and Schneewind, 1998).

Certaines bactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis*, modifient l'expression de la cible de l'antibiotique afin de résister. Les gènes *alr* et *ddl* de *M. tuberculosis* codent respectivement pour l'alanine racémase et la D-ala-D-ala ligase de cette bactérie et sont les cibles de la D-cyclosérine. Plusieurs études montrent que la surproduction de ces deux enzymes titre l'antibiotique et permet à la bactérie d'élever son niveau de résistance à la D-cyclosérine (Caceres *et al.*, 1997; Feng and Barletta, 2003).

## 2.2 Altération de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible

### - Résistance aux glycopeptides

La résistance à ces antibiotiques, dont fait partie la vancomycine, est probablement la mieux étudiée à ce jour. La cible des glycopeptides au niveau du précurseur du peptidoglycane, le dipeptide D-ala-D-ala, est modifiée en D-ala-D-lac. Ce dernier présente une très faible affinité pour les glycopeptides ce qui confère à la bactérie sa résistance. La constante d'association de la vancomycine avec le dipeptide D-ala-D-lac est de 1000 fois inférieure à celle mesurée pour le dipeptide D-ala-D-ala (Bugg *et al.*, 1991).

Les gènes codant les enzymes impliqués dans ce mécanisme sont trouvés chez de nombreux Entérocoques pathogènes et chez les *Actinomycetes* producteurs de glycopeptides. 5 gènes, nommés *vanA*, *H*, *X*, *Y* et *Z* codent pour cette machinerie enzymatique. *vanH* code pour une  $\alpha$ -kéto-réductase catalysant la réduction de la D-alanine en D-lactate. *vanA* code pour la D-ala-D-lac ligase et enfin *vanX* code pour une dipeptidase clivant les liaisons D-ala-D-ala ce qui permet de réduire le pool de précurseur de peptidoglycane se terminant par ce dipeptide. Le niveau de résistance à la vancomycine mesuré pour une souche d'*Enterococcus* dépend directement de la proportion de dipeptides D-ala-D-lac dans l'ensemble des précurseurs de peptidoglycane (Allen and Nicas, 2003). Les deux autres gènes ne sont pas indispensables aux mécanismes de résistance : *vanY* code pour une carboxypeptidase capable de cliver les dipeptides D-ala-D-ala au niveau des polymères de peptidoglycane et *vanZ* code pour une protéine de fonction inconnue. L'expression de ce cluster de gènes est contrôlée par un système de régulation à deux composants (systèmes sur lesquels nous reviendrons en détail dans la prochaine partie) codé par les gènes *vanR* et *vanS*. Ces systèmes permettent la détection de l'antibiotique et la co-induction de l'expression de tous les gènes *van*.

Suivant l'origine de ces gènes, leur localisation génétique, leur similarité et le phénotype de résistance auxquels ils conduisent, on distingue 5 types de clusters de gènes *van* chez les Entérocoques (Cetinkaya *et al.*, 2000). Les clusters de type A ou B sont des clusters de gènes acquis par les entérocoques et très présent chez *E. faecalis* et *E. faecium*. Les gènes de type A confèrent une résistance à la vancomycine et à la téicoplanine. Les gènes de type B confèrent une résistance spécifique à la vancomycine avec un niveau de protection très élevé. Les deux ligases de chacun de ces clusters présentent 76% de similarités. Les gènes de type C, trouvés chez *E. gallinarium*, codent pour une machinerie légèrement différente : la ligase de type C forme un dipeptide D-ala-D-ser présentant lui aussi une faible affinité pour la vancomycine (Sahm *et al.*, 1995). Les clusters de type D sont très similaires aux types A et B. Cependant, leur localisation exclusive sur le chromosome d'*E. faecium* fait qu'ils ne sont pas transférables contrairement aux types A et B localisés sur des transposons. Les clusters de type E, enfin, sont similaires aux types C et rencontrés chez *E. faecalis*.

#### - Les PBPs de faibles affinités

De nombreuses PBPs présentant une affinité réduite pour les  $\beta$ -lactames ont été répertoriées dans beaucoup de bactéries pathogènes. On peut citer par exemple la protéine PBP5 d'*E. faecium* pour laquelle il est montré que son niveau de production détermine le niveau de résistance de cette bactérie aux  $\beta$ -lactames (Williamson *et al.*, 1983). Inversement



la perte de cette protéine entraîne un phénotype de sensibilité aux  $\beta$ -lactames (Fontana *et al.*, 1985).

Les protéines PBP2x de *S. pneumoniae* et PBP2' de *S. aureus* sont également impliquées dans la résistance aux  $\beta$ -lactames et peuvent assurer la polymérisation du peptidoglycane lorsque les autres PBPs de la cellule sont inhibées par ces antibiotiques (Chambers, 1997; Munoz *et al.*, 1992). Bien qu'étant un antibiotique semi-synthétique, la méthicilline est aujourd'hui très peu utilisée en médecine depuis l'apparition des MRSA (*S. aureus* résistant à la méthicilline) dans lesquels MecA est la PBP de faible affinité responsable de ce phénotype de forte résistance (Garcia-Castellanos *et al.*, 2003). Cependant, plus généralement, plusieurs PBPs de faibles affinités doivent être présentes dans un même organisme pour conduire à un tel phénotype (Hakenbeck *et al.*, 1999).

Ces PBPs de faibles affinités sont les produits de gènes mosaïques dans lesquels les séquences dites « sensibles » ont été substituées par des séquences dites « résistantes » aux  $\beta$ -lactames (Dowson *et al.*, 1994). Ces séquences mosaïques ont bien été étudiées pour la protéine PBP2x de *S. pneumoniae* et l'auteur montre qu'il existe plus de 20 protéines PBP2x différentes qui présentent des affinités faibles ou très faibles pour les  $\beta$ -lactames (Hakenbeck, 1995).

#### - Modification de la charge nette de la cible et inhibition des interactions électrostatiques

Les propriétés cationiques de certains antibiotiques leur permettent d'interagir avec les constituants phospholipidiques anioniques de la membrane cytoplasmique, ou les lipopolysaccharides des membranes externes. Certaines bactéries ont la capacité de modifier la charge nette de ces constituants membranaires afin de réduire leur interaction avec l'antibiotique.

Les membranes cytoplasmiques de *S. aureus* et *L. monocytogenes* contiennent des phospholipides dont la charge négative est souvent neutralisée par l'ajout de résidus lysines chargés positivement. Les L-lysyl-phosphatidylglycérols et les L-lysyl-cardiolipines sont parmi les constituants majeurs de la membrane de *Listeria spp.* (Fischer and Leopold, 1999). Le gène *mprF* (pour multiple peptide résistance factor) de *S. aureus* code pour l'enzyme impliqué dans cette lysnylation des phospholipides membranaires et des homologues de ce gène sont trouvés dans les génomes de *B. anthracis* et *E. faecalis* (Peschel and Collins, 2001). Un mutant de *S. aureus* délété du gène *mprF* est hypersensible aux antibiotiques cationiques et inversement, la surexpression de la protéine MprF chez *E. coli* augmente la résistance de cette bactérie aux peptides cationiques (Staubitz *et al.*, 2004).

Chez les bactéries à Gram négatif on trouve un mécanisme de modification similaire au niveau du lipide A de la membrane externe, composant du lipopolysaccharide. Les gènes *pmrE* et *pmrHFIJKL* de *S. enterica* lui confère une résistance à la polymyxine et codent pour une machinerie permettant la synthèse et l'ajout d'aminoarabinose, chargé positivement, au niveau du lipide A. Cette modification de la charge nette du lipide A réduit drastiquement l'interaction de la polymyxine avec sa cible (Gunn *et al.*, 1998). La résistance à la protégrine chez *Proteus mirabilis* implique un mécanisme similaire (McCoy *et al.*, 2001).

#### - Résistance à la D-cyclosérine

La D-cyclosérine inhibe la formation du dipeptide D-ala-D-ala en servant de substrat suicide pour les enzymes Alanine racémase (ALR) et D-ala-D-ala ligase (DDL). Le mécanisme d'immunité des producteurs de cet antibiotique, *Streptomyces lavendulae* et *Streptomyces garyphalus*, consistent en la production d'enzymes ALR et DDL ayant une faible affinité pour la D-cyclosérine. Les constantes de dissociation des enzymes ALR et DDL de *S. lavendulae* avec la D-cyclosérine sont très supérieures à celles des enzymes ALR et DDL d'*E. coli*. D'autre part, la surexpression des enzymes ALR et DDL de *S. lavendulae* confère un haut niveau de résistance à la D-cyclosérine à *E. coli* (Noda *et al.*, 2004a). Les mêmes auteurs ont mis en évidence que l'insensibilité de l'enzyme ALR de *S. lavendulae* à la D-cyclosérine s'explique par les caractéristiques structurales particulières de l'enzyme (Noda *et al.*, 2004b).

### 3. Réduction de la pénétration de l'antibiotique

La plupart des antibiotiques doivent franchir plusieurs barrières pour atteindre leur cible : la membrane externe des bactéries à Gram négatif, la paroi et enfin la membrane plasmique. Certains mécanismes de résistance ont pour but la modification de la perméabilité de ces différentes barrières afin d'empêcher la pénétration de l'antibiotique. Nous allons présenter quelques uns de ces mécanismes.

#### 3.1. Modifications des constituants de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif

Le lipide A des bactéries à Gram négatif peut être modifié par l'ajout d'une chaîne acylée supplémentaire, ce qui permet de rigidifier la membrane externe et d'en diminuer sa

perméabilité (Fig.44). Il a été observé que ce mécanisme conférait une résistance à de nombreux antibiotiques cationiques comme la cathélicidine LL-37 (Bishop *et al.*, 2000) ou la protégrine (Guo *et al.*, 1998). On trouve ce type de mécanisme chez *S. enterica* (Guo *et al.*, 1998) et *P. aeruginosa* (Ernst *et al.*, 1999).

La membrane externe des bactéries à Gram négatif contient également des porines essentielles aux échanges de nutriments avec le milieu extérieur. L'ouverture de ces porines permet à certains antibiotiques, les  $\beta$ -lactames notamment, de franchir cette membrane et d'atteindre leur cible. Certaines souches de *P. aeruginosa* ou de *Klebsiella pneumoniae* ayant perdu respectivement la porine OMP-D2 ou la porine OMP-K36 deviennent hautement résistantes aux  $\beta$ -lactames de type imipenem (Gootz, 2004; Jacoby *et al.*, 2004).

### 3.2. Modifications des constituants de la paroi

Ce type de mécanisme concerne essentiellement les bactéries à Gram positif comme *S. aureus*. Etant donné leur petite taille, les antibiotiques franchissent en général facilement les mailles de peptidoglycane. Cependant, la paroi présente une forte épaisseur et s'avère difficile à franchir à la suite de certaines modifications. L'une d'entre elles consiste en la D-alanylation des acides téichoïques et lipotéichoïques c'est-à-dire en l'ajout de résidus D-alanine sur les chaînes alditols de ces constituants. Cette addition réduit sensiblement la charge nette négative de la paroi bactérienne et augmente l'imperméabilité de cette paroi à de nombreux antibiotiques cationiques.

L'opéron *dlt*, comportant 4 gènes *dltABCD*, est présent dans tous les génomes des Firmicutes et code pour la machinerie impliquée dans ces D-alanylations. *dltC* code pour une protéine, dite « carrier », pouvant prendre en charge un résidu D-alanine (Heaton and Neuhaus, 1994) ; *dltA* code pour la ligase permettant d'activer le résidu D-alanine et de l'associer à la protéine DltC (Neuhaus *et al.*, 1996) ; *dltD* code pour une protéine procédant à l'alanylation du groupement alditol au niveau de l'acide téichoïque (Peschel *et al.*, 1999) ; et enfin *dltB* est supposé codé pour la protéine permettant la sécrétion du complexe DltC-D-alanine vers le peptidoglycane (Fig.45) (Neuhaus and Baddiley, 2003).

La corrélation du taux de D-alanylation du peptidoglycane avec diverses résistances aux antibiotiques a été observée dans plusieurs bactéries à Gram positif comme *S. pneumoniae* et les résistances à la nisine et à la gallidermine (Kovacs *et al.*, 2006), *S. aureus* et les résistances aux défensines et protégrines (Peschel *et al.*, 1999), *L. monocytogenes* et la résistance aux bactériocines de classe IIa (Vadyvaloo *et al.*, 2004a), *B. subtilis* et la résistance à la méthicilline et enfin *E. faecium* et la résistance à la pénicilline (Gutmann *et al.*, 1996).

### 3.3. Modifications des propriétés de la membrane plasmique

La formation de pores membranaires par les lantibiotiques de type A comme la nisine semble dépendante du potentiel membranaire ( $\Delta\psi$ ) et du gradient de pH qui énergisent la membrane. Il a été observé récemment qu'un mécanisme bioénergétique était à l'origine de modifications des propriétés de la membrane plasmique et d'une résistance à la nisine chez *L. monocytogenes* (Bonnet *et al.*, 2006). Ce mécanisme est une réponse globale de la bactérie aux conditions acides et se traduit par l'atténuation du  $\Delta\psi$  et la diminution de la force proton motrice due au gradient de pH. Les auteurs observent également une augmentation du pool d'ATP intra-cellulaire due à une diminution de l'activité du transporteur FoF1 ATPasique qui produit la force proton motrice membranaire (Bonnet *et al.*, 2006).

## 4. Les systèmes actifs d'efflux d'antibiotiques, focalisations sur les transporteurs de type ABC

C'est l'un des principaux mécanismes qui permet l'acquisition de phénotype de résistance voire de multi-résistance. Etant donné l'importance que nous avons porté à ces mécanismes durant notre étude, nous allons détailler plus précisément cette partie.

### 4.1. Une grande variété de pompes d'efflux bactériennes

Les mécanismes d'efflux actifs font intervenir une grande variété de transporteurs membranaires répartie globalement en deux grandes familles : les transporteurs de type ABC (pour ATP Binding cassette) auxquels nous nous sommes particulièrement intéressés, et les transporteurs dits secondaires, répartis dans 4 classes et qui sont énergisés par un gradient ionique (force proton motrice (PMF) ou Na<sup>+</sup>) (Fig.46).

Les transporteurs PMF-dépendants utilisent le gradient de pH pour énergiser le transport (antiporteurs-H<sup>+</sup>) et sont impliqués dans des résistances à de nombreux antibiotiques comme les fluoroquinolones, les tétracyclines, les lincosamides et les  $\beta$ -lactames (Van Bambeke *et al.*, 2000; Van Bambeke *et al.*, 2003). Ils forment 3 classes différentes nommées SMR (Small Multidrug Resistance), prenant en charge des allocrites lipophiles et multi-cationiques, RND (Resistance/Nodulation/Division), souvent couplés à des protéines de membrane externe et prenant en charge des allocrites amphiphiles, et MFS (Major Facilitator Superfamily) prenant en charge des allocrites amphiphiles mono ou dicationiques. Les transporteurs de type MATE

(Multidrug And Toxic compound Extrusion) dépendent d'un gradient ionique  $\text{Na}^+$  et sont capables d'exporter les composés cationiques et les fluoroquinolones (Morita *et al.*, 2000).

La participation de ce type de transporteurs dans les résistances aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne est peu documentée. Les deux principaux exemples sont, d'une part, le transporteur de type RND MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* impliqué dans la résistance à la cathélicidine humaine LL-37 et la protégrine porcine (Shafer *et al.*, 1998) et, d'autre part, le transporteur de type MFS QacA de *S. aureus* qui confère une résistance à la thrombocidine du lapin (Kupferwasser *et al.*, 1999).

Nous nous sommes principalement intéressé aux transporteurs de type ABC, capables d'effectuer un transport actif en hydrolysant l'ATP. Ces transporteurs sont présents dans tous les règnes du vivant et, important ou exportant une grande variété de composés, ils sont impliqués dans de nombreux échanges avec le milieu extérieur (Ames *et al.*, 1990; Higgins, 1992). Le terme allocrite est employé pour définir le composé pris en charge par le transporteur. En effet, le véritable substrat du transporteur ABC est l'ATP. D'une manière générale, un transporteur ABC est spécifique d'un allocrite ou d'un groupe d'allocrites qu'il prend en charge. Cependant, ces transporteurs peuvent être responsable de phénotypes de multi-résistance à diverses drogues et antibiotiques et compliquent notamment les traitements anti-cancéreux chez l'homme (Lage, 2003). La protéine LmrA de *L. lactis* est un exporteur de type ABC, homologue de la P-glycoprotéine humaine, conférant des résistances multiples aux  $\beta$ -lactames, aux glycopeptides, aux aminoglycosides, aux quinolones, aux tétracyclines et enfin aux streptogramines (Putman *et al.*, 2000). De nombreux exemples de résistances ou de sécrétions d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne ont été caractérisés comme impliquant des transporteurs ABC et sont présentés dans le tableau 1.

#### 4.2. Structure des Transporteurs ABC

Le prototype d'un transporteur ABC est constitué de 4 domaines : deux domaines hydrophobes transmembranaires (MSD pour Membrane Spanning Domain) qui forment la perméase membranaire, et deux domaines hydrophiles (NBD pour Nucleotide Binding Domain) associés de façon périphériques à la membrane et énergisant le transport en fixant et hydrolysant l'ATP (Fig.47). Certains domaines NBD n'ont pas de partenaires MSD et ne semblent donc pas impliqués dans des mécanismes de transport. Ils interviennent alors dans plusieurs processus cellulaires tels que la traduction (Tyzack *et al.*, 2000), la synthèse du ribosome (Dong *et al.*, 2004), la réparation de l'ADN et la ségrégation du chromosome

(Hopfner and Tainer, 2003), la résistance au stress oxydatif (Nachin *et al.*, 2003) ou encore la résistance aux antibiotiques (Kerr *et al.*, 2005).

Bien que les 4 domaines soient toujours présents dans un transporteur ABC fonctionnel, leur organisation varie du fait que les domaines NBD et MSD puissent être codés par un ou plusieurs gènes. Chez les procaryotes, seules des structures présentant deux domaines fusionnés sont observées (Fig.48). Le transporteur LmrA de *L. lactis* est ainsi constitué d'un homodimère de deux modules correspondant chacun à la fusion d'un domaine NBD et d'un domaine MSD (Fig.48). On trouve également des transporteurs ABC dans lesquels les deux domaines MSD sont fusionnés (cas de l'importeur de ferrichrome FhuBC d'*E. coli*) ou dans lesquels les deux domaines NBD sont fusionnés (cas de l'importeur d'arabinose AraHFG d'*E. coli*) (Fig.48).

Certaines protéines accessoires sont parfois associées aux transporteurs ABC. Chez les importeurs on trouve systématiquement une protéine nommée SBP (pour Solute Binding Protein) présente sous forme soluble dans le périplasma des bactéries à Gram négatif ou ancrée à la membrane plasmique chez les bactéries à Gram positif, et ayant une affinité spécifique pour l'allocrite devant être importé. Par ailleurs, les systèmes de sécrétion impliquant des transporteurs ABC sont souvent accompagnés de protéines accessoires permettant à l'allocrite de franchir entièrement les barrières de l'enveloppe bactérienne. Ainsi, le système de sécrétion de type I associe les transporteurs ABC avec des protéines de type MFP (Membrane Fusion Protein) et sont impliqués notamment dans la sécrétion de bactériocines de classe II chez les bactéries lactiques (Young and Holland, 1999). Chez les bactéries à Gram négatif, ce système de sécrétion de type I est complété par des protéines de type OMP (Outer Membrane Protein) permettant le franchissement de la membrane externe.

#### 4.3. Classification des transporteurs ABC

Les comparaisons de séquences des domaines NBD ont tout d'abord permis de mettre en évidence des motifs très conservés impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Fig.49 ; Fig.50 ci-après) (Linton and Higgins, 1998). Le même type d'étude réalisée sur les domaines MSD montre que ces derniers sont beaucoup moins conservés. Les MSD contiennent de 4 à 12 fragments transmembranaires qui ne jouent pas tous un rôle essentiel dans le transport (Blight *et al.*, 1994). Les extrémités N et C-terminales des MSD sont cytoplasmiques. Chez les importeurs, un motif conservé nommé EAA a été caractérisé dans la boucle cytoplasmique à une centaine de résidus de l'extrémité C-terminale. Ce motif est

impliqué dans l'interaction avec le domaine NBD du transporteur et présente de fortes conservations lorsqu'un même type d'allocrite est transporté (Saurin *et al.*, 1994).

Le séquençage des génomes de plusieurs micro-organismes (*B. subtilis*, *E. coli* et *M. tuberculosis*) ont permis d'identifier l'ensemble des gènes codant pour des transporteurs ABC chez ces bactéries et d'établir une classification des transporteurs ABC en fonction de leur similarité de séquence. Ainsi, en utilisant le même type de classification, 12 sous-familles de domaines NBD ont été identifiées chez *B. subtilis* (Quentin *et al.*, 1999) et *M. tuberculosis* (Braibant *et al.*, 2000) et 10 sous-familles chez *E. coli* (Linton and Higgins, 1998). Il apparaît clairement que chaque sous-famille est impliquée dans l'import ou l'export d'allocrites similaires, ce qui permet la prédiction de la nature de l'allocrite pris en charge par des transporteurs ABC de fonction inconnue. D'autre part, le même type d'étude sur les domaines MSD montre que, dans la plupart des cas, une classe de domaines MSD est associée avec une sous-famille de domaines NBD, suggérant une co-évolution des différents domaines dans ces systèmes de transport.

Trois familles de domaines NBD apparaissent ainsi comme impliquées dans des systèmes d'efflux d'antibiotiques (banque de donnée Acedb, <http://www-abcd.biotoul.fr/>) (Quentin and Fichant, 2000):

- la famille 6 rassemble globalement des transporteurs ABC impliqués dans les systèmes de sécrétion d'antibiotiques chez les organismes producteurs de ces antibiotiques (Tableau 1, cadre pointillé jaune). On trouve également dans cette sous-famille les exporteurs de type LmrA de *L. lactis* qui confèrent des phénotypes de multi-résistances. L'organisation des domaines de l'ensemble de ces transporteurs ABC est similaire à l'organisation des domaines de LmrA, avec le domaine NBD fusionné au domaine MSD (Fig.48).

- la famille 7 contient en particulier des transporteurs ABC à 4 domaines non fusionnés et semblent impliqués dans les mécanismes d'immunité aux antibiotiques (Tableau 1, cadre pointillé bleu).

- la famille 9, enfin, rassemble des transporteurs ABC prédits comme étant des exporteurs et semblant impliqués dans des systèmes d'immunité (immunité à la salivaricine pour le transporteur SalTX) ou des systèmes de résistance aux antibiotiques (Tableau 1, cadre pointillé vert). Chez *B. subtilis*, 8 protéines sont classées dans cette sous-famille et présentent en moyenne 60 % de similarités de séquences (Quentin *et al.*, 1999). Nous nous sommes particulièrement intéressés à 3 d'entre elles, nommées BceA (anciennement YtsC), YvcR et YxdL et à leur partenaire MSD nommé BceB (anciennement YtsD), YvcS et YxdM.

#### 4.4. Fonctionnement des exporteurs de drogues et antibiotiques

Deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme d'efflux d'antibiotiques par les transporteurs ABC :

- le modèle de type « flippase » propose que l'antibiotique soit recruté au niveau du feuillet interne de la membrane puis transloquer dans le feuillet externe par un changement de conformation du transporteur. L'antibiotique peut alors diffuser dans le milieu externe (Higgins and Gottesman, 1992).

- le modèle de type « vacuum cleaner » propose un rejet complet de l'antibiotique dans le milieu extérieur après l'avoir recruté dans la membrane (Gottesman and Pastan, 1993).

Dans les deux cas, ces modèles impliquent des changements conformationnels du transporteur ABC passant d'une conformation ouverte (non lié à l'allocrite) vers une conformation fermée (transportant l'allocrite) et inversement. Le mécanisme de fonctionnement d'un exporteur ATP dépendant a été mis en évidence par de récentes études structurales et biochimiques et est nommé modèle « Switch-ATP » (Fig.51) (Higgins and Linton, 2004; Linton and Higgins, 2006). Ce modèle, d'une part, propose que la fixation et l'hydrolyse de l'ATP permettent respectivement la formation et la dissociation d'un dimère « fermé » des domaines NBD (Fig.51) et, d'autre part, implique une communication entre les domaines NBD et les domaines MSD.

On peut distinguer 4 étapes principales dans le mécanisme de transport :

1) Le cycle de transport est initié par la fixation de l'allocrite sur un site de forte affinité présent au niveau des domaines MSD. Il a été montré que cette fixation engendre des changements conformationnels au niveau des domaines NBD (communication aller) (Manciu *et al.*, 2003; Sonveaux *et al.*, 1999).

2) Cela augmente l'affinité des domaines NBD pour l'ATP. Un dimère « fermé » des domaines NBD est formé dans lequel deux molécules d'ATP sont insérées. La formation de ce dimère provoque un changement conformationnel important dans les domaines MSD, c'est la communication retour. Le site de fixation de l'allocrite, d'une part, perd son affinité et, d'autre part, est réorienté vers le feuillet externe (flippase) ou vers le milieu extérieur (« vacuum cleaner »). Ceci permet le relâchement de l'allocrite.

3) L'ATP est hydrolysé ce qui déstabilise le dimère fermé des domaines NBD. Le transporteur est alors dans un état transitoire où les domaines NBD sont fixés à l'ADP et au phosphate inorganique (Pi) et le site de fixation de l'allocrite est toujours de faible affinité (Urbatsch *et al.*, 2003).



4) Il semble que seul le relâchement complet de l'ADP et du Pi permet au transporteur de retrouver son état initial dans lequel les domaines NBD sont en conformation ouverte et le site de fixation de l'allocrite retrouve son affinité maximale.

Ce modèle semble correspondre à la majeure partie des transporteurs ABC. Cependant, il semble incomplet dans le cas de transporteur prenant en charge plusieurs allocrites différents. Il est proposé, dans ce cas, que les domaines MSD possèdent plusieurs sites de fixation d'allocrites et, que chaque étape du cycle de transport peut provoquer un changement d'affinité dans un ou plusieurs de ces sites. Ainsi, aussi bien la fixation de l'ATP, l'hydrolyse d'ATP, le rejet d'ADP ou le rejet de Pi sont-ils susceptibles de provoquer un changement conformationnel réduisant ou augmentant l'affinité des domaines MSD pour un allocrite (Linton and Higgins, 2006). Ceci a notamment été observé avec la P-glycoprotéine de l'homme (Rosenberg *et al.*, 2001).

En résumé, l'ensemble de ces mécanismes de résistance constitue pour les bactéries un arsenal de défense contre les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Nous allons voir que les déterminants génétiques de ces résistances sont l'objet de mécanismes de régulations complexes permettant à la bactérie de répondre de façon coordonnée à la présence d'un antibiotique dans son environnement.

## B- Mécanismes de régulation permettant une réponse adaptée des bactéries aux stress de l'enveloppe.

### 1. Les « Cell Wall Stress » Stimulon

Les outils actuels d'analyse globale de transcriptomes et protéomes ont permis d'effectuer de nombreuses études chez divers micro-organismes Firmicutes. Celles-ci mettent en exergue un réseau de régulation complexe en réponse à la présence d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Une des premières études de ce type a été réalisée pour analyser la réponse de *B. subtilis* à la présence de bacitracine (Mascher *et al.*, 2003). Les résultats de cette étude, qui recourent plusieurs de nos résultats, seront détaillés plus loin.

La table 1 présente 5 études de transcriptome réalisées chez des Firmicutes exposés à l'action d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne (Kramer *et al.*, 2006; McCallum *et al.*, 2006; Mongodin *et al.*, 2003; Pietiainen *et al.*, 2005; Utaida *et al.*, 2003; Wecke *et al.*, 2006). Les gènes sont classés suivant leur fonction (caractérisée ou putative) et leur niveau d'induction (induits en blanc et réprimés en gris). Sur une même ligne nous avons disposés les gènes homologues ou codant pour des fonctions similaires.

La première observation découlant de ce type d'étude est que les bactéries modulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans des fonctions très diverses et ceci en réponse à la présence d'un antibiotique. On compte par exemple 62 gènes induits et 31 réprimés en réponse à la nisine chez une souche de *L. lactis* non-productrice de nisine (Kramer *et al.*, 2006), 69 gènes induits et 41 réprimés en réponse à la vancomycine chez *S. aureus* (McCallum *et al.*, 2006) ou encore 105 gènes induits en réponse à chacun des 3 antibiotiques D-cyclosérine, bacitracine ou oxacilline chez *S. aureus* (Utaida *et al.*, 2003). Seule une partie de ces gènes sont représentés dans la table 1.

De manière logique, la plupart des gènes induits codent pour des enzymes impliqués dans la synthèse des constituants de la paroi (table 1, partie 1, cadre bleu). On retrouve par exemple les PBPs, les autolysines, les enzymes Mur impliqués dans la synthèse de peptidoglycane, les enzymes Tag impliqués dans la synthèse des acides téichoïques, ou encore les N-acétyl-Glucosamine-6P-isomérase (gènes *nag*) qui optimisent le rendement de synthèse de ces constituants (Kramer *et al.*, 2006). Les auteurs expliquent qu'au contact de tels antibiotiques, les Firmicutes produisent une paroi plus épaisse. Ceci a été observé par microscopie chez des souches de *S. aureus* ayant acquis une résistance importante à la vancomycine (Mongodin *et al.*, 2003). Par ailleurs, 2 gènes codant pour des PBPs

apparaissent comme réprimés chez *S. aureus* à la suite de son exposition à la vancomycine (table 1, partie 1, colonne 2, cadre bleu). Nous avons vu que l'affinité des PBPs pour la vancomycine peut varier d'une protéine à l'autre (voir partie III). On peut alors supposer que la production des PBPs est modulée suivant leur affinité pour la vancomycine, ce qui permettrait à *S. aureus* de produire majoritairement des protéines de faible affinité pour la vancomycine en réponse à la présence de l'antibiotique. De manière similaire, une analyse protéomique a montré que la production de la protéine PBP1A de *S. pneumoniae* est inhibée en réponse à la pénicilline (Soualhine *et al.*, 2005).

Certains mécanismes de résistance, dont certains ont déjà été présentés, apparaissent clairement comme activés par ces antibiotiques.

- On retrouve tout d'abord des gènes codant des machineries de modification des constituants de la paroi : l'opéron *dlt*, codant pour l'ajout de charges positives dans la paroi ; l'opéron *gal*, codant pour l'incorporation de résidus galactoses dans les acides lipotéichoïques augmentant ainsi leur rigidité (Kramer *et al.*, 2006) ; l'opéron *cap* chez *S. aureus*, codant pour la production de polysaccharides dans la couche S de la paroi réduisant notamment la pénétration des antibiotiques (Utaiida *et al.*, 2003).

- On retrouve également des gènes codant pour des modifications de la membrane plasmique, comme l'augmentation du taux de cardiolipines membranaires (gène *ywiE* de *B. subtilis*), ou la diminution du taux d'acides gras saturés (répression de l'opéron *fab* de *L. lactis*). Ces mécanismes sont supposés densifier la membrane plasmique et réduire la pénétration d'antibiotiques cationiques (Kramer *et al.*, 2006; Pietiainen *et al.*, 2005). D'autre part, la voie de dégradation de l'arginine, dont les enzymes sont codés par l'opéron *arc* (table 1, partie 1, colonne 1 et 3, cadre métabolisme) produit de l'ornithine, du dioxyde de carbone et de l'ammonium. Ceci est supposée aboutir à une augmentation du pH de surface et empêcherait l'interaction d'antibiotiques cationiques avec la membrane (Kramer *et al.*, 2006).

- Enfin, les gènes codant des transporteurs ABC sont très bien représentés dans tous les transcriptomes (Table 1, partie 3, cadre violet). Beaucoup sont de fonctions inconnus mais les auteurs supposent que ces transporteurs augmentent probablement la capacité d'efflux d'antibiotiques des bactéries.

La mise en place de tous ces mécanismes a un coût certain pour la bactérie. On trouve ainsi de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire central. Ceci dénote une réorientation globale du métabolisme de la bactérie probablement pour répondre aux stress ressentis au niveau de l'enveloppe bactérienne. Les voies métaboliques étant complexes, il est difficile de mesurer les conséquences de chacune des inductions ou répression de gènes

observés dans ces analyses. Cependant, une des réponses métaboliques la mieux décrite est celle de *S. aureus* à la présence de vancomycine (table 1, partie 1, cadre orange, colonne 2). Mongodin *et coll.* expliquent que les composés habituellement utilisés dans la glycolyse, comme le glucose, le fructose, et le glycéraldéhyde-3P, sont nécessaires pour renouveler rapidement les constituants de la paroi (précurseur de peptidoglycane, polysaccharides, acides téichoïques) en présence de vancomycine. On observe d'ailleurs que les gènes codant les importeurs de composés sucrés du système PTS sont induits (table 1, partie 3, cadre système PTS, colonne 2). D'autre part, on observe que l'opéron *pur*, codant les enzymes de la biosynthèse des purines, est également fortement induit. Les auteurs expliquent que cette voie de biosynthèse est un mécanisme alternatif de synthèse d'AMP puis d'ATP qui palie probablement à la diminution de la quantité d'ATP normalement obtenue par glycolyse (Mongodin *et al.*, 2003). On retrouve un mécanisme similaire dans la réponse métabolique de *B. licheniformis* à la présence de vancomycine et bacitracine (table 1, partie 1, colonne 5, cadre métabolisme). En effet, l'induction de l'opéron *pyr*, codant les enzymes de biosynthèse des pyrimidines, est également un mécanisme de synthèse alternative d'ATP.

Les mécanismes que nous venons de passer en revue, à savoir le métabolisme d'économie d'énergie dédié à la synthèse de la paroi, les mécanismes de synthèse et de modification de l'enveloppe et enfin les mécanismes de transport peuvent tous être reliés à une mise en place de différents modes de résistances à l'antibiotique. Ceci est bien illustré pour la résistance à la nisine chez une souche de *L. lactis* non-productrice de nisine (Fig.52) (Kramer *et al.*, 2006).

La présence d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne semble également provoquer la mise en place d'autres réponses. Les réponses adaptatives aux stress impliquent souvent, d'une part, des protéines de stress généraux comme des protéines répondant au choc phagique, au choc de température ou au choc de pH, et, d'autre part, des protéines interagissant avec l'ADN comme les hélicases, les topoisomérases, les recombinaisons et les enzymes de réparation. On retrouve dans ces transcriptomes la plupart des gènes codant ces protéines (table 1, partie 2, cadre jaune) et l'on peut supposer qu'elles ne font pas partie de la réponse spécifique de la bactérie à un antibiotique.

Par ailleurs, on observe également l'induction de gènes impliqués dans des mécanismes de virulence chez *S. aureus* (production d'exotoxines, perte de protéines de surface, production de bactériocines), ou des mécanismes de résistance dirigés contre le tellure, les cations toxiques, la fosfomycine ou encore l'arsenic. Ces mécanismes de résistances

impliquent parfois des transporteurs ABC, de ce fait, il est supposé que ces transporteurs peuvent également participer à l'efflux d'antibiotiques (Kramer *et al.*, 2006).

En conclusion, ces études montrent clairement que les bactéries peuvent, lorsqu'elles sont mises en présence d'un antibiotique, moduler l'expression de plusieurs gènes afin d'activer l'expression de déterminants de résistance, de diminuer la production des cibles de l'antibiotique, d'activer la production d'autres antibiotiques, de mettre en place un métabolisme global d'économie d'énergie et enfin de récupérer l'intégrité de leur enveloppe. Le terme *stimulon* désigne ainsi un ensemble de gènes répondant de manière coordonnée à un stimulus de l'environnement, le stress de l'enveloppe bactérienne dans notre cas. Le grand nombre de gènes impliqués dans ces *stimulons* suggère l'existence d'un réseau de systèmes de régulation (ou « *network* ») capable de détecter puis de répondre aux attaques de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne. Deux types de système de régulation ont été clairement identifiés comme participant à la détection de stress de la paroi : les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ou ECFs) et les phosphorelais (ou systèmes à deux composants, TCS).

## 2. Les facteurs sigmas à fonction extracytoplasmique ou ECFs

### 2.1. Définition et mécanisme d'action

Les facteurs sigma sont essentiels à l'ARN polymérase, enzyme centrale de la transcription génétique, et ils déterminent la sélectivité des promoteurs lors de la transcription. La substitution d'un facteur sigma par un autre peut rediriger une partie ou l'ensemble des ARN polymérases vers la transcription de gènes normalement silencieux. Les facteurs sigma bactériens font globalement partie de deux grandes familles :  $\sigma^{70}$  ou  $\sigma^{54}$  (Gross *et al.*, 1998). La première famille peut être phylogénétiquement divisée en 5 groupes correspondant souvent à des fonctions similaires. Le groupe 1, dont font partie le facteur  $\sigma^{70}$  d' *E. coli* et ses orthologues, correspond aux facteurs sigma dits « primaires » essentiels aux bactéries car ils participent à la majorité de l'activité de transcription durant la croissance exponentielle (Lonetto *et al.*, 1992). Ces facteurs sigma reconnaissent les boîtes -10 (TATAAT) et -35 (TTGACA) conservées dans la majorité des séquences promotrices de gènes. En opposition à ces facteurs « primaires » et essentiels, les 4 autres groupes des facteurs sigma de la famille  $\sigma^{70}$  sont définis comme alternatifs et reconnaissent des boîtes promotrices -10 et -35 différentes.

Le groupe 4 correspond aux facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ou ECFs). Ils ont été dénommés ainsi car ils sont, d'une part, activés en réponse à des stimuli extracytoplasmiques (tels que les chocs osmotiques, les chocs thermiques ou les stress de la paroi) et, d'autre part, ils activent la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans des fonctions extracytoplasmiques (Missiakas and Raina, 1998). Il est à noter que chez de nombreuses bactéries du groupe des Firmicutes les réponses aux stress généraux dus à des conditions limitantes de croissance font intervenir un facteur sigma alternatif appelé  $\sigma^B$  et classé dans le groupe 3 (Petersohn *et al.*, 2001).

Les gènes codant pour les ECFs (*sig1* et *sig2* sur la Fig.53) sont co-transcrits avec un gène partenaire (Fig.53, *rsi1* et *rsi2*) dont les produits ont une fonction régulatrice. Dans la plupart des cas, les protéines Rsi agissent comme des facteurs anti-sigma ( $\alpha\text{-}\sigma$ ) spécifiques en séquestrant le facteur sigma au niveau de la face interne de la membrane plasmique en absence de stimulus (cas de  $\alpha\text{-}\sigma^1$  séquestrant  $\sigma^1$  en bleu sur la Fig.53). En réponse à un signal extracytoplasmique spécifique (interaction avec un composé ou une protéine), la protéine  $\alpha\text{-}\sigma$  change de conformation et libère le facteur sigma qui peut alors être recruté par l'ARN polymérase pour activer la transcription de ses gènes cibles (cas du facteur  $\sigma^2$  en rose sur la Fig.53). Dans la plupart des cas, on observe une boucle d'autorégulation positive du facteur sigma sur ses propres gènes de structures et de régulation (*sig* et *rsi*) (Fig.53).

A chaque facteur sigma correspond donc un régulon spécifique. Sur la figure par exemple, le régulon  $\sigma^1$  correspond aux gènes *d*, *e* et *f* alors que le régulon  $\sigma^2$  correspond aux gènes *a*, *b* et *c*. Cependant, on observe fréquemment des recouvrements entre les différents régulons ECFs d'une même bactérie, grâce, d'une part, à la présence de plusieurs promoteurs cibles différents en amont d'un même gène, et, d'autre part, au fait que la séquence d'un promoteur cible puisse parfois être reconnue par différents facteurs  $\sigma$ .

Beaucoup de bactéries contiennent plusieurs ECFs codés dans leur génome. On en trouve 7 chez *B. subtilis*, 10 chez *M. tuberculosis*, 19 chez *P. aeruginosa* et environ 50 chez *Streptomyces coelicolor*.

## 2.2. Répertoire et fonction des ECFs de *Bacillus subtilis*

Sept gènes paralogues codant des ECFs ont été identifiés chez *B. subtilis* suite au séquençage de son génome effectué par Kunst *et coll* (Kunst *et al.*, 1997). Ils sont nommés  $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$ ,  $\sigma^Y$ ,  $\sigma^Z$  et  $\sigma^{ylaC}$ , et tous semblent exprimés chez *B. subtilis* (Horsburgh *et al.*, 2001). Le rôle respectif de 4 d'entre eux ( $\sigma^V$ ,  $\sigma^Y$ ,  $\sigma^Z$  et  $\sigma^{ylaC}$ ) est peu documenté (Cao *et al.*, 2003). Les quelques résultats d'analyse de transcriptome ont montré qu'ils étaient

tous autorégulés mais leur stimulus d'activation respectif reste inconnu. Les régulateurs des trois autres facteurs sigma sont mieux caractérisés.

- Le facteur  $\sigma^X$

Ce facteur sigma contrôle des modifications au niveau de l'enveloppe bactérienne. Les gènes qui sont exclusivement la cible de ce facteur sigma présentent des séquences consensus  $\{-35\}$ -tGtAAC-15,16-CG(A,T)C- $\{-10\}$  (Huang and Helmann, 1998), retrouvée en particulier au niveau des promoteurs des gènes *sigX* (codant le facteur sigma), *lytR* (codant un régulateur négatif des autolysines du peptidoglycane) (Lazarevic *et al.*, 1992), *csbB* (codant une glucosyl-transférase membranaire) (Akbar and Price, 1996), de l'opéron *pssA* (contrôlant la synthèse de phosphoéthanolamines membranaires) et de l'opéron *dlt*. On observe également l'activation de l'expression du régulateur RapD (Perego, 1998), suggérant que ces mécanismes de régulation interagissent avec d'autres voies de régulation.

Le régulon de  $\sigma^X$  présente quelques recouvrements avec les régulons des facteurs  $\sigma^W$ ,  $\sigma^M$  (voir ci-dessous) (Huang *et al.*, 1998) et  $\sigma^B$  (régulateur de la réponse au stress général chez *B. subtilis*). C'est notamment le cas du gène *pbpX* (codant une PBP), du gène *bcrC* (voir partie résultat) et du gène *yceC* (supposé participé à la résistance au tellure). Ces études ont permis de proposer que  $\sigma^X$  module la charge nette de l'enveloppe bactérienne conférant ainsi des résistances aux antibiotiques cationiques ciblant l'enveloppe. Il a en effet été observé qu'une souche de *B. subtilis* délétée du gène *sigX* est sensible à la nisine (Cao and Helmann, 2004).

- Le facteur  $\sigma^W$

Il est le facteur sigma le plus étudié. Le gène *sigW* est co-transcrit avec *rsiW*, codant son anti-sigma (Huang *et al.*, 1998), et autorégulé positivement à partir d'un promoteur  $P_W$  très similaire aux promoteurs de type  $P_X$  avec une séquence consensus  $\{-35\}$ -tGAAAC-16,17-CGTA- $\{-10\}$  (Huang *et al.*, 1999). Ainsi, si aucune autorégulation croisée n'est observée entre l'expression de  $\sigma^W$  et l'expression de  $\sigma^X$  (Huang *et al.*, 1998), de nombreux recouvrements sont trouvés entre les deux régulons. Diverses études, comme des analyses de transcriptome par microarray (Cao *et al.*, 2002a), des analyses de transcription *in-vitro* (Cao *et al.*, 2002a) ou encore des analyses *in situ* pour rechercher les promoteurs de type  $P_W$  dans le génome (Huang *et al.*, 1999), ont permis de définir le régulon de ce facteur sigma. Il apparaît que le régulon comprend plus de 50 gènes souvent impliqués dans des synthèses d'antibiotiques ou des mécanismes de défenses contre les antibiotiques ciblant l'enveloppe

bactérienne. Le régulon est induit en particulier par les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi avec comme premier inducteur la vancomycine, la céphalosporine C, la D-cyclosérine et la fosfomycine (Cao *et al.*, 2002b). Cependant, une souche de *B. subtilis* délétée au niveau du gène *sigW* semble n'être sensible qu'à la fosfomycine (Cao *et al.*, 2001). Dans les gènes induits par  $\sigma^W$  on trouve en particulier *pbpE* (codant une PBP de bas poids moléculaire), *fosB* (gène de résistance à la fosfomycine), de nombreux gènes codant des enzymes de détoxification comme une bromoperoxydase et une époxyde hydrolase (Huang *et al.*, 1999). En outre, ce régulon comprend également de nombreux gènes similaires à ceux codant des précurseurs de bactériocines (Jack *et al.*, 1995) ainsi que des gènes codant des transporteurs ABC de la sous-famille 6 et donc supposés permettre la sécrétion de ces bactériocines. Enfin, on trouve également des gènes codant des peptidases tels que SppA et YqeZ prédites comme intervenant dans des mécanismes d'immunité aux bactériocines comme ceux décrits pour l'entérocyne A de *E. faecalis* (O'Keeffe *et al.*, 1999). L'implication de  $\sigma^W$  dans la réponse aux stress de la paroi est donc clairement établi et Cao *et coll.* montre que la protéine RsiW, l'anti-sigma, est indispensable pour détecter le stress au niveau de la paroi (Cao *et al.*, 2002b).

#### - Le facteur $\sigma^M$

Le facteur  $\sigma^M$  est surtout exprimé de façon  $\sigma^A$  dépendante (facteur sigma majoritaire de la croissance végétative de *B. subtilis*) au début et jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance (Thackray and Moir, 2003). Ce profil d'expression est différent des deux facteurs sigma précédents, qui sont exprimés à un niveau maximal en fin de phase exponentielle pour  $\sigma^X$  et en début de phase stationnaire pour  $\sigma^W$  (Horsburgh *et al.*, 2001). Le gène *sigM* et les deux gènes en aval *yhdL* et *yhdK* (codant pour l'anti- $\sigma^M$ ) sont également contrôlés par un deuxième promoteur de type  $P_M$  reconnu par  $\sigma^M$ , faisant donc l'objet d'une autorégulation positive. Il a été montré que ce facteur sigma était nécessaire à la croissance en milieu salin (Horsburgh and Moir, 1999). Cependant, les conditions physiologiques qui induisent le régulon  $\sigma^M$  sont multiples et parmi celles-ci on compte une salinité élevée, un pH acide, la présence d'éthanol, de paraquat, d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne comme la bacitracine, la vancomycine et la fosfomycine et enfin les chocs thermiques (Thackray and Moir, 2003). L'analyse de la fonction des gènes appartenant au régulon  $\sigma^M$  montrent que ce facteur sigma est indispensable au maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne dans diverses conditions de stress. Ce régulon contient de nombreux recouvrements avec ceux des facteurs  $\sigma^W$  et  $\sigma^X$  (cas du gène *bcrC*, voir résultats). Une des particularités du régulon  $\sigma^M$  est la présence de gènes potentiellement impliqués dans des fonctions réparatrices de l'ADN, comme *radC* et *yack* (Helmann, 2002).



En conclusion, trois des ECFs de *B. subtilis* sont activés en réponse à de multiples stress de l'enveloppe bactérienne et contrôlent l'expression d'un grand nombre de gènes permettant le maintien de l'intégrité de cette enveloppe. On observe des recoupements, d'une part, au niveau des inducteurs physiologiques de ces régulons (antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi notamment) et, d'autre part, au niveau des gènes constituant les régulons. Cette redondance de réseau de régulation couplée au fait que les trois ECFs sont exprimés à trois stades de croissance successifs montrent que ces mécanismes permettent que la cellule puisse survivre à de nombreuses variations de l'environnement durant toutes les étapes de la croissance.

### 3. Les systèmes de transmission du signal (ou Systèmes à deux composants)

#### 3.1. Définition et mécanisme d'action

Fabret *et coll.* désignent joliment ces systèmes de phosphorelais bactériens comme étant les « yeux » d'un micro-organisme car ils permettent de détecter un stimulus spécifique de l'environnement, puis de mettre en place une cascade de phosphorylation activant un régulateur de réponse qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la réponse adaptée à ce stimulus (Fabret *et al.*, 1999).

Les phosphorelais les plus classiques comportent deux protéines et deux étapes de phosphorylation. La détection et l'initiation de la cascade de phosphorylation sont assurées par des senseurs, protéines Histidine Kinase (HK) généralement membranaires. Ces dernières possèdent un domaine détecteur N-terminal extracytoplasmique et un domaine transmetteur cytoplasmique à activité histidine kinase (Stock *et al.*, 1989). La transmission du signal vers l'expression de gènes cibles implique la participation d'une autre protéine appelée régulateur de réponse qui comporte un domaine receveur N-terminal et un domaine effecteur C-terminal. La régulation de l'expression des gènes cibles se fait via l'interaction du domaine effecteur du régulateur avec l'ADN. La transmission du signal faisant intervenir un phosphorelais classique est représentée dans la figure 54. On peut y distinguer 4 étapes successives :

(1) Le signal est détecté par le domaine détecteur du senseur engendrant une autophosphorylation du résidu histidine (H) conservé sur le domaine transmetteur et un changement de conformation.

- (2) Phosphotransfert : le groupement phosphate (P) est transféré sur un résidu aspartate conservé (D) du domaine receveur du régulateur de réponse.
- (3) Cette phosphorylation du domaine receveur provoque un changement conformationnel du régulateur, activant (ou libérant) son domaine effecteur. Ceci permet au régulateur d'activer ou de réprimer l'expression de ses gènes cibles.
- (4) L'activation du régulateur est un phénomène réversible. En absence de signal, le régulateur activé peut revenir à son état inactif en étant déphosphorylé. L'activité phosphatase peut être intrinsèque au régulateur de réponse (Hoch and Silhavy, 1995), portée par une phosphatase auxiliaire (Hess *et al.*, 1988) ou portée par le senseur (Shi *et al.*, 1999).

Les phosphorelais classiques sont formés d'une histidine kinase et d'un régulateur de réponse. L'exemple le plus caractéristique est le système EnvZ/OmpR impliqué dans l'osmorégulation chez *E. coli* (Fig.55) (Pratt and Silhavy, 1995). On distingue également chez les bactéries des phosphorelais dits « complexes » ou à pluridomains avec 4 étapes de phosphorylation (Perraud *et al.*, 1999) ce qui permet d'affiner la régulation. Ces phosphorelais complexes diffèrent suivant l'organisation des domaines respectifs du phosphorelais. En désignant par Hn les domaines transmetteurs des histidines kinases et Dn les domaines receveurs des régulateurs de réponse on peut représenter plusieurs types de phosphorelais rencontrés chez les bactéries (Fig.55). Le nombre de protéines portant les domaines H et D ainsi que le nombre de domaines portés par une même protéine sont variables. Dans les systèmes complexes, suite à l'autophosphorylation du domaine H1, le phosphate est transféré sur un domaine alternatif D1, puis transmis au niveau d'un domaine alternatif H2 (également appelé Hpt pour Histidine Phosphotransfert) avant d'atteindre le domaine receveur D2 du régulateur de réponse (Fig.55).

On distingue alors 3 grands types de senseurs suivant le nombre de domaines qu'ils comportent :

i) les senseurs orthodoxes sont l'archétype d'un senseur classique, à deux domaines et peuvent être impliqués dans des phosphorelais classiques (EnvZ d'*E. coli*) ou complexes (KinA et KinB de *B. subtilis*).

ii) Les senseurs non-orthodoxes, en plus des domaines détecteur et transmetteur H1, possèdent un domaine receveur alternatif D1 suivi d'un domaine transmetteur alternatif H2. On peut citer comme exemples BvgS impliqué dans la régulation de la virulence chez *B. pertussis* (Uhl and Miller, 1996), ou TorS impliqué dans la régulation du système respiratoire TMAO dépendant chez *E. coli* (Jourlin *et al.*, 1996).

iii) Les senseurs hybrides enfin sont très similaires aux senseurs non-orthodoxes à ceci près que leur domaine transmetteur alternatif H2 constitue un domaine séparé du senseur. On

trouve ce type de senseur dans le système Lux de *V. harveyi* mais également chez les eucaryotes avec le senseur Sln1 impliqué dans l'osmorégulation chez *Saccharomyces cerevisiae* (Xu and West, 1999).

### 3.2. Répartition et classification des senseurs et régulateurs chez les bactéries :

Les phosphorelais existent chez les procaryotes, les archaébactéries, les eucaryotes unicellulaires et les plantes (Grebe and Stock, 1999). Le nombre de protéines senseur et de régulateurs de réponse dans les génomes varie énormément (Tableau 2). Cependant, chez les bactéries notamment, on peut corrélérer la capacité à vivre dans plusieurs milieux différents au nombre de systèmes phosphorelais présents dans leur génome. Ainsi, des bactéries ubiquitaires comme *B. subtilis* et *E. coli* possèdent un grand nombre de ces systèmes alors qu'ils sont rares chez les bactéries intracellulaires obligatoires comme *Helicobacter pylori* (Tableau 2) (Koretke *et al.*, 2000). Alm *et coll.* expliquent que l'évolution des phosphorelais dans les micro-organismes dépend de la niche écologique et des signaux présents dans cette niche (Alm *et al.*, 2006).

Quelques différences notables existent entre les systèmes eucaryotes et procaryotes. Premièrement, la complexité des génomes correspond à la complexité des phosphorelais, ainsi on trouve de nombreux phosphorelais complexes et de nombreux senseurs hybrides chez les eucaryotes alors que les phosphorelais classiques sont majoritaires chez les procaryotes (Thomason and Kay, 2000). Deuxièmement, la plupart des régulateurs de réponse procaryotes sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes cibles à l'aide de leur domaine effecteur. Chez les eucaryotes, les régulateurs sont souvent impliqués dans des interactions protéines/protéines et ne sont pas toujours les médiateurs directs de la réponse (Wurgler-Murphy and Saito, 1997).

Les analyses phylogénétiques effectuées sur les protéines senseur et régulateur de *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *E. coli* ont permis de les classer par sous familles (Fabret *et al.*, 1999; Mizuno, 1997; Rodrigue *et al.*, 2000). Dans la plupart des cas, les auteurs précisent qu'une sous-famille de protéines senseur est fonctionnellement associée à une sous-famille de régulateurs, suggérant donc une co-évolution des gènes codant les deux partenaires (Fabret *et al.*, 1999; Hoch, 2000; Koretke *et al.*, 2000), et ceci semble confirmé par la récurrence de l'organisation génétique en opéron de ces gènes (Koretke *et al.*, 2000). On trouve cependant des gènes codant des histidine kinases dites « orphelines » séparés génétiquement des gènes codant leurs régulateurs associés. C'est en particulier le cas de plus de la moitié des 146 histidines kinases présentes chez *Myxococcus xanthus* (Mascher *et al.*, 2006b).

La majeure partie des senseurs bactériens fonctionne sous forme homodimérique au niveau de la membrane plasmique. Les séquences des domaines de détection de signal sont peu conservées car les stimuli reconnus sont divers. Le domaine transmetteur en revanche est plus conservé, avec un site catalytique de fixation et d'hydrolyse de l'ATP et un site contenant le résidu histidine accepteur du groupement phosphate. Les deux domaines sont reliés par les segments transmembranaires hydrophobes et une région charnière (Fig.56). Le nombre de segments transmembranaires est de 2 dans la plupart des cas mais peut varier jusqu'à 10 (Fabret *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2006b). Les régions membranaires et charnière sont indispensables pour assurer les changements conformationnels du senseur qui suivent la perception du signal (Jourlin *et al.*, 1996; Ottemann *et al.*, 1999). Dans la majorité des histidines kinases, la partie N-terminale du domaine transmetteur est, d'une part, le site de phosphorylation sur le résidu histidine conservé et, d'autre part, le site de dimérisation du senseur (boîte X, Fig.56). Cette boîte X est constituée de deux hélices  $\alpha$  permettant la dimérisation.

On distingue deux grands modes de détection du signal : les senseurs à détection extracytoplasmique et les senseurs à détection cytoplasmique. Les senseurs à détection cytoplasmiques peuvent être membranaires ou cytoplasmiques. Ils sont généralement facilement identifiables car ils possèdent des domaines de détection de type PAS ou GAF dans la région linker ou N-terminale (Fig.57). De plus, lorsqu'ils sont membranaires, ils possèdent de 2 à 4 fragments transmembranaires et ne présentent pas de boucle extracytoplasmique apparente, contrairement aux senseurs à détection extracytoplasmique. L'architecture de leurs domaines est très diversifiée et ils sont impliqués dans la régulation de fonctions diverses comme le transport d'ions (KpdD d'*E. coli*) ou la respiration (FixL de *Bradhyrhizobium japonicum*) (Mascher *et al.*, 2006b). Les senseurs à détection extracytoplasmique ont des topologies également très diverses (Fig.57) suivant le nombre de fragments transmembranaires présents et l'espacement de ces fragments constituant (ou non) des boucles extracytoplasmiques (comme dans les senseurs de type EnvZ). Certains possèdent des domaines additionnels de détection comme les domaines d'interaction protéine/protéine de type PDZ, ou les domaines de type SBP similaires à ceux trouvés chez les transporteurs ABC.

Nombre de ces senseurs à détection extracytoplasmique, comme ceux de type EnvZ, PhoQ, VanS et BceS, appartiennent à la sous-famille IIIa définie chez *B. subtilis* (Fabret *et al.*, 1999). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux senseurs de type BceS qui sont retrouvés exclusivement chez les Firmicutes. Nous reviendrons amplement sur ces senseurs dans la discussion générale. Les senseurs de la sous-famille IIIa sont majoritairement couplés à des régulateurs de réponse de la sous-famille OmpR. Ces régulateurs de réponses se

distinguent de ceux appartenant à d'autres sous-familles par leur domaine effecteur spécifique comportant un motif de liaison à l'ADN de type WH (pour Winged-Helix). Les membres de la famille OmpR ont une taille moyenne de 230 acides aminés et rassemblent environ 50 % des régulateurs de réponse recensés chez *B. subtilis* (Fabret *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN de OmpR d'*E. coli* a été obtenue par Martinez-Hackert et Stock en 1997 (Fig.58) (Martinez-Hackert and Stock, 1997). On y distingue 3 hélices  $\alpha$  insérées dans une structure en feuillets  $\beta$  antiparallèles. L'hélice  $\alpha_2$ , hélice de positionnement, et l'hélice  $\alpha_3$ , hélice de reconnaissance et d'interaction avec le sillon majeur de l'ADN, constituent un motif de type « Helix-Turn-Helix » (HTH) classique mais avec une différence notable due à la présence d'une «  $\alpha$ -loop » plus longue que les motifs HTH classiques (Fig.58). Cette  $\alpha$ -loop est supposée interagir avec la sous-unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase (Martinez-Hackert and Stock, 1997). Les feuillets  $\beta$  de part et d'autre de la structure sont caractéristiques de la sous-famille OmpR. Ils forment les motifs W1 et W2 qui constituent les ailes de reconnaissance interagissant avec le sillon mineur de l'ADN. Ce motif est ainsi désigné motif « Winged Helix » (WH).

Les promoteurs cibles des régulateurs OmpR sur l'ADN ont dans leur séquence des répétitions directes d'un motif de 6 à 10 paires de bases (Eder *et al.*, 1999; Lynch and Lin, 1996). Si le nombre de répétitions varie d'un promoteur cible à l'autre, ces motifs sont toujours situés sur la même face de l'ADN. Ceci indique que les régulateurs de la famille OmpR agissent sous forme de dimères ou plus généralement d'oligomères. Il a récemment été proposé que le domaine receveur du régulateur PhoB d'*E. coli* (de la famille OmpR) existe sous deux formes de dimères suivant que les domaines sont phosphorylés ou non (Bachhawat *et al.*, 2005). Les auteurs expliquent qu'en absence de phosphorylation, les domaines effecteurs sont en opposition l'un par rapport à l'autre dans ce dimère, ce qui empêche leur interaction avec une même face de l'ADN (Fig.59). Par contre, la phosphorylation du domaine receveur de PhoB engendre la formation d'un dimère qui, cette fois, positionne correctement les domaines effecteurs afin qu'ils interagissent avec la même face de l'ADN (Fig.59) (Bachhawat *et al.*, 2005). Pour d'autres régulateurs OmpR, comme le régulateur CovR de *S. pyogenes*, il n'existe pas de forme dimérique en absence de phosphorylation et c'est cette phosphorylation qui permet la dimérisation (Gusa *et al.*, 2006). Des études précédentes montraient en outre que la fixation à l'ADN de certains régulateurs OmpR précédait l'étape de phosphorylation (Buckler *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2001). Une dernière étude propose finalement que l'oligomérisation de ces régulateurs peut être induite de deux façons : après phosphorylation du domaine receveur ou après fixation à l'ADN (Maris *et al.*, 2005). En outre, dans la plupart des cas, la surexpression simple d'un régulateur de réponse de

type OmpR mime l'activation du phosphorelais correspondant sans en connaître le stimulus (Joseph *et al.*, 2002; Olekhovich *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 1994).

### 3.3. Phosphorelais et antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne

Les phosphorelais sont des éléments majeurs de régulation de mécanismes de virulence et de résistances aux antibiotiques chez les bactéries (Stephenson and Hoch, 2002). Nous allons détailler quelques exemples qui montrent l'implication de phosphorelais dans des régulations de mécanismes de résistances aux antibiotiques, en particulier aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Dans la plupart des cas, le stimulus précis d'activation du phosphorelais reste inconnu.

- Exemples de résistances spécifiques

- Régulation de la résistance aux glycopeptides chez *E. faecalis*

Les mécanismes de résistance aux glycopeptides les plus répandus chez les espèces du genre *Enterococci* sont codés par les clusters de gènes *vanA* ou *vanB*. Dans les deux cas, il a clairement été montré qu'un système phosphorelais, codé par les gènes *vanRS* et *vanR<sub>B</sub>S<sub>B</sub>*, régulait respectivement l'expression des clusters *vanA* et *vanB* en réponse à la vancomycine ou à d'autres glycopeptides (Fig.60) (Arthur and Quintiliani, 2001). Ce système de régulation fait l'objet d'une autorégulation positive de ces propres gènes de structure *vanRS* (Fig.60). D'autre part, les gènes *van* sont exclusivement exprimés en présence de l'antibiotique et il semble que le senseur VanS soit indispensable à la régulation négative du système en absence de stimulus (Fig.60) (Arthur and Quintiliani, 2001). Il a été montré que le senseur homologue VanS de *S. coelicolor* peut « switcher » entre une activité kinase ou phosphatase suivant que la vancomycine est présente ou absente (Hutchings *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent également que le ligand du senseur est l'antibiotique lui-même, cependant, l'interaction potentielle de la vancomycine avec le senseur VanS n'a jusqu'à présent pas été observée (Hutchings *et al.*, 2006).

- Régulation de résistances aux  $\beta$ -lactames

Le phosphorelais CroRS d'*E. faecalis*, comportant un régulateur de réponse de la famille OmpR, a été identifié comme indispensable à la résistance aux  $\beta$ -lactames. Ce

système semble cependant être activé par de multiples antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne (Comenge *et al.*, 2003). Les auteurs, cependant, n'ont pas identifiés les mécanismes de résistances contrôlés par ce phosphorelais ainsi que le mécanisme d'activation précis du système.

- Exemples de phosphorelais couplant résistances aux antibiotiques et virulence :

- Le système PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*

Ce phosphorelais permet la régulation d'un grand nombre de gènes différents, à la fois impliqués dans la virulence de *S. enterica* et dans des résistances aux antibiotiques. PhoQ est un senseur membranaire retrouvé chez de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif, comme *P. aeruginosa* (Kwon and Lu, 2006), et est associé au régulateur PhoP (de la famille des régulateurs OmpR) dans une cascade de signalisation. Ce système est essentiel à la virulence de *S. enterica* chez la souris et l'homme et à la virulence de nombreuses autres bactéries à Gram négatif (Bader *et al.*, 2005). Il a été montré que ce phosphorelais co-régule les gènes de virulence avec des gènes de résistances aux peptides antimicrobiens cationiques, comme la polymyxine et la magainine (Navarre *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2004). Les auteurs montrent que les gènes cibles de PhoP ont un rôle dans les modifications du lipopolysaccharides qui confèrent des résistances aux antibiotiques. Des souches délétées du gène *phoP* sont hypersensibles à la magainine 2 (Groisman *et al.*, 1992), à la cécropine A (Groisman *et al.*, 1992), aux défensines (Miller *et al.*, 1990) et à la polymyxine B (Wosten *et al.*, 2000).

Le système est clairement induit par les antibiotiques cationiques et Bader *et coll.* propose un modèle d'activation du senseur par ces peptides antimicrobiens en s'appuyant sur le fait qu'une carence en ions dicationiques ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) peut activer le phosphorelais (Fig.61) (Bader *et al.*, 2005; Garcia Vescovi *et al.*, 1996). Les cations divalents interagissent avec la surface acide du domaine détecteur de PhoQ (Fig.61 en rouge) et forment un pont avec les phospholipides membranaires ce qui maintient PhoQ dans une conformation inactive (1). Les peptides cationiques antimicrobiens interagissent avec les phospholipides membranaires et sont donc proches de l'interface d'interaction des cations divalents avec PhoQ. Ils viennent donc altérer cette interaction en se substituant aux cations divalents (2). Ceci provoque un changement conformationnel de PhoQ engendrant l'activation du senseur par autophosphorylation (3).

- Le système CesRK de *L. monocytogenes*

Ce phosphorelais, identifié chez *L. monocytogenes*, semble similaire au système VanRS d' *E. faecalis* mais son spectre d'action est plus grand. En effet, ce système est activé par plusieurs types d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames et est indispensable à la résistance de *L. monocytogenes* à ces antibiotiques. Cependant, ce système est un autre exemple de couplage entre résistances aux antibiotiques et virulence car il contrôle l'expression de facteurs de virulence indispensables à la pathogénicité de *L. monocytogenes* chez la souris (Kallipolitis *et al.*, 2003).

#### - Exemples de phosphorelais répondant aux stress de l'enveloppe bactérienne

Les phosphorelais que nous venons de présenter sont activés lors de la réponse cellulaire aux stress de l'enveloppe car ils sont clairement induits par des antibiotiques ciblant cette dernière. Tout comme les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique, les phosphorelais font partie intégrantes de ces « Cell wall stress » stimulons. On peut ainsi citer le système VraSR de *S. aureus* qui répond à de nombreux antibiotiques différents comme la vancomycine et les  $\beta$ -lactames (Gardete *et al.*, 2006) et qui notamment régule l'expression de gènes codant des protéines de type PBPs et les transporteurs ABC VraDE et VraFG (Yin *et al.*, 2006). De manière intéressante, les auteurs ont montré qu'en fonction du niveau de transcription du gène essentiel de synthèse de la paroi de *S. aureus*, *pbp*, le phosphorelais VraSR est activé en absence d'antibiotique, suggérant que cette voie de signalisation est sensible à l'état physiologique de la paroi de peptidoglycane (Gardete *et al.*, 2006).

Chez *S. pneumoniae*, le phosphorelais CiaRH semble être indispensable au maintien de l'intégrité de l'enveloppe dans un grand nombre de conditions différentes comme la présence d'antibiotiques type cyclosérine, bacitracine et vancomycine, la présence de mutations dans les gènes *pbp*, la présence d'inhibiteurs de synthèse des acides téichoïques ou encore la présence de détergent non-ionique comme le Triton X-100 (Mascher *et al.*, 2006a). Les auteurs précisent que toutes ces conditions entraînent une lyse rapide des cellules chez un mutant du système CiaRH (Mascher *et al.*, 2006a).

Les phosphorelais impliqués dans des réponses aux stress de l'enveloppe sont parfois reliés aux réseaux de régulation contrôlés par les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique, donnant ainsi tout son sens au terme de réseau complexe de régulation. C'est le cas par exemple chez *S. coelicolor*, qui possède environ 50 ECFs différents, où une étude montre que lors d'un stress de l'enveloppe, le phosphorelais CseBC peut activer



l'expression de ces propres gènes de structures et du facteur  $\sigma^E$ . Cet ECF active à son tour l'expression de l'opéron *cwg* (Cell Wall Glycan) afin d'assurer l'intégrité de l'enveloppe (Fig.62) (Hong *et al.*, 2002).

#### - Phosphorelais, Quorum-sensing et Lantibiotiques

Nous avons vus précédemment que les clusters de gènes de biosynthèse de lantibiotiques, tels que la nisine, la subtiline ou l'épidermine, contiennent tous les mêmes éléments : un gène codant le précurseur du lantibiotique, des gènes codant les enzymes de modifications et de maturation du lantibiotique, des gènes d'immunité et enfin des gènes de sécrétion (transporteur ABC de la sous-famille 6). Tous ces clusters contiennent également des gènes codant des systèmes phosphorelais qui modulent l'expression de l'ensemble des gènes du cluster (Kleerebezem *et al.*, 1997; Kleerebezem, 2004). Les protéines NisRK et SpaRK constituent ainsi les phosphorelais qui contrôlent respectivement les gènes de synthèse et d'immunité de la nisine et de la subtiline chez *L. lactis* et *B. subtilis*. Le cluster de synthèse de l'épidermine de *S. epidermidis* ne contient par contre que le gène *epiQ* codant un régulateur de réponse très similaire à NisR et SpaR, tous membres de la sous-famille OmpR.

Le mécanisme de régulation par NisRK (ou SpaRK) est un mécanisme de Quorum-sensing qui dépend de la densité cellulaire et de la phase de croissance. Le Quorum-sensing est un mécanisme de communication cellule-cellule utilisé par les bactéries pour coordonner leur comportement. Ces systèmes couplent la sécrétion constitutive de molécule signal dans le milieu (souvent par des transporteurs de type ABC) avec des systèmes de détection de cette molécule (comme les phosphorelais). Ainsi, la concentration de la molécule signal sécrétée reflète directement la densité cellulaire de la population bactérienne. Lorsque cette concentration dépasse un certain seuil, les systèmes de détection activent une réponse coordonnée de toutes les bactéries (Lazazzera and Grossman, 1998). Ces systèmes permettent notamment la régulation coordonnée de facteurs de virulence chez *S. aureus* (Novick and Muir, 1999), le contrôle de l'entrée en compétence ou sporulation chez *B. subtilis* (Lazazzera *et al.*, 1999) ou encore la sécrétion de bactériocines chez les bactéries lactiques (Kleerebezem, 2004). Dans le cas de synthèse de lantibiotiques, la molécule signal est fréquemment le lantibiotique lui-même.

La production de nisine débute en effet en milieu de phase exponentielle et atteint son niveau maximal en début de phase stationnaire de croissance (de Ruyter *et al.*, 1996; Kleerebezem, 2004). Il a clairement été observé que la présence de nisine dans le milieu extérieur engendre l'activation du phosphorelais NisRK, provoquant une autorégulation

positive du cluster des gènes de synthèses, de sécrétion et d'immunité de la nisine (Kleerebezem *et al.*, 1997). D'autre part, le promoteur contrôlant l'expression des gènes *nisR* et *nisK* est constitutif et ne semble pas autorégulé par le phosphorelais NisRK, contrairement aux autres promoteurs du cluster nisine (Fig.63) (de Ruyter *et al.*, 1996).

Il est à noter que de tels mécanismes de Quorum-sensing sont retrouvés pour le contrôle de nombreux clusters de synthèses de bactériocines (modifiées ou non modifiées) (Kleerebezem *et al.*, 1997). Parfois, un degré de complexité est ajouté par l'intervention d'autres protéines régulatrices en plus du phosphorelais. Il a été montré récemment que le cluster de biosynthèse de la mersacidine (antibiotique de type B) chez *Bacillus sp.* contient non seulement des gènes codant un phosphorelais à deux composants, *mrsR<sub>2</sub>K<sub>2</sub>*, mais également le gène d'un régulateur de réponse, *mrsR<sub>1</sub>* (Guder *et al.*, 2002). Les auteurs observent que l'expression des gènes de biosynthèse (précurseur, modification et maturation) dépend du régulateur MrsR<sub>1</sub> alors que l'expression des gènes d'immunité (le transporteur ABC MrsFEG) fait intervenir le Quorum-sensing via le phosphorelais MrsR<sub>2</sub>K<sub>2</sub> (Guder *et al.*, 2002). En outre, la production de mersacidine semble également autoinductible par le antibiotique lui-même (Schmitz *et al.*, 2006).

En conclusion, les micro-organismes possèdent plusieurs mécanismes de régulation leur permettant de détecter la présence d'antibiotiques ayant pour cible l'enveloppe bactérienne puis de moduler l'expression de leurs gènes pour adapter leur comportement face à ces antibiotiques (métabolisme, constitution de l'enveloppe, mécanisme de résistance). La complexité des réseaux de régulation observés à la suite d'un stress de l'enveloppe bactérienne rend difficile l'identification de chacun des stimuli activant les différents systèmes de régulation et la caractérisation des gènes de résistances spécifiques à un antibiotique. Nous nous sommes intéressés ainsi à caractériser les mécanismes de résistance à la bacitracine chez la bactérie modèle des Firmicutes, *B. subtilis*.

## IV- La Bacitracine

Cet antibiotique est surtout utilisé dans les traitements d'infections oculaires et chez les patients atteints de brûlure (Kanof, 1970; Rossiter *et al.*, 2001). Il s'avère par contre inefficace dans la plupart des traitements contre les infections graves comme celles causées par les pathogènes nosocomiaux de type Enterocoques (Mondy *et al.*, 2001; Rossiter *et al.*, 2001). La fréquence élevée de souches pathogènes résistantes à la bacitracine a encore été reportée récemment chez les Enterocoques (McGowan *et al.*, 2006) ; *Listeria spp.* (Li *et al.*, 2007) ; et *C. difficile* (Bourgault *et al.*, 2006). Enfin, la bacitracine a été fréquemment employée pour augmenter le poids des volailles d'élevages en l'utilisant comme additif alimentaire. En 1999, cet emploi de la bacitracine a été interdit en Europe pour cause de problème de santé publique (Rossiter *et al.*, 2001).

### A. Mode d'action

La bacitracine est un antibiotique peptidique synthétisé de façon non-ribosomale et inhibant une étape tardive de la voie de biosynthèse du peptidoglycane : la régénération de l'undécaprénylphosphate (UP), le translocateur lipidique membranaire des précurseurs de peptidoglycane (voir partie II). Cet antibiotique a été montré comme complexant la molécule lipidique undécaprénylpyrophosphate (UPP) non reliée au précurseur monomérique NAM-NAG-pentapeptide. Ce complexe affecte drastiquement l'accessibilité de l'UPP aux phosphatases qui le déphosphorylent. Ainsi, la régénération de l'UP, étape terminant le cycle de biosynthèse de peptidoglycane, est bloquée. Le pool cellulaire d'UP, diminuant, ne permet alors plus un rendement de translocation suffisant de nouveaux précurseurs monomériques de peptidoglycane, et la voie de biosynthèse est rapidement bloquée (Siewert, 1967). Cette action spécifique de la bacitracine se traduit par un effet bactériostatique à faibles concentrations et bactériolytique à fortes concentrations. L'interaction de la bacitracine avec l'UPP dépend de la présence de cations divalents, comme  $Mg^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ , et la constante de dissociation du complexe est relativement faible, autour de  $10^{-6} M^{-1}$  (Stone and Strominger, 1971). Le site d'interaction de la bacitracine est le groupement pyrophosphate de l'UPP. Le cation divalent établit un pont entre les deux charges négatives du groupement pyrophosphate et la bacitracine. D'autres molécules de la famille des polyisoprénylpyrophosphates ont été montrées comme complexant également la bacitracine. Les constantes de dissociations de ces complexes diffèrent alors suivant la longueur de la chaîne carbonée du

polyisoprénylpyrophosphate. Ainsi, si elle est du même ordre avec le farnésylpyrophosphate (chaîne de 15 carbones), elle est 1000 fois plus élevée avec l'isopenténylpyrophosphate (chaîne de 5 carbones) et le pyrophosphate inorganique (pas de chaîne carbonée) (Storm and Strominger, 1973). Ainsi, la bacitracine forme un complexe stable avec les polyisoprénylpyrophosphates dont la chaîne carbonée est constituée d'au moins 3 sous unités isoprènes. D'autre part, l'affinité de la bacitracine pour sa cible, l'UPP, varie drastiquement en fonction du pH et elle est maximale à pH 7.5, pH optimal pour la croissance de la majorité des bactéries. Ceci suggère qu'un état d'ionisation de l'antibiotique est nécessaire pour une stabilité maximale du complexe. Ces observations mettent en évidence que le complexe UPP/Bacitracine implique des interactions à la fois polaires et hydrophobes (Storm and Strominger, 1973).

La complexation de la bacitracine à d'autres polyisoprénylpyrophosphates suggère qu'elle puisse interférer avec d'autres voies métaboliques impliquant ces molécules en plus de la biosynthèse de peptidoglycane. Il a en effet été montré, d'une part, que la bacitracine inhibe la synthèse des squalènes et des stérols des cellules eucaryotes de foie de rat (Hancock and Fitz-James, 1964) et, d'autre part, la synthèse des ubiquinones des cellules eucaryotes de mammifères et des cellules bactériennes (Schechter *et al.*, 1972). Ces propriétés font que la bacitracine présente une toxicité importante sur les cellules humaines et est assez peu utilisée aujourd'hui dans les traitements médicaux. En outre, Il a également été observé que la bacitracine est néphrotoxique (Drapeau *et al.*, 1992).

## B. Biosynthèse de la bacitracine et résidus essentiels à son activité

Cet antibiotique à branche cyclique est un dodécapeptide synthétisé de façon non-ribosomale par *Bacillus licheniformis* et *B. subtilis* (Azevedo *et al.*, 1993; Haavik and Froyshov, 1975; Johnson *et al.*, 1945). Cependant, la souche de *B. subtilis* utilisée en laboratoire ne la produit pas. Le cluster de gènes de biosynthèse et d'immunité à la bacitracine s'étend sur environ 50 kb chez *B. licheniformis* en 3 opérons distincts (Fig.64) (Eppelmann *et al.*, 2001; Neumuller *et al.*, 2001). La première unité de transcription code pour le complexe multi-enzymatique de synthèse non-ribosomal avec une thioestérase, codée par *bacT*, et trois peptide synthases comprenant respectivement 5, 2 et 5 modules qui permettent l'assemblage des 12 aminoacides de la bacitracine (Fig.64). La première peptide synthase, codée par *bacA*, contient également un domaine de condensation intervenant dans la formation de l'anneau thiazoline à partir des deux premiers résidus isoleucine et cystéine (Fig.64). La troisième

peptide synthase, codée par *bacC*, contient un domaine de modification permettant la cyclisation de la molécule entre le résidu asparaginyll en position 12 et le résidu lysinyll en position 6 (Fig.64). Deux autres unités de transcription appartiennent au cluster de synthèse de la bacitracine et codent, l'un, pour des gènes d'immunité (*bcrABC*) et l'autre, pour un phosphorelais de la famille EnvZ/OmpR (*bacRS*) qui réprime l'expression des gènes d'immunité en absence de l'antibiotique (Fig.64) (Neumuller *et al.*, 2001).

La bacitracine A est la molécule ayant l'activité antibiotique la plus forte, cependant, la bacitracine est produite sous une multitude de formes plus ou moins actives. On distingue par exemple les bacitracines B1, B2 et B3 qui ont globalement la même séquence que la bacitracine A mais où les résidus isoleucinyll (en position 1, 5 et 8) sont substitués par des résidus valinyll (Ming and Epperson, 2002). Les mêmes types de substitutions sont retrouvés mais avec des combinaisons différentes pour la bacitracine D et E. L'oxydation de la bacitracine A conduit à une forme inactive de l'antibiotique, la bacitracine F, dans laquelle l'anneau thiazoline aminé, essentiel à l'activité, est oxidé en anneau kéto-thiazole inactif (Fig.65)(Govaerts *et al.*, 2003).

La structure en 3 dimensions de la bacitracine A, obtenue par Epperson et Ming en 2000, a révélé que le repliement de la partie N-terminale de la molécule (isoleucine 1 à glutamate 4) permet de placer le résidu His<sup>10</sup> à proximité du résidu Glu<sup>4</sup>, formant ainsi un site d'interaction avec le cation divalent (Fig.64) (Epperson and Ming, 2000). D'autres études ont proposé que la fixation du cation divalent implique également l'anneau thiazoline (Mosberg *et al.*, 1980; Scogin *et al.*, 1983). La bacitracine F est inactive et modifiée au niveau de cet anneau thiazoline. L'activité de la bacitracine dépendant entièrement de sa capacité à interagir avec un cation divalent, on peut supposer que l'anneau thiazoline est effectivement indispensable à cette interaction et ceci a été confirmé par RMN (Epperson and Ming, 2000; Ming and Epperson, 2002). Ces études expliquent également, que la conformation moléculaire de la bacitracine interagissant avec un cation rapproche les résidus Ile<sup>5</sup> et Phe<sup>9</sup>, formant ainsi une surface hydrophobe certainement impliquée dans l'interaction de la bacitracine avec la chaîne hydrophobe de l'undécaprénylpyrophosphate (Epperson and Ming, 2000). Les auteurs précisent que cette surface hydrophobe n'est visible que dans le cas où la bacitracine a fixé le cation, ce qui suppose un réarrangement conformationnel de la molécule suite à cette interaction.

## C. Mécanismes connus de résistance à la bacitracine

L'étude des mécanismes de résistances à la bacitracine reste peu documentée et si dans la plupart des cas les gènes codant ces mécanismes ont été identifiés, leurs fonctions précises restent inconnus.

### 1. Transporteur ABC et export potentiel de bacitracine : mécanisme d'immunité de *B. licheniformis* ?

Les gènes *bacRS* et *bcrABC* de *B. licheniformis* participent au mécanisme d'immunité à la bacitracine chez cette bactérie productrice. Si le gène *bcrA* code pour une protéine très similaire au domaine NBD de transporteur ABC de la sous-famille 6 (Podlesek *et al.*, 1995), il est moins évident que les protéines BcrB et BcrC<sub>BI</sub>, prédites comme étant membranaires, forment la perméase membranaire partenaire de ce transporteur ABC putatif. De plus, aucune démonstration d'un efflux de bacitracine n'a été faite à ce jour. En outre, si les trois gènes semblent être nécessaires à la résistance de *B. licheniformis*, la surproduction de la protéine BcrC<sub>BI</sub> seule chez *B. subtilis* permet d'augmenter son niveau de résistance à la bacitracine, suggérant un mécanisme indépendant de cette protéine par rapport aux deux autres protéines BcrA et BcrB (Podlesek *et al.*, 2000). Une étude similaire montre que la surproduction de l'homologue de BcrC<sub>BI</sub> chez *E. coli*, BcrC<sub>Ec</sub>, confère une résistance à la bacitracine et les auteurs précisent qu'il n'existe pas d'homologue de BcrA et BcrB chez *E. coli* (Harel *et al.*, 1999). Enfin, il existe également chez *B. subtilis* un homologue de *bcrC*, nommé *bcrC<sub>BS</sub>*, codé de façon isolé dans le génome de *B. subtilis* et pour lequel aucun partenaire de type NBD n'a pu être mis en évidence (Ohki *et al.*, 2003b). La fonction de BcrABC reste donc très imprécise et nous verrons dans la partie résultat que nous avons pu caractériser la fonction d'une des protéines de type BcrC.

Les mécanismes de régulation de l'opéron *bcrABC* ont par contre été mieux caractérisés. Le système phosphorelais BacRS réprime l'expression des gènes *bcrABC* en absence de bacitracine. En présence de cet antibiotique dans le milieu, le phosphorelais lève cette répression afin de permettre l'expression des gènes de résistances (Neumuller *et al.*, 2001). Ce système permet de coordonner la production de bacitracine avec la production des protéines d'immunité, similairement aux mécanismes de type Quorum-sensing retrouvés lors de production de bactériocines (voir partie III).

## 2. Activités antagonistes

D'autres mécanismes de résistances à la bacitracine ont été caractérisés chez des micro-organismes non producteurs de bacitracine. Ces mécanismes contournent la présence de bacitracine par une activité antagoniste ciblant l'undécaprénol ou l'undécaprényl pyrophosphate.

Premièrement, des enzymes à activité undécaprénol kinase ont été identifiés chez *Mycobacterium smegmatis* (Rose *et al.*, 2004), *S. mutans* (Lis and Kuramitsu, 2003), *S. aureus* et *S. pneumoniae* (Chalker *et al.*, 2000). Ces enzymes permettent la formation d'undécaprénylphosphate (UP) à partir d'undécaprénol (U), et peuvent ainsi augmenter le pool cellulaire d'UP nécessaire à la synthèse de peptidoglycane en présence de bacitracine. Cependant, il est à noter que toutes ces protéines sont très similaires à la protéine BacA d'*E. coli* pour laquelle subsiste une interrogation quant à sa fonction précise. Les premières études effectuées sur la protéine BacA ont montré que cette protéine avait une activité undécaprénol kinase (Cain *et al.*, 1993). Cependant, cet enzyme semble avoir une autre activité non pas kinase mais phosphatase sur la cible de la bacitracine, l'UPP, ce qui permet la régénération d'UP (El Ghachi *et al.*, 2004; El Ghachi *et al.*, 2005). Trois autres protéines ont été caractérisées, simultanément à notre étude, comme étant des UPP phosphatases chez *E. coli* (voir partie II) et de manière très intéressante, l'une d'entre elle, nommée YbjG, est similaire à la protéine BcrC<sub>BI</sub> participant à l'immunité de *B. licheniformis* (El Ghachi *et al.*, 2005) (voir partie II).

## 3. Mécanisme spécifique trouvé chez les bactéries à Gram négatif

Un dernier mécanisme de résistance à la bacitracine a été identifié chez les bactéries à Gram négatif comme *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas S-88* et *NW-11* et *E. coli K-12*, qui sécrètent respectivement des polymères de xanthanes, de sphinganes ou d'acides colaniques. La synthèse de ces exopolysaccharides nécessite l'intervention du translocateur lipidique UPP, comme pour la biosynthèse de peptidoglycane et des acides téichoïques. Il a été montré que ces bactéries à Gram négatif peuvent stopper la synthèse d'exopolysaccharides afin d'économiser l'UPP pour résister à la bacitracine (Pollock *et al.*, 1994).

# Résultats



## Problématique de l'article 1

### 1. Couplage fonctionnel et génétique entre phosphorelais et transporteurs ABC

Des études effectuées au laboratoire avaient permis d'identifier dans le génome de *B. subtilis*, quatre *loci* comportant chacun deux opérons contigus codant, l'un, pour un système phosphorelais à deux composants de type EnvZ/OmpR, et l'autre, pour des transporteurs de type ABC de la sous-famille 9 (Fig.66) (Joseph *et al.*, 2002). Dans chaque cas, autant le signal détecté par le senseur que le substrat pris en charge par le transporteur ABC étaient inconnus. Pour trois de ces systèmes phosphorelais/transporteur ABC couplés - BceRSAB (anciennement YtsABCD), YvcPQRS et YxdJKLM - un couplage fonctionnel entre les deux entités avait été démontré, chaque régulateur de réponse (BceR, YvcP ou YxdJ) contrôlant positivement l'expression de l'opéron codant le transporteur ABC correspondant (BceAB, YvcRS ou YxdLM). De plus, il avait été montré que ce contrôle était direct, le régulateur de réponse interagissant avec la séquence promotrice en amont des gènes du transporteur ABC (Giyanto *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2004; Ohki *et al.*, 2003a).

Un tel couplage fonctionnel entre phosphorelais et transporteur ABC de la sous-famille 9 est exclusivement trouvé chez les bactéries du groupe des Firmicutes (voir résultats complémentaires article 3). Compte tenu de la forte implication des phosphorelais et des transporteurs ABC dans la résistance aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne, nous avons postulé que les systèmes BceAB, YvcRS et YxdLM étaient des unités de détoxification protégeant la cellule de ce type d'antibiotiques et que chaque phosphorelais permettait la mise en place du transporteur ABC couplé après détection de l'antibiotique cible. En faveur de cette hypothèse, Pascale Joseph avait en effet observé que le niveau de transcrits de chacun des gènes de ces systèmes était relativement bas et qu'aucune variation de ce niveau n'était détectée tout au long de la croissance de *B. subtilis* (Joseph, 2002).

### 2. Description des constituants de ces systèmes phosphorelais/ABC

Chacun des systèmes à deux composants présente les caractéristiques d'un phosphorelais classique avec un senseur de type orthodoxe à deux fragments transmembranaires et une cascade de phosphorylation à deux étapes tandis que les transporteurs ABC sont des homo-dimères {MSD-NBD}<sub>2</sub>. Comme aucun gène codant pour une protéine auxiliaire (Solute Binding Protein de transporteur ABC de type importeur, ou MFP associée à certains exporteurs) n'a été identifié dans le voisinage de ces *loci*, ces trois transporteurs sont prédits pour exercer des fonctions d'export. Chaque domaine MSD (BceB,

YvcS et YxdM) possède 10 fragments transmembranaires et présente une typicité particulière puisque une boucle extracytoplasmique de plus de 200 résidus d'acides aminés sépare les fragments transmembranaires 7 et 8 (Fig.67). Cependant, si la topologie est identique, les séquences primaires de ces domaines MSD et, en particulier, celles des boucles extracytoplasmiques, ne sont que très peu conservées.

### 3. But de l'étude : identification de la résistance due à chaque transporteur ABC et régulation des gènes de structure correspondants.

Grâce au consortium nippon européen, nous disposons au laboratoire de mutants de *B. subtilis* correspondant à l'interruption de chacun des gènes des trois systèmes par insertion du vecteur d'interruption pMUTIN. Nous savions aussi qu'aucun de ces mutants ne présente de défaut de croissance (Joseph, 2002).

Notre premier objectif était de savoir si ces systèmes phosphorelais/transporteurs ABC confèrent une résistance à certains antibiotiques. Nous avons donc mesuré les niveaux de résistances de ces souches pour une vingtaine d'antibiotiques différents dont la moitié ciblent l'enveloppe bactérienne. Nous avons ainsi pu montrer que le système YtsCD (alias BceAB) confère une forte résistance à la bacitracine (Article 1).

Ceci nous a conduit à nous intéresser à la protéine YwoA (alias BcrC). En effet, cette protéine est orthologue de BcrC de *B. licheniformis* qui justement avait été identifiée comme participant à l'immunité à la bacitracine chez cette bactérie productrice (Podlesek *et al.*, 1995). Nous avons alors voulu savoir si, chez *B. subtilis*, BcrC participait aussi à la résistance à la bacitracine et, en cas de réponse positive, quelle était la participation respective de chaque système, BceAB et BcrC, dans la résistance de *B. subtilis* à cet antibiotique. Enfin, nous avons voulu savoir si le niveau d'expression des gènes de chaque système de résistance dépendait de la présence de la bacitracine pour, dans l'affirmative, déterminer si le phosphorelais BceRS jouait un rôle dans le contrôle de cette expression.

## Conclusion de l'article 1

Le but de cette étude était de tester si les transporteurs ABC Yvc, Yxd et Yts étaient susceptibles de conférer à la bactérie une résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Les souches ayant perdu le système YtsCD présentant une hypersensibilité à la bacitracine, le locus *yts* a été renommé *bce*. Quelque soit le gène interrompu, à savoir *bceR*, *bceS*, *bceA* ou *bceB*, le niveau de sensibilité est équivalent et très inférieur à celui d'une souche sauvage de *B. subtilis*, démontrant ainsi que chacun des 4 constituants du système est impliqué. Deux des gènes codant pour un phosphorelais, il était particulièrement important d'analyser leur rôle dans la réponse à la bacitracine. On savait déjà que la surproduction de BceR, mimant l'activation de ce régulateur de réponse, entraînait une augmentation de transcrits du gène *bceA*. Nos analyses de QT-PCR ont clairement montré que le niveau de transcrits de ce gène augmente dramatiquement en présence de bacitracine et que ce contrôle positif de transcription implique directement le senseur BceS et donc le phosphorelais BceRS.

Ayant démontré l'implication du système Bce dans la résistance à la bacitracine, nous nous sommes alors intéressés à BcrC, une autre protéine susceptible de contribuer également à cette résistance chez *B. subtilis*. Nos résultats indiquent que cette protéine participe effectivement à la résistance à la bacitracine mais de façon indépendante du système Bce. D'autre part, si l'expression du gène *bcrC* augmente également en présence de bacitracine, cette modulation d'expression ne fait pas intervenir le phosphorelais BceRS. Enfin, les deux systèmes ont des contributions additives à la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*.

L'ensemble de ces résultats recoupe les observations de deux autres études concomitantes à la notre. En effet, Ohki *et coll.* ont également identifié le système BceRSAB comme un déterminant majeur de résistance à la bacitracine chez *B. subtilis* (Ohki *et al.*, 2003a). Mascher *et coll.*, quant à eux, arrivent aux mêmes conclusions en étudiant la réponse de *B. subtilis* à la vancomycine et la bacitracine par une analyse de transcriptome. Leurs résultats sont résumés dans la figure 68 (Mascher *et al.*, 2003). Nous pouvons constater que cette approche globale met en évidence une participation de tous les mécanismes de régulations que nous avons présenté dans l'introduction. En effet, la réponse de *B. subtilis* aux stress de la paroi impliquent des mécanismes de régulation faisant intervenir des facteurs sigma extra cytoplasmiques et des phosphorelais. Les gènes *bcrC* et *bceRSAB* codant pour les deux systèmes de résistance que nous avons identifiés, font effectivement partie du régulon bacitracine et les auteurs ont montré que le gène *bcrC* est régulé par trois facteurs sigma dont un,  $\sigma^M$ , est activé en présence de l'un ou l'autre des deux antibiotiques.

Chez *B. subtilis*, il existe donc bien au moins deux systèmes additifs de résistance spécifiques à la bacitracine. Ces systèmes sont indépendants et la régulation de l'expression

de leurs gènes de structure est également indépendante faisant intervenir soit un phosphorelais soit un facteur sigma alternatif.

L'analyse du régulon bacitracine par Mascher *et coll.* avait montré que la transcription des gènes *yvcRS* codant pour le transporteur ABC YvcRS, est augmentée d'un facteur 12 en présence de bacitracine tandis que celle des gènes *bceAB* l'est de près de 300 fois. Ce résultat recoupait celui de Joseph *et coll.* qui, en surproduisant le régulateur de réponse BceR, avaient déjà mis en évidence une faible augmentation (x10) du niveau de transcription des gènes *yvcRS* codant pour le transporteur ABC YvcRS (Joseph *et al.*, 2002). Nos résultats ayant montré clairement que le système YvcPQRS n'est pas impliqué dans la résistance à cet antibiotique, nous proposons que cette induction soit due à une faible stimulation croisée.

Récemment, il a été montré que, même s'il ne confère pas une résistance à cet antibiotique, le système YvcPQRS répond à l'enduracidine, un antibiotique peptidique de la famille des ramoplanines ciblant aussi l'enveloppe bactérienne (Giyanto *et al.*, 2003) (voir introduction partie II). De la même manière, les gènes *yxdJKLM*, apparaissent clairement comme faisant partie des gènes les plus induits par le peptide antimicrobien cationique humain LL-37 (Pietiainen *et al.*, 2005) (table 1). Là encore, cependant, les auteurs notent que des souches mutées au niveau de ce système Yxd ne présentent pas de phénotype d'hypersensibilité à cet antibiotique cationique.

Nos premiers résultats, associées à ces observations, confortent l'hypothèse selon laquelle ces systèmes phosphorelais/transporteurs ABC seraient impliqués dans des résistances aux antibiotiques peptidiques ciblant l'enveloppe bactérienne.

La protéine BcrC, quant à elle, est une chaîne peptidique de 193 acides aminés prédite comme membranaire car possédant 4 fragments transmembranaires similairement à ses orthologues BcrC<sub>Bl</sub> de *B. licheniformis* et BcrC<sub>Ec</sub> (anciennement YbjG) d'*E. coli*. Toutes ces protéines participent à la résistance à la bacitracine (Bernard *et al.*, 2003; Harel *et al.*, 1999; Podlesek *et al.*, 2000) et, par homologie à *B. licheniformis*, ont été prédites comme étant des domaines MSD de transporteurs ABC potentiels exportant la bacitracine (Podlesek *et al.*, 2000). Cependant, toutes ces protéines semblent également appartenir à la famille des protéines phosphatases de type PAP<sub>2</sub> qui regroupe plus de 1600 protéines à fonctions très diverses (voir introduction partie II). Ces protéines présentent un motif conservé dans leur séquence primaire identifié par Stukey et Carman (Stukey and Carman, 1997) (voir introduction partie II) et correspondant à la séquence **KX<sub>6</sub>RP-(X<sub>12-54</sub>)-PSGH-(X<sub>31-54</sub>)-SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D**. On trouve en effet chez les 3 protéines BcrC, BcrC<sub>Ec</sub> et BcrC<sub>Bl</sub> un motif conservé très similaire à celui identifié pour les protéines de la famille PAP<sub>2</sub> et correspondant à la séquence consensus **RP-(X<sub>18-19</sub>)-PSDH-(X<sub>31-32</sub>)-SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D** (Fig.69).

## Problématique de l'article 2

A la fin de l'article 1, nous avons mentionné d'une part, que la séquence protéique de la protéine BcrC présente une signature caractéristique de la famille des PA-phosphatases et, d'autre part, que nous retrouvions cette signature chez ses orthologues BcrC<sub>BI</sub> de *B. licheniformis* et BcrC<sub>Ec</sub> (anciennement YbjG) d'*E. coli*. Comme précisé dans l'introduction, la protéine BcrC<sub>BI</sub> est supposée comme associée aux protéines BcrA et BcrB dans un transporteur ABC conférant une immunité à la bacitracine à *B. licheniformis* (Podlesek *et al.*, 2000). Cependant, la surproduction de BcrC<sub>BI</sub> seule confère une résistance à la bactérie de manière indépendante des protéines BcrA et BcrB (Podlesek *et al.*, 2000). Par ailleurs, si des homologues de BcrC<sub>BI</sub> sont bien présents chez *B. subtilis* et *E. coli*, on y trouve aucun homologue de BcrA et BcrB.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que BcrC participe à la résistance à la bacitracine non pas en tant que partenaire MSD potentiel d'un transporteur ABC exportant la bacitracine comme proposé pour BcrC<sub>BI</sub> (Podlesek *et al.*, 2000) mais en tant que phosphatase susceptible de déphosphoryler l'undécaprénylpyrophosphate (ou UPP), cible de la bacitracine (Fig.70).

Nous avons commencé par tester cette hypothèse en étudiant le comportement de la protéine BcrC<sub>Bs</sub> en présence de réserpine, un inhibiteur bien documenté de l'activité de transport des transporteurs ABC. Nous avons ainsi pu comparer l'effet *in vivo* de cette drogue sur la résistance de souche présentant une délétion du gène *bcrC* ou une interruption des gènes du transporteur ABC (BceAB).

Nos résultats n'allant pas dans le sens de la participation de BcrC<sub>Bs</sub> à un transport actif, nous avons décidé de purifier la protéine et de la caractériser biochimiquement. Ceci nous a permis de caractériser la première protéine à activité UPP phosphatase de la sous-famille PAP<sub>2</sub> chez *B. subtilis* (cf. article 2).

## Résultats complémentaires de l'article 2

L'activité de déphosphorylation de l'UPP est essentielle à la cellule puisqu'elle permet le recyclage de l'UP, ce dernier permettant la translocation au travers de la membrane des blocs de construction du constituant majeur de la paroi bactérienne, le peptidoglycane (voir introduction partie II). Le fait qu'un mutant *bcrC* ne présente aucun défaut de croissance malgré la perte de l'activité UPP phosphatase correspondante, suggère fortement qu'il existe une, ou plusieurs) autre protéine permettant le recyclage de l'UPP chez *B. subtilis*.

### 1. Autres UPP phosphatases potentielles chez *B. subtilis*

El Ghachi *et coll.* ont identifié chez *E. coli* quatre gènes différents codant des protéines membranaires à activité UPP phosphatase et nommées *bacA*, *ybjG*, *pgpB* et *yeiU*. Les quatre protéines correspondantes sont réparties dans deux familles (El Ghachi *et al.*, 2005). YbjG, orthologue de BcrC chez *E. coli*, tout comme PgpB et YeiU appartiennent à la famille des phosphatases de type PAP<sub>2</sub>. Par contre BacA qui est responsable de 75% de l'activité UPP phosphatase totale de la cellule, appartient à une autre famille d'UPP-phosphatase. Les auteurs ont montré que la triple délétion des gènes *bacA*, *ybjG* et *pgpB* est létale (El Ghachi *et al.*, 2005). En utilisant la séquence de la protéine BacA d'*E. coli* pour une recherche de similarité dans les bases de données (programme BLAST) nous avons identifié chez *B. subtilis* une protéine homologue nommée YubB. Bien que l'activité UPP phosphatase de cette protéine ne soit qu'hypothétique, nous avons testé son éventuelle implication dans la résistance de *B. subtilis* à la bacitracine. Nous disposions pour cela de la souche *yubB*::pMutin provenant du consortium nippo européen d'analyse fonctionnelle de *B. subtilis*. Tout comme le mutant *bcrC*, cette souche ne présente aucun défaut de croissance. Nous avons voulu comparer le niveau de résistance à la bacitracine de ce mutant *yubB* à celui de la souche sauvage ou d'un double mutant délété des gènes *bcrC* et *yubB*. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que le simple mutant du gène *yubB* présente un niveau de résistance égal à celui de la souche sauvage (350 µg/mL) (Fig.71) alors que celui du double mutant (*yubB*, *bcrC*) est du même ordre de grandeur que celui du simple mutant *bcrC* (40 µg/mL). Ainsi, le gène *yubB* n'intervient-il pas dans la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*. Enfin, une troisième protéine de *B. subtilis*, YodM, apparaît comme très similaire à la protéine YbjG d'*E. coli* et nous envisageons de tester également sa participation dans la résistance à la bacitracine.

## 2. Topologie membranaire de la protéine BcrC

La séquence d'une protéine de la famille PAP<sub>2</sub> renferme un motif PAP<sub>2</sub> conservé identifié par Stukey et Carman (1997) dont la séquence est : **RP-(X<sub>12-54</sub>)-PSXH-(X<sub>31-54</sub>)-SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D**. Les prédictions de topologie de la protéine BcrC ne permettent pas de déduire la position (cytoplasmique ou extracellulaire) de ses extrémités N- et C-terminale. Par contre, il est intéressant de positionner les résidus conservés du motif PAP<sub>2</sub>. Les 4 fragments transmembranaires sont disposés en tandem et séparés par une boucle extra membranaire de 42 résidus contenant en particulier le motif **RP-(X<sub>12-54</sub>)-PSDH**. La seconde partie du motif, **SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D**, se positionne dans la boucle séparant les hélices 3 et 4, à une extrémité de la troisième hélice transmembranaire (Fig.72).

Bien que la localisation précise du site actif des UPP phosphatases de type PAP<sub>2</sub> ne soit que peu documenté, il nous a paru important d'étudier la topologie de la protéine BcrC au sein de la membrane de *B. subtilis*. Pour ce faire, nous avons réalisé des fusions entre des fragments tronqués de la protéine BcrC et la phosphatase alcaline d'*E. coli* (PhoA). Les différentes protéines chimériques ont été produites chez *E. coli*, et les souches correspondantes testées pour leur activité phosphatase sur milieu solide en utilisant comme substrat le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine (ou Xp). Le produit de déphosphorylation de ce substrat étant fortement coloré (bleu) il est facilement identifiable. Rappelons que la phosphatase alcaline ne présentera une activité que si elle a été « transloquée » par la bactérie. Ainsi, nous avons réalisé les trois constructions suivantes : *bcrC<sub>48</sub>-phoA*, *bcrC<sub>99</sub>-phoA* et *bcrC<sub>141</sub>-phoA* contenant respectivement les parties N-terminales allant des résidus 1 à 48, 1 à 99 ou 1 à 141 de la protéine BcrC. Une souche d'*E. coli* délétée du gène endogène *phoA* a été utilisée pour produire les différentes protéines de fusion et les bactéries recombinantes correspondantes ont été cultivées sur milieu agar LB contenant 100 µg/mL d'Xp. La surproduction de la protéine PhoA seule a été utilisée comme contrôle négatif. Les résultats sont présentés dans la figure 73 ci-après.

Une coloration bleue est observée lorsque les protéines BcrC<sup>48</sup>-PhoA et BcrC<sup>141</sup>-PhoA sont produites mais pas avec la protéine BcrC<sub>99</sub>-PhoA suggérant que la topologie de la protéine BcrC dans la membrane d'*E. coli* adopte une conformation dans laquelle les extrémités N et C-terminales sont cytoplasmiques (Fig.74 ci-après). Cette topologie place le motif très conservé **PSDH** des phosphatases de type PAP<sub>2</sub> dans le cytoplasme tandis que le second motif, **SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D**, se retrouve à l'extérieur (Fig.74 ci-après). Il serait intéressant de conforter ces résultats par d'autres fusions, avec la β-galactosidase par exemple, cet enzyme n'étant actif qu'à l'intérieur de la cellule. Dans un second temps, des études de mutagenèse

dirigée pourraient être entreprises afin de définir les résidus aminoacides important pour l'activité phosphatase de la protéine BcrC.



## Problématique de l'article 3

Le système BceRSAB, composant majeur de résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*, est formé d'un phosphorelais (BceRS) contrôlant l'expression des gènes de structure du transporteur ABC (BceAB). Le schéma de fonctionnement le plus simple correspond à une détection directe de la bacitracine par le senseur BceS, à son activation et à la transmission de l'information au régulateur de réponse BceR puis à l'expression des gènes *bceAB*. L'antibiotique est alors pris en charge par le transporteur ABC agissant soit comme une « flippase » soit comme un « vacuum cleaner » afin de détoxifier la cellule (Fig.75).

Les prédictions de topologie du senseur BceS indiquent l'existence de deux fragments transmembranaires séparés par une boucle extra cytoplasmique très courte comportant seulement 3 résidus d'acides aminés. Une analyse détaillée réalisée par le groupe de T. Mascher a montré que les senseurs de ce type sont principalement retrouvés chez les bactéries du groupe des Firmicutes et qu'ils ne semblent pas être associés à aucun autre domaine additionnel tel qu'un domaine PAS ou GAF à détection cytoplasmique (Mascher *et al.*, 2003; Mascher, 2006). Ces diverses observations ont conduit ces auteurs à émettre l'hypothèse que les stimuli que ces senseurs détectent sont soit membranaires soit directement liés à l'état physiologique de la membrane (Mascher *et al.*, 2003; Mascher, 2006). Ainsi, le senseur BceS pourrait-il détecter le complexe bacitracine-UPP (en orange et rouge sur la figure 75) plutôt que la bacitracine seule. Ces auteurs proposent en outre que le senseur BceS après avoir détecté le complexe, le présenterait au transporteur ABC afin que celui-ci le prenne en charge pour détoxifier la cellule (Mascher *et al.*, 2003).

Les analyses de QT PCR que nous avons réalisées (cf. article 1) indiquaient clairement que la transcription des gènes *bceA* et *bceB* est dramatiquement augmentée en présence de bacitracine dans le milieu. Par la suite, cependant, nous avons fait une observation inattendue concernant une souche dans laquelle le gène *bceA* est interrompu par pMUTIN (Fig.76). En effet, il n'était plus possible d'activer par la bacitracine l'expression de la fusion *bceA::lacZ* ainsi engendrée. En d'autres termes cela signifie que la présence du phosphorelais BceRS intact et de son inducteur physiologique (la bacitracine) ne suffisent pas à activer la transcription des gènes cibles *bceAB*.

Ce résultat indiquant un rôle surprenant du transporteur ABC dans l'activation de la transcription des gènes *bceRSAB* par la bacitracine, nous avons cherché à comprendre la (ou les) fonction de ce partenaire inattendu dans la réponse bactérienne à l'antibiotique. Prenant en compte les observations de T. Mascher mentionnées ci-dessus lors de notre étude, nous avons tout naturellement porté notre attention sur le rôle de l'UPP dans la stimulation du système (cf. article 3).

## Conclusion de l'article 3

Notre étude avait pour objectif de décrypter les mécanismes moléculaires mis en jeu au sein du système BceRSAB lors de la réponse développée par de *B. subtilis* afin de devenir résistante à la bacitracine. Nos résultats indiquent que le transporteur ABC est non seulement requis pour permettre à la bactérie de résister à l'antibiotique probablement par un mécanisme d'efflux mais également pour permettre l'induction d'expression de ses propres gènes de structure. Dans ce contexte, l'activité de transport du transporteur semble critique. En effet, la réserpine, inhibiteur connu de nombreux transporteurs dont les transporteurs ABC, diminue très fortement la réponse à la bacitracine en terme de niveau de transcription à partir du promoteur *PbceA*. D'autre part, le remplacement du domaine NBD sauvage par un domaine muté au niveau du résidu glutamate de la D-loop, conduit à une forte réduction, voire à la perte totale, de la réponse du système à la bacitracine.

Le processus d'activation implique la présence des quatre partenaires du système BceR, BceS, BceA et BceB. Notons que, en l'absence de bacitracine, les quatre gènes sont transcrits à un niveau basal faible mais détectable dans la souche sauvage (Joseph *et al.*, 2002) (article 3). Le niveau de transcrits des gènes *bceA* et *bceB* augmente de façon drastique en présence de bacitracine (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a) (et articles 1 et 3) alors que celui de *bceR* et *bceS* n'est pas modifié (Mascher *et al.*, 2003; Ohki *et al.*, 2003a). Ceci suggère qu'au moment de l'addition de bacitracine, un niveau très faible de transporteur ABC dans la membrane permet l'induction du système par l'antibiotique alors même qu'il n'est pas encore suffisant pour permettre aux cellules de résister à l'action de la bacitracine. Nous avons pu vérifier, au moins en ce qui concerne le niveau d'expression des transcrits de *bceA* et *bceB*, la véracité de cette affirmation.

Dans cette situation tout à fait exceptionnelle de la participation d'un transporteur au contrôle de l'expression de ses propres gènes, le fait que l'activité de transport de BceAB soit importante pose le problème de la caractérisation de son substrat et de la relation de ce dernier avec la nature du stimulus du système BceRSAB. Mascher *et coll.* ont proposé que tous les senseurs de type BceS (ayant une boucle extracytoplasmique courte et couplé à un transporteur ABC) détectent des signaux intra membranaires (Mascher, 2006). La bacitracine ayant pour cible l'UPP, ce lipide pourrait être extrêmement important dans la mise en place du stimulus d'induction du système BceRSAB et Masher *et coll.* avaient proposé que le complexe UPP-bacitracine soit le véritable inducteur. Ayant étudié de manière détaillée l'une des phosphatases de l'UPP (BcrC), nous l'avons utilisé pour diminuer le pool d'UPP dans la cellule afin de voir les éventuelles répercussions de cette baisse sur l'induction du système BceRSAB par la bacitracine. Nos résultats indiquent que lorsqu'une souche surproduisant

BcrC est mise en présence de bacitracine, une diminution de 70 % du niveau d'induction du promoteur *PbceAB* est observée par rapport à la souche contrôle. Ce résultat souligne l'importance de l'UPP dans la réponse du système *BceRSAB* à la bacitracine mais démontre clairement que le complexe UPP-bacitracine ne peut constituer à lui seul le stimulus du système comme suggéré par Mascher *et coll.* (Mascher *et al.*, 2003). En effet, si tel était le cas, une stimulation du système devrait être observée en l'absence du transporteur.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous proposons un modèle où le transporteur est une flippase ayant comme substrat le complexe UPP-bacitracine. La flippase accumulerait ainsi le complexe UPP-bacitracine dans le feuillet externe de la membrane bactérienne créant une dissymétrie de la membrane qui serait perçue par le senseur (voir discussion).

## Résultats complémentaires de l'article 3

### 1. Senseur *BceS* et résistance à la bacitracine

Nous avons testé l'hypothèse faite par Mascher *et coll.* (Mascher *et al.*, 2003) proposant que le senseur *BceS* détecte le complexe membranaire UPP-bacitracine et le présente au transporteur ABC afin qu'il le prenne en charge. Pour cela, nous avons utilisé une souche interrompue au niveau du gène *bceS* et produisant en trans le régulateur de réponse *BceR* sous le contrôle de l'IPTG.

La souche sauvage de *B. subtilis*, qu'elle surproduise ou non, le régulateur de réponse *BceR*, présente une  $IC_{50}$  pour la bacitracine d'environ 400  $\mu\text{g/mL}$  ; Fig.77). La souche *bceS::pMUTIN*, en présence ou non d'IPTG, est sensible à la bacitracine comme toutes les souches interrompues sur un des gènes du locus *bce* (article 1) avec une  $IC_{50}$  (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 80 fois plus faible que celle de la souche sauvage (Fig.77). L'IPTG seul d' n'a donc pas d'effet sur le niveau de résistance de ce mutant. De manière similaire, en absence d'IPTG la souche *bceS::pMUTIN/pDG-bceR* est sensible à la bacitracine ( $IC_{50} = 3\mu\text{g/mL}$ ). Par contre, l'ajout d'IPTG permet à cette souche d'atteindre un niveau de résistance similaire à celui d'une souche sauvage avec une  $IC_{50}$  de 390  $\mu\text{g/mL}$  (Fig.77)

Ainsi, dans une souche n'exprimant pas le senseur *BceS* mais produisant le transporteur ABC *BceAB* le niveau de résistance à la bacitracine est le même que celui de la souche sauvage. Ce résultat démontre que chez *B. subtilis* le transporteur ABC *BceAB* peut, à lui seul, conférer la résistance à la bacitracine et que le senseur *BceS* ne présente pas le substrat au transporteur.

2. Dans les systèmes couplant génétiquement et fonctionnellement un phosphorelais à un transporteur ABC, ce dernier est-il toujours nécessaire à la réponse ?

Les résultats mentionnés dans l'article 3 attribuent au transporteur ABC BceAB un rôle aussi important qu'au senseur BceS puisque sa présence est nécessaire à l'expression de ses propres gènes de structure dans la réponse de *B. subtilis* à la bacitracine. Chez cette bactérie, BceRSAB et deux autres systèmes, YvcPQRS et YxdJKLM, semblent issus d'un ancêtre commun par duplications successives (Joseph, 2002). Ils présentent donc de très fortes similarités. Il est donc tentant de postuler que, tout comme dans le cas du système BceRSAB, les transporteurs ABC de ces systèmes soient nécessaires à l'activation de l'expression des gènes du transporteur correspondant.

Nous avons voulu tester cette hypothèse en prenant comme exemple le système YvcPQRS et l'enduracidine (Giyanto *et al.*, 2003). Dans un premier temps des expériences de QT-PCR nous ont permis de déterminer la quantité de transcrits du gène *yvcR* (codant le domaine NBD du transporteur ABC) dans une souche sauvage de *B. subtilis* cultivée en présence ou en absence d'enduracidine. Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que la présence d'enduracidine dans le milieu provoque un accroissement de la quantité de transcrits du gène *yvcR*, confirmant ainsi les résultats obtenus par Giyanto *et coll.* La délétion de l'un quelconque des gènes du système n'augmentant pas la sensibilité de la souche à l'enduracidine, cette dernière pourrait être un inducteur gratuit du système YvcPQRS et ne pas correspondre au véritable « inducteur/substrat ». Nous avons alors étudié une souche dans laquelle le gène *yvcR* codant la NBD, est interrompu par insertion du pMUTIN et porte donc une fusion transcriptionnelle *yvcR::lacZ*. Nous savions que le promoteur PyvcR est parfaitement fonctionnel dans cette souche puisque la fusion transcriptionnelle *yvcR::lacZ* est exprimée lorsque le régulateur de réponse YvcP est surproduit en trans (Joseph *et al.*, 2002). Pourtant, lorsque nous avons mesuré l'activité  $\beta$ -galactosidase en réponse à l'addition d'enduracidine (tableau 4) aucune activité  $\beta$ -galactosidase n'a pu être détectée. Cette observation qui bien entendu devra être confirmée nous conduit à penser que le transporteur YvcRS est lui aussi indispensable à l'activation du système YvcPQRS par l'enduracidine bien que ce dernier soit un inducteur gratuit. Afin de confirmer cette hypothèse nous prévoyons de compléter la souche *yvcR::pMutin* en surproduisant le domaine NBD (YvcR) en trans ce qui normalement (cf. article 1) devrait restaurer la réponse à l'enduracidine si notre hypothèse est exacte.

### 3. Les senseurs à boucle extracytoplasmique courte dans les génomes bactériens

Courant 2006, avant que le travail du groupe de T. Mascher (Mascher, 2006) ne soit publié, nous nous étions, intéressés aux histidine kinase (senseurs) présentant les mêmes caractéristiques que BceS, YvcQ et YxdK, c'est-à-dire des senseurs avec deux fragments transmembranaires séparés par une boucle extracytoplasmique d'une taille inférieure à 15 résidus aminoacides. En collaboration avec l'équipe de E. Talla au laboratoire, 247 senseurs bactériens ont été recensés dont 108 (soit 44 %) sont codés dans des génomes de bactéries du groupe des Firmicutes le reste étant répartis dans plusieurs autres groupes de bactéries. Concernant l'environnement génétique des gènes codant ces senseurs, 86 (35 % du total) sont situés à proximité (moins de deux ORF) de gènes codant un transporteur ABC dont 63 appartiennent à la sous-famille 9 tout comme BceAB, YvcRS et YxdLM de *B. subtilis*. Le nombre de cas de proximité génétique entre gène du senseur et gènes d'un transporteur ABC est particulièrement élevé dans les bactéries du groupe des Firmicutes car sur les 108 gènes de senseurs, 66 (soit 71 %) sont situés à proximité de transporteurs ABC. Cette proportion est beaucoup plus faible dans les autres groupes bactériens où sur les 139 senseurs recensés, 20 (soit 14 % seulement) sont codés à proximité de transporteurs ABC. Il est cependant intéressant de remarquer que dans ce dernier cas, la moitié appartiennent à la sous-famille 9. A l'heure actuelle, notre hypothèse de travail est que ces systèmes associant phosphorelais de type OmpR et transporteur ABC de la sous-famille 9 constituent chez les Firmicutes des systèmes de résistance à des antibiotiques (connus ou non) provoquant un stress de l'enveloppe bactérienne. Nous aborderons de façon plus détaillée ce problème dans la conclusion générale du manuscrit.

# Discussion Générale et Perspectives

Notre étude a porté sur les mécanismes de résistance à la bacitracine chez la bactérie modèle des Firmicutes, *B. subtilis*. Deux mécanismes complémentaires et régulés de façon indépendante ont été identifiés chez ce microorganisme. Le premier implique BceAB qui est un transporteur ABC de la sous-famille 9 et est le composant majeur de la résistance chez *B. subtilis*. Le deuxième met en jeu BcrC, composant mineur de la résistance, qui participe à un mécanisme de modification de la cible de l'antibiotique, l'UPP. En effet, BcrC est une UPP phosphatase qui participe à la régénération du translocateur lipidique des monomères de peptidoglycane, l'UP. De ce fait, BcrC est en compétition avec la bacitracine pour sa cible, l'UPP.

Les protéines intervenant dans ces mécanismes sont codées par des gènes dont l'expression est induite en présence de bacitracine. La régulation des gènes *bceA* et *bceB* fait intervenir un phosphorelais à deux composants, BceRS, dont les gènes sont directement à proximité des gènes *bceA* et *bceB*. Les deux points importants concernant ce système sont (i) que le transporteur ABC participe à la régulation de ces propres gènes de structures et (ii) que l'UPP et la bacitracine participent au stimulus du système.

Le gène *bcrC*, par ailleurs, est transcrit par l'ARN polymérase contenant un des trois facteurs sigma à fonction extracytoplasmique,  $\sigma^M$ ,  $\sigma^W$  ou  $\sigma^X$ , dont l'un,  $\sigma^M$ , est activé en présence de bacitracine.

## 1. Les UPP phosphatases

BcrC appartient à la famille des phosphatases de type PAP<sub>2</sub> qui contient plus de 1600 membres répartis dans l'ensemble des règnes du vivant et impliqués dans des fonctions variées. Notre étude chez *B. subtilis*, associée à celle de nos collaborateurs chez *E. coli* (El Ghachi *et al.*, 2005), a permis d'élargir le spectre des fonctions rencontrées pour cette famille de phosphatase en y ajoutant des protéines ayant une activité UPP phosphatase. Plusieurs orthologues de BcrC, comme BcrC<sub>Bl</sub> de *B. licheniformis* ou YbjG et PgpB d'*E. coli*, sont également impliqués dans la résistance à la bacitracine chez ces microorganismes (El Ghachi *et al.*, 2005; Podlesek *et al.*, 2000) cependant, la régulation de l'expression des gènes codant pour ces orthologues ne fait pas forcément intervenir de facteurs sigma à fonction extracytoplasmique. La protéine BcrC<sub>Bl</sub> par exemple fait partie du système d'immunité à la bacitracine chez *B. licheniformis*, et le gène *bcrC<sub>Bl</sub>* est régulé de manière concomitante à la production de bacitracine par le système phosphorelais BacRS (voir introduction). La fonction de cette protéine d'immunité n'est pas connue mais notre étude permet de suggérer fortement que c'est également une UPP phosphatase, et non pas un transporteur ABC comme proposée

auparavant (Podlessek *et al.*, 1995). L'opéron codant pour les protéines d'immunité à la bacitracine chez *B. licheniformis* contient trois gènes *bcrA*, *bcrB* et *bcrC<sub>Bl</sub>*. De part leur similarité aux domaines NBD et MSD des transporteurs de la sous-famille 7, les protéines BcrA et BcrB pourraient constituer un transporteur ABC exportant la bacitracine. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la réserpine sur la résistance conférée par ce transporteur potentiel BcrAB, et en absence de BcrC<sub>Bl</sub>, afin de tester cette hypothèse. D'autre part, des tests d'activités UPP phosphatases de la protéine BcrC<sub>Bl</sub> pourraient définitivement caractériser le mode d'action de cette protéine.

L'étude effectuée chez *E. coli* par El Ghachi *et coll.* a permis d'identifier quatre UPP phosphatases, dont trois appartiennent à la famille PAP<sub>2</sub> et une, BacA, qui est classée dans une famille différente. Il apparaît, d'une part, que BacA est l'UPP phosphatase majeure d'*E. coli* et, d'autre part, que toutes ces protéines participent à la résistance à la bacitracine. Il est moins évident que l'homologue de BacA chez *B. subtilis*, YubB, soit une UPP phosphatase car cette protéine n'intervient pas dans la résistance à la bacitracine. Nous nous devons de vérifier si YubB possède une activité similaire à son homologue BacA avant de conclure. Si YubB est réellement une UPP phosphatase, il serait intéressant de comprendre pourquoi seule BcrC participe à la résistance. Notre hypothèse est que BcrC, contrairement à YubB, peut déphosphoryler le complexe UPP-bacitracine. Il serait donc intéressant, dans un premier temps, de comparer les caractéristiques enzymatiques (cinétique de déphosphorylation, V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>...) de BcrC, YubB et également BacA. Puis, dans un deuxième temps, nous pourrions obtenir *in vitro* les courbes d'inhibition de l'activité de ces différentes protéines par la bacitracine, similairement à celle réalisée avec BcrC (article 2). Ceci nous permettrait de déterminer (i) si toutes ces protéines ont le même comportement en présence de bacitracine ou (ii) si les concentrations de bacitracine inhibant BcrC sont plus élevées que celles inhibant YubB. Ce dernier cas supposerait que BcrC puisse déplacer l'équilibre du complexe UPP-bacitracine pour déphosphoryler l'UPP.

La recherche des homologues de BcrC dans les bases de données par BLAST contre une banque non redondante montre que dans la plupart des microorganismes, plusieurs gènes codent pour des UPP phosphatases putatives de la famille PAP<sub>2</sub>. On trouve 5 gènes orthologues chez *B. licheniformis* (dont *bcrC<sub>Bl</sub>* et *ywoA*), 2 chez *B. subtilis* (*bcrC* et *yodM*), 2 chez *S. mutans* et 1 chez *E. faecalis* (Tableau 5 ; article 2). Ces gènes ont donc subi des évènements de duplications et l'on peut supposer que ceci répond à leur implication dans une des fonctions essentielles de la bactérie, la synthèse de la paroi.



Le double mutant *yubB bcrC* de *B. subtilis* ne présente pas de défaut de croissance, suggérant qu'une troisième protéine assure la régénération de l'UP dans un tel mutant, probablement la protéine YodM, très similaire à BcrC. Nous pourrions construire un triple mutant *yodM, bcrC, yubB* et tester sa viabilité pour vérifier cette hypothèse. Nous pourrions également tester l'implication de YodM dans la résistance à la bacitracine. Ces expériences nous permettraient de caractériser cette protéine chez *B. subtilis*.

Il est à noter que cette redondance de protéines de même fonction est retrouvée pour d'autres protéines participant à la synthèse de la paroi, les PBPs. D'un point de vue fondamental, l'étude de ces PBPs a permis de connaître la localisation des étapes de polymérisation du peptidoglycane et les mécanismes impliqués dans ces polymérisations. Les UPP phosphatases sont les enzymes catalysant la dernière étape du cycle de biosynthèse de la paroi, étape dont les mécanismes moléculaires restent largement inconnus. L'étude des UPP phosphatases pourrait nous permettre notamment de savoir si l'UPP est déphosphorylé dans le feuillet externe, dans le feuillet interne ou dans les deux feuillets de la membrane plasmique. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à la topologie membranaire de la protéine BcrC. Toutes les UPP phosphatases de la sous-famille PAP<sub>2</sub> présentent dans leur séquence un motif consensus conservé défini par Stukey et Carman (Stukey and Carman, 1997). Nos résultats établissent que ce motif consensus s'étend, pour BcrC, dans la boucle cytoplasmique entre l'hélice transmembranaire 2 et 3, au niveau de l'hélice transmembranaire 3 et dans la petite boucle extracellulaire séparant les hélices 3 et 4 (Fig.74). Nous devons dans un premier temps confirmer ces résultats en réalisant d'autres fusions de la protéine BcrC avec les protéines rapportrices PhoA ou LacZ. Puis, il serait important d'identifier les résidus aminoacides formant le site actif de BcrC. A ce sujet, une étude très récente établit que le résidu aspartate à l'extrémité C-terminale du motif PAP<sub>2</sub> est indispensable à l'activité phosphatase de la protéine PhoN, de type PAP<sub>2</sub>, de *S. typhimurium* (Makde *et al*, 2007). Pour BcrC, ce résidu aspartate conservé se trouve à l'extrémité C-terminale de la petite boucle extracellulaire séparant les hélices 3 et 4. Nous pourrions commencer par muter ce résidu pour tester son implication dans l'activité phosphatase. Une méthode plus rapide serait de construire une protéine BcrC tronquée au niveau de cette petite boucle extracellulaire et d'en tester l'activité UPP phosphatase.

## 2. Quelle est l'utilité pour *B. subtilis* d'avoir deux systèmes de résistance à la bacitracine ?

Les deux systèmes de *B. subtilis*, BceRSAB et BcrC, sont complémentaires et régulés de façon indépendante. Leur participation dans la résistance n'est pas équivalente : le système BceRSAB est sans aucun doute le plus efficace. Nous avons remarqué que la surproduction de BcrC diminue la réponse à la bacitracine du système BceRSAB. Dans l'hypothèse où BcrC n'interagit pas directement avec les protéines du système BceRSAB, cette expérience nous permet de supposer, d'une part, que l'UPP participe au stimulus du système BceRSAB et, d'autre part, qu'il existe une coordination entre l'action de BcrC et l'activation de BceRSAB. Il faut rappeler que seul BceRSAB semble répondre spécifiquement à la présence de bacitracine dans le milieu et que les gènes *bceA* et *bceB* sont très peu transcrits en absence de l'antibiotique. Le gène *bcrC*, par contre, est transcrit par l'ARN polymérase en présence de trois facteurs sigma différents. Notre hypothèse est que le gène *bcrC* est transcrit dans des conditions très variables et que la protéine BcrC est présente dans la cellule même en absence de bacitracine. On peut alors supposer que ces deux systèmes permettent à *B. subtilis* de s'adapter à plusieurs doses de bacitracine selon le modèle présenté dans la figure 78. Dans ce modèle, la présence du complexe UPP-bacitracine dans la membrane initie l'activation du système majeur de résistance BceRSAB (Fig.78, flèche rouge). Ce complexe est en équilibre avec l'UPP libre avec une constante de dissociation de  $10^{-6} \text{ M}^{-1}$ . En présence de faibles doses de bacitracine la protéine BcrC seule permet la résistance, et maintient le système BceRSAB inactif car elle déphosphoryle l'UPP (ou directement le complexe UPP-bacitracine) pour régénérer l'UP (Fig.78 flèches oranges). A fortes doses de bacitracine, l'équilibre est fortement déplacé vers le complexe UPP-bacitracine, ce qui conduit à l'activation de BceRSAB qui prend le relais pour conférer la résistance.

Ce modèle suppose tout d'abord que l'activation du système BceRSAB dépend de la dose de bacitracine présente dans le milieu et, deuxièmement, que cette dose réponse dépend de la présence de BcrC et des autres UPP phosphatases potentielles (YodM, YubB). Nous pourrions donc tester l'expression de la fusion transcriptionnelle *bceA :: lacZ* à différentes doses de bacitracine en présence ou en absence de BcrC et de ces phosphatases. Il serait intéressant par la suite de posséder des anticorps dirigés contre les protéines BceA, BceB et BcrC. Ceux-ci nous permettraient de comparer les niveaux protéiques basaux (en absence de bacitracine) ou induits (en présence de l'antibiotique) des deux systèmes. On pourrait également en tirer des cinétiques d'activation de chacun des systèmes en réponse à la bacitracine et déterminer s'il existe une coordination entre l'activation de BceRSAB et l'activation de BcrC.

### 3. Le système BceRSAB

BceRSAB est le composant majeur de résistance à la bacitracine chez *B. subtilis* et son étude nous a permis de mettre en évidence que le transporteur ABC BceAB, en plus du phosphorelais BceRS, participe à la régulation de ces propres gènes de structure. En effet, en utilisant une fusion transcriptionnelle du promoteur *PbceAB* au gène rapporteur *lacZ* nous avons montré que la présence du transporteur ABC BceAB est indispensable à l'induction de cette fusion par la bacitracine (article 3). De plus, nous montrons que les deux partenaires du transporteur (NBD et MSD) sont indispensables et il semble que le transporteur doive être fonctionnel pour permettre l'activation du système. Un autre résultat important est que la modulation du pool d'UPP cellulaire influence l'induction du système par la bacitracine, suggérant fortement que l'UPP participe au stimulus du système. Mascher *et coll.* avait déjà proposé que le stimulus du senseur BceS soit le complexe membranaire UPP/bacitracine (Mascher *et al.*, 2003). Cependant, nos résultats concernant le transporteur ABC indiquent que la seule présence de ce complexe UPP/bacitracine dans la membrane ne suffit pas à activer le phosphorelais BceRS.

Plusieurs modèles d'étude peuvent être proposés pour expliquer l'ensemble de ces caractéristiques particulières. Tous supposent que le stimulus du système n'existe pas en absence du transporteur ABC.

Premièrement, le transporteur étant prédit comme exporteur, il agirait comme une flippase en exportant le complexe UPP/bacitracine dans le feuillet externe de la membrane plasmique, créant ainsi une dissymétrie membranaire ressentie par le senseur BceS (Fig.79A). Ce modèle suppose qu'en l'absence de transporteur, le complexe UPP-bacitracine se répartisse entre les deux feuillets de la membrane. Le comportement de l'UPP dans la membrane est peu connu mais il semble qu'il soit capable de se transloquer de manière passive lorsqu'il est complexé au monomère de peptidoglycane, molécule de taille importante. On peut alors penser que le complexe UPP/bacitracine est également capable de se transloquer de manière équivalente entre les deux feuillets de la membrane. Ce modèle suppose également que le niveau basal de production du transporteur ABC soit suffisant pour créer la dissymétrie membranaire au niveau du feuillet externe mais qu'un niveau de production beaucoup plus grand soit nécessaire à la résistance.

Une deuxième possibilité serait que les domaines membranaires du transporteur (domaine MSD) et du senseur interagissent directement en présence du stimulus pour activer le phosphorelais. Nos résultats obtenus avec la réserpine montrent que l'activité d'export semble nécessaire à l'activation du système. Comme précisé dans l'introduction, les transporteurs

ABC subissent un changement conformationnel important lorsqu'ils sont en présence de leur allocrite. On distingue en particulier deux états conformationnels dit « ouvert », en absence de l'allocrite, et « fermé » lors du transport. On peut supposer que l'une de ces conformations puisse permettre aux domaines MSD d'interagir avec les domaines membranaires du senseur pour l'activer. Notre hypothèse est que le transporteur ABC en conformation « ouverte » n'interagit pas avec le senseur. En présence de son allocrite, le complexe UPP/bacitracine par exemple, il passerait en conformation « fermée » et interagirait avec le senseur pour activer le phosphorelais (Fig.79B).

Ces deux premiers modèles s'appuient sur la prédiction que le transporteur BceAB est un exporteur. Cette prédiction se base essentiellement sur l'absence de protéine affine type SBP (Solute Binding Protein) toujours associée aux importeurs. Nous avons identifié deux autres transporteurs ABC, nommés YvcRS et YxdLM, de la même sous famille que BceAB et également couplés à des phosphorelais similaires à BceRS. Les domaines MSD de ces trois transporteurs (BceB, YvcS et YxdM) ont tous une topologie particulière et similaire : ils sont constitués de dix fragments transmembranaires et ont tous une boucle extracytoplasmique d'environ 200 acides aminés séparant leur hélice membranaire 7 et 8 (voir problématique de l'article 1). Cette boucle pourrait être impliquée dans la reconnaissance d'un allocrite extracellulaire afin de l'importer. Le fait que les boucles des trois transporteurs de *B. subtilis* soient peut conservées au niveau de leur séquence protéique pourrait en outre rendre compte d'une reconnaissance spécifique d'un allocrite. Dans le cas du système BceRSAB on pourrait alors imaginer que le transporteur ABC importe la bacitracine afin de la détourner de sa cible membranaire. L'antibiotique serait ensuite dégradé ou inactivé dans le cytoplasme de la bactérie. Récemment, un importeur de type ABC a été identifié comme indispensable à la résistance à un antibiotique cationique, la protamine, chez *Sinorhizobium meliloti* et les auteurs supposent un mécanisme de dégradation de la protamine suite à son import (Nogales *et al.*, 2006). L'inactivation de la bacitracine est relativement facile et fait intervenir une simple oxydation de la forme active de la bacitracine, la bacitracine A. Ce modèle implique la participation de protéines intracellulaires intervenant dans cette inactivation, protéines restant à identifier. La participation du transporteur ABC dans l'activation du système pourrait toujours dépendre d'une interaction directe du transporteur avec le senseur. Cependant, il est plus difficile de comprendre avec ce modèle l'implication de l'UPP (membranaire) dans le stimulus du système.

Les modèles présentés ci-dessus soulèvent plusieurs questions auxquelles il faudrait tenter de répondre.

- Le transporteur BceAB est-il un exporteur ou un importeur ?

Il serait important de parvenir à marquer la bacitracine afin d'avoir une traçabilité de la molécule. L'utilisation d'un fluorochrome semble difficile et la taille des fluorochromes pourrait fortement altérer le comportement de la bacitracine. Nous nous proposons donc de la marquer radioactivement avec du tritium ( $^3\text{H}$ ) comme isotope radioactif. Nous pourrions alors observer si la bacitracine pénètre dans le cytoplasme ou est capturée par son attachement avec la membrane de la bactérie. Cette étude pourrait être entreprise avec des souches sensibles (délétées des gènes *bceA* et *bceB*), sauvage ou au contraire surproduisant le transporteur ABC BceAB. Nous pourrions tout de même tenter de marquer la bacitracine à l'aide d'un fluorochrome afin d'observer sa pénétration cellulaire éventuelle ou son attachement membranaire par microscopie dans ces différentes souches. Si ces expériences fonctionnent, il serait alors intéressant de construire un transporteur dont le domaine MSD BceB est tronqué (ou muté) au niveau de sa boucle extracytoplasmique supposée impliquée dans la reconnaissance de l'allocrite et d'observer le comportement de la bacitracine en présence d'un tel transporteur.

Enfin, dans le cas où le transporteur BceAB se révèle être un importeur, nous pourrions tenter de rechercher les protéines cytoplasmiques impliquées dans une éventuelle dégradation de la bacitracine. Pour cela, nous pouvons supposer que les gènes codant ces protéines sont des cibles directes du régulateur de réponse BceR. Il serait intéressant de rechercher ces cibles dans le génome de *B. subtilis*. Il nous suffirait de réaliser l'analyse du transcriptome d'une souche surproduisant le régulateur BceR et de les comparer au transcriptome d'une souche sauvage. Par la suite, nous pourrions tester l'implication de ces différentes cibles dans la résistance à la bacitracine en supposant que si le gène cible est impliqué dans la dégradation de la bacitracine, la délétion de ce gène doit conduire à un phénotype d'hypersensibilité à la bacitracine équivalent à celui observé avec les mutants du système Bce.

- Quel est l'allocrite pris en charge par le transporteur BceAB ? Est-ce la bacitracine, le complexe UPP-bacitracine ou autre chose ?

Seule cette identification nous permettra d'expliquer comment le transporteur ABC participe à la fois à la résistance à l'antibiotique et à l'activation du système. Aucun export de bacitracine n'a jusqu'à présent été démontré et si le transporteur agit comme une flippase, nous sommes face à un problème technique car il est difficile d'observer un transport du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane. Cependant, de nombreuses expériences effectuées avec des transporteurs ABC de type flippase utilisent le fait que l'activité ATPasique du transporteur augmente fortement en présence de son allocrite. Nous pourrions tenter de purifier le transporteur ABC afin de reconstituer des protéoliposomes contenant exclusivement ce transporteur, puis soumettre différents types d'allocrites à ces protéoliposomes et mesurer l'activité ATPasique. Les allocrites testés seraient en particulier la bacitracine, la bacitracine complexée à l'UPP, l'UPP seul ou encore d'autres isoprénoides comme le FPP qui est connu comme complexant également la bacitracine. En effet, le transporteur pourrait exporter le FPP dans le feuillet externe afin que la bacitracine s'y fixe préférentiellement plutôt qu'à sa véritable cible, l'UPP. Cette dernière hypothèse est à tester mais elle semble peu probable étant donné que le pool de FPP cellulaire est très faible (D. Mengin-Lecreux, communication personnelle) et que le régulon bacitracine ne contient aucun gène impliqué dans la synthèse des isoprénoides (Mascher *et al* résultats supplémentaires, 2003).

- Quel est le mécanisme moléculaire qui permet au transporteur de participer à la régulation du système ?

Cette question pourrait être abordée par l'étude d'une interaction éventuelle entre le transporteur ABC et le senseur BceS en réalisant des tests en présence d'un agent pontant ou en utilisant la méthode du double hybride.

Au cours de ma thèse nous avons tenté, par une méthode de mutagenèse aléatoire, d'obtenir des mutants constitutifs du système BceRSAB en supposant que les mutations seraient localisées dans les domaines membranaires du senseur ou du transporteur. Cette technique n'a malheureusement pas donné de résultats significatifs mais dans la même optique, il serait intéressant de procéder à des expériences de mutagenèse dirigée sur les domaines membranaires du senseur et du transporteur et d'analyser le phénotype résultant de ces mutations en terme d'activation du système ou d'interaction. Ceci pourrait préciser les

domaines importants, dans chacun des deux partenaires, intervenant dans la régulation du système ou dans une interaction potentielle entre ces domaines. On peut enfin s'intéresser à l'état de phosphorylation du senseur dans plusieurs conditions à savoir en présence ou en absence du transporteur ABC et/ou de bacitracine.

Nous pourrions nous intéresser également aux différents états conformationnels de ce transporteur en présence ou en absence de son allocrite potentiel, le complexe UPP/bacitracine. Il est à noter que nous possédons un transporteur muté sur le résidu glutamate de la « D-loop » du domaine NBD et nous savons que ce transporteur muté ne permet pas l'activation du système. Il serait alors intéressant de préciser les caractéristiques de ce mutant : ce transporteur est-il capable de fixer l'ATP ? d'hydrolyser l'ATP ? de se dimériser ? Ces observations pourraient nous renseigner quant à l'état conformationnel du transporteur requis pour permettre l'activation en s'appuyant sur le modèle « Switch-ATP » développé récemment par Linton et Higgins (Linton and Higgins, 2006).

Une dernière façon de décortiquer les mécanismes de régulation impliqués dans ce système serait de s'intéresser aux systèmes similaires présents chez *B. subtilis* et les autres Firmicutes. On trouve, en effet, 3 systèmes homologues à BceRSAB chez *B. licheniformis* (tableau 5), *B. halodurans* et *S. aureus*, et 1 chez *S. mutans* (tableau 5). Pour la plupart d'entre eux l'antibiotique par lequel ils sont potentiellement activés est inconnu. De manière intéressante, le système BceRSAB de *B. subtilis* est plus similaire aux systèmes hétérologues YtsABCD et BH3911,12,13,14 respectivement de *B. licheniformis* et *B. halodurans* qu'aux systèmes orthologues YvcPQRS et YxdJKLM de *B. subtilis*. Ceci suggère fortement que les systèmes YtsABCD de *B. licheniformis* et BH3911,12,13,14 de *B. halodurans* participent également à la résistance à la bacitracine. Nous pourrions donc, tout d'abord, tester l'implication de ces systèmes hétérologues dans la résistance à la bacitracine chez ces bactéries voisines de *B. subtilis*. Dans un deuxième temps, nous utiliserions ces systèmes hétérologues activés (potentiellement) par le même antibiotique pour construire des systèmes chimériques (phosphorelais de *B. subtilis* avec le transporteur ABC de *B. halodurans*) et tester leur capacité à répondre à cet antibiotique. Les interactions protéines/protéines étant souvent très spécifique, l'activation du système chimérique supposerait ainsi qu'il n'y ait pas d'interaction directe entre les différents partenaires de ce type de système (pouvant confirmer notamment les expériences de cross-link, voir plus haut).

Les caractéristiques topologiques des senseurs de type BceS (boucle extracytoplasmique très courte) et leurs couplages fréquents aux transporteurs ABC de la sous-famille 9 ont conduit Mascher, T. à nommer tous les senseurs homologues à BceS

« BceS-like » (Mascher, 2006). Comme nous avons pu également l'observer par analyse bioinformatique, la quasi-totalité des senseurs « BceS-like » est trouvée chez les Firmicutes et leurs gènes sont fréquemment à proximité de gènes codant un transporteur ABC de la sous-famille 9 et un régulateur de réponse de la famille OmpR. Notre hypothèse de recherche future est que tous ces systèmes phosphorelais « BceS-like » / ABC sont des systèmes de résistances aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne et dont le mécanisme d'activation implique la participation indispensable du transporteur ABC.

Nos résultats complémentaires concernant l'activation du système orthologue YvcPQRS de *B. subtilis* par l'enduracidine, un inducteur gratuit, montrent que le transporteur YvcRS participe également à cette activation. Notre hypothèse est que le véritable antibiotique contre lequel est dirigé YvcPQRS est de la famille des lipoglycopeptides, comme l'enduracidine. Nous pourrions tester si des souches mutées sur le système YvcPQRS sont sensibles notamment aux ramoplanines ou à la janiemycine, qui sont d'autres antibiotiques depsipeptidiques. L'autre système orthologue de *B. subtilis*, nommé YxdJKLM, est induit par le peptide antimicrobien LL-37. Il faudrait vérifier que le transporteur YxdLM participe également à l'activation de ses propres gènes de structure. Cependant, le LL-37 est également un inducteur gratuit car le système YxdJKLM ne confère pas de résistance à cet antibiotique (Pietiainen *et al.*, 2005). Le LL-37 appartient à la famille des peptides cationiques de type cathélicidines. Nous pourrions donc rechercher l'antibiotique contre lequel le système YxdJKLM est dirigé dans cette famille d'antibiotiques. D'autre part, ce système présente la particularité d'avoir un gène additionnel, *yxeA*, en opéron avec les gènes codant le transporteur ABC. Le peptide YxeA est supposé être sécrété par la voie de sécrétion sec-dépendante et nous pouvons supposer qu'il constitue l'inhibiteur d'un antibiotique de type cathélicidine. Nous pourrions étiqueter la protéine YxeA pour tester sa sécrétion puis tester son action inhibitrice sur la cathélicidine qui pourrait être identifiée comme cible du système YxdJKLM.



Notre étude a mis en évidence l'existence d'un nouveau type de mécanisme de résistance couplant directement détection et efflux, constituant des unités de détoxification efficace chez tous les Firmicutes. Une souche de *B. subtilis* délétée de l'ensemble des gènes des loci *yvc*, *yxd* et *bce* pourraient être utilisée comme réceptrice de systèmes hétérologues afin, premièrement, d'en identifier rapidement les inducteurs physiologiques et, deuxièmement, de montrer que l'activation de ces systèmes impliquent la présence du transporteur ABC. Ceci pourrait conduire à l'identification de nouvelles résistances chez de nombreuses bactéries pathogènes du groupe des Firmicutes. Stephenson et Hoch mettent en exergue le fait que les phosphorelais, systèmes non trouvés chez l'homme, constituent des cibles judicieuses pour le développement de nouveaux antibiotiques non toxique pour l'homme (Stephenson and Hoch, 2002). La poursuite de notre étude pourrait montrer que de nombreux systèmes de résistance dépendent directement de ces phosphorelais. Ainsi, le développement d'inhibiteurs de ces phosphorelais pourrait permettre la réutilisation de certains antibiotiques très peu employés aujourd'hui à cause de ces résistances.

# Références Bibliographiques

- Abee, T., Klaenhammer, T.R., and Letellier, L. (1994) Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1006-1013.
- Akbar, S., and Price, C.W. (1996) Isolation and characterization of *csbB*, a gene controlled by *Bacillus subtilis* general stress transcription factor sigma B. *Gene* **177**: 123-128.
- Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C.L., Callewaert, N., Valvano, M.A., Feldman, M.F., and Aebi, M. (2006) Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *Embo J* **25**: 967-976.
- Allen, N.E., and Nicas, T.I. (2003) Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 511-532.
- Alm, E., Huang, K., and Arkin, A. (2006) The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comput Biol* **2**: e143.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., and Bierbaum, G. (2000) Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2565-2571.
- Ames, G.F., Mimura, C.S., and Shyamala, V. (1990) Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol Rev* **6**: 429-446.
- Andersen, S.R., and Sandaa, R.A. (1994) Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **60**: 908-912.
- Archibald, A.R., Hancock, I.C., and Harwood, C.R. (1993) Cell wall structure, synthesis and turnover. In *Bacillus subtilis and Other Gram Positive Bacteria*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 381-410.
- Archibald, L., Phillips, L., Monnet, D., McGowan, J.E., Jr., Tenover, F., and Gaynes, R. (1997) Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* **24**: 211-215.
- Armstrong, R.N. (2000) Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* **39**: 13625-13632.
- Arthur, M., and Quintiliani, R., Jr. (2001) Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 375-381.
- Axelsson, L., and Holck, A. (1995) The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Bacteriol* **177**: 2125-2137.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., and Campos-Takaki, G.M. (1993) Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* **42**: 1-7.
- Baba, T., and Schneewind, O. (1998) Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends Microbiol* **6**: 66-71.
- Babic, M., Hujer, A.M., and Bonomo, R.A. (2006) What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* **9**: 142-156.
- Bachhawat, P., Swapna, G.V., Montelione, G.T., and Stock, A.M. (2005) Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure* **13**: 1353-1363.
- Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le Moual, H., and Miller, S.I. (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**: 461-472.
- Baquero, F. (1995) Pneumococcal resistance to beta-lactam antibiotics: a global geographic overview. *Microb Drug Resist* **1**: 115-120.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.

- Bern, M., and Goldberg, D. (2005) Automatic selection of representative proteins for bacterial phylogeny. *BMC Evol Biol* **5**: 34.
- Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M., and Denizot, F. (2003) YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **228**: 93-97.
- Bernat, B.A., Laughlin, L.T., and Armstrong, R.N. (1999) Elucidation of a monovalent cation dependence and characterization of the divalent cation binding site of the fosfomycin resistance protein (FosA). *Biochemistry* **38**: 7462-7469.
- Bierbaum, G., and Sahl, H.G. (1985) Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol* **141**: 249-254.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., and Simon, M.I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-141.
- Bishop, R.E., Gibbons, H.S., Guina, T., Trent, M.S., Miller, S.I., and Raetz, C.R. (2000) Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *Embo J* **19**: 5071-5080.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Blight, M.A., Pimenta, A.L., Lazzaroni, J.C., Dando, C., Kotelevets, L., Seror, S.J., and Holland, I.B. (1994) Identification and preliminary characterization of temperature-sensitive mutations affecting HlyB, the translocator required for the secretion of haemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **245**: 431-440.
- Bohnenberger, E., and Sandermann, H., Jr. (1976) Dephosphorylation of C55-isoprenylmonophosphate by non-specific phosphatases. *FEBS Lett* **67**: 85-89.
- Bokarewa, M.I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 504-509.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**: 731-753.
- Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**: 61-92.
- Bonnet, M., Rafi, M.M., Chikindas, M.L., and Montville, T.J. (2006) Bioenergetic mechanism for nisin resistance, induced by the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2556-2563.
- Bourgault, A.M., Lamothe, F., Loo, V.G., and Poirier, L. (2006) In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3473-3475.
- Braibant, M., Gilot, P., and Content, J. (2000) The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 449-467.
- Brandish, P.E., Kimura, K.I., Inukai, M., Southgate, R., Lonsdale, J.T., and Bugg, T.D. (1996) Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1640-1644.
- Braun, V. (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **415**: 335-377.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H., and de Kruijff, B. (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **286**: 2361-2364.
- Bridges, B.A. (2001) Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 29-39.

- Brotz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P.E., and Sahl, H.G. (1997) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem* **246**: 193-199.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., and Sahl, H.G. (1998) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 154-160.
- Buckler, D.R., Anand, G.S., and Stock, A.M. (2000) Response-regulator phosphorylation and activation: a two-way street? *Trends Microbiol* **8**: 153-156.
- Bugg, T.D., Wright, G.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., and Walsh, C.T. (1991) Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* **30**: 10408-10415.
- Bupp, K., and van Heijenoort, J. (1993) The final step of peptidoglycan subunit assembly in *Escherichia coli* occurs in the cytoplasm. *J Bacteriol* **175**: 1841-1843.
- Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1211-1233.
- Caceres, N.E., Harris, N.B., Wellehan, J.F., Feng, Z., Kapur, V., and Barletta, R.G. (1997) Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **179**: 5046-5055.
- Cain, B.D., Norton, P.J., Eubanks, W., Nick, H.S., and Allen, C.M. (1993) Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 3784-3789.
- Cao, M., Bernat, B.A., Wang, Z., Armstrong, R.N., and Helmann, J.D. (2001) FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 2380-2383.
- Cao, M., and Helmann, J.D. (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* *bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. *J Bacteriol* **184**: 6123-6129.
- Cao, M., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Wu, M.F., Paddon, C., and Helmann, J.D. (2002a) Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* **316**: 443-457.
- Cao, M., Wang, T., Ye, R., and Helmann, J.D. (2002b) Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons. *Mol Microbiol* **45**: 1267-1276.
- Cao, M., Salzberg, L., Tsai, C.S., Mascher, T., Bonilla, C., Wang, T., Ye, R.W., Marquez-Magana, L., and Helmann, J.D. (2003) Regulation of the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function protein sigma(Y) and its target promoters. *J Bacteriol* **185**: 4883-4890.
- Cao, M., and Helmann, J.D. (2004) The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigmaX factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **186**: 1136-1146.
- Carballido-Lopez, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S.D., Noirot, P., and Errington, J. (2006) Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell* **11**: 399-409.
- Cars, O., Molstad, S., and Melander, A. (2001) Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet* **357**: 1851-1853.

- Cetinkaya, Y., Falk, P., and Mayhall, C.G. (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* **13**: 686-707.
- Chalker, A.F., Ingraham, K.A., Lunsford, R.D., Bryant, A.P., Bryant, J., Wallis, N.G., Broskey, J.P., Pearson, S.C., and Holmes, D.J. (2000) The *bacA* gene, which determines bacitracin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, is also required for virulence. *Microbiology* **146** ( Pt 7): 1547-1553.
- Chambers, H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **10**: 781-791.
- Chen, C.L., Chang, L.K., Chang, Y.S., Liu, S.T., and Tschen, J.S. (1995) Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **248**: 121-125.
- Chen, X., Ansai, T., Awano, S., Iida, T., Barik, S., and Takehara, T. (1999) Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. *J Bacteriol* **181**: 7107-7114.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., and Montville, T.J. (1997) Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol* **63**: 524-531.
- Chen, Y., Delmas, J., Siro, J., Shoichet, B., and Bonnet, R. (2005) Atomic resolution structures of CTX-M beta-lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol* **348**: 349-362.
- Cherry, J.M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S.A., Dwight, S.S., Hester, E.T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S., and Botstein, D. (1998) SGD: *Saccharomyces Genome Database*. *Nucleic Acids Res* **26**: 73-79.
- Chiapello, H., Bourgait, I., Sourivong, F., Heuclin, G., Gendrault-Jacquemard, A., Petit, M.A., and El Karoui, M. (2005) Systematic determination of the mosaic structure of bacterial genomes: species backbone versus strain-specific loops. *BMC Bioinformatics* **6**: 171.
- Clewell, D.B., Flanagan, S.E., and Jaworski, D.D. (1995) Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* **3**: 229-236.
- Comenge, Y., Quintiliani, R., Jr., Li, L., Dubost, L., Brouard, J.P., Hugonnet, J.E., and Arthur, M. (2003) The CroRS two-component regulatory system is required for intrinsic beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **185**: 7184-7192.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., and van Sinderen, D. (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **8**: 821-831.
- Cudic, P., Kranz, J.K., Behenna, D.C., Kruger, R.G., Tadesse, H., Wand, A.J., Veklich, Y.I., Weisel, J.W., and McCafferty, D.G. (2002) Complexation of peptidoglycan intermediates by the lipoglycopeptide antibiotic ramoplanin: minimal structural requirements for intermolecular complexation and fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7384-7389.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., and Hechard, Y. (2001) A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* **147**: 3263-3269.
- Daniel, R.A., Drake, S., Buchanan, C.E., Scholle, R., and Errington, J. (1994) The *Bacillus subtilis* *spoVD* gene encodes a mother-cell-specific penicillin-binding protein required for spore morphogenesis. *J Mol Biol* **235**: 209-220.
- Davidson, A.L., and Sharma, S. (1997) Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 5458-5464.
- D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**: 374-377.

- de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., van Alen-Boerrigter, I., and de Vos, W.M. (1996) Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **178**: 3434-3439.
- de Vos, W.M., Kuipers, O.P., van der Meer, J.R., and Siezen, R.J. (1995) Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **17**: 427-437.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., and Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 159-184.
- Demchick, P., and Koch, A.L. (1996) The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 768-773.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., and Nes, I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol* **178**: 4472-4483.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I.F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2384-2389.
- Dmitriev, B., Toukach, F., and Ehlers, S. (2005) Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol* **13**: 569-574.
- Dong, J., Lai, R., Nielsen, K., Fekete, C.A., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G. (2004) The essential ATP-binding cassette protein RL11 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* **279**: 42157-42168.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J.M., and Spratt, B.G. (1989) Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8842-8846.
- Dowson, C.G., Coffey, T.J., and Spratt, B.G. (1994) Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* **2**: 361-366.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**: 1667-1686.
- Drapeau, G., Petitclerc, E., Toulouse, A., and Marceau, F. (1992) Dissociation of the antimicrobial activity of bacitracin USP from its renovascular effects. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 955-961.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., and Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13294-13299.
- Durr, M., and Peschel, A. (2002) Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun* **70**: 6515-6517.
- Eder, S., Liu, W., and Hulett, F.M. (1999) Mutational analysis of the *phoD* promoter in *Bacillus subtilis*: implications for PhoP binding and promoter activation of Pho regulon promoters. *J Bacteriol* **181**: 2017-2025.
- Ehrenstein, G., and Lecar, H. (1977) Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **10**: 1-34.
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004) The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem* **279**: 30106-30113.

- El Ghachi, M., Derbise, A., Bouhss, A., and Mengin-Lecreulx, D. (2005) Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 18689-18695.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 85-106.
- Eppelmann, K., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **276**: 34824-34831.
- Epperson, J.D., and Ming, L.J. (2000) Proton NMR studies of Co(II) complexes of the peptide antibiotic bacitracin and analogues: insight into structure-activity relationship. *Biochemistry* **39**: 4037-4045.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M., and Miller, S.I. (1999) Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**: 1561-1565.
- Fabret, C., Feher, V.A., and Hoch, J.A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**: 1975-1983.
- Feng, Z., and Barletta, R.G. (2003) Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 283-291.
- Figenschou, K.J., Froholm, L.O., and Laland, S.G. (1967) Studies on the biosynthesis of gramicidin S in a cell-free system from *Bacillus brevis*. Further attempts to elucidate its mechanism of synthesis. *Biochem J* **105**: 451-453.
- Fillgrove, K.L., Pakhomova, S., Newcomer, M.E., and Armstrong, R.N. (2003) Mechanistic diversity of fosfomycin resistance in pathogenic microorganisms. *J Am Chem Soc* **125**: 15730-15731.
- Fischer, W., and Leopold, K. (1999) Polar lipids of four *Listeria* species containing L-lysylcardiolipin, a novel lipid structure, and other unique phospholipids. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 653-662.
- Fontana, R., Grossato, A., Rossi, L., Cheng, Y.R., and Satta, G. (1985) Transition from resistance to hypersusceptibility to beta-lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **28**: 678-683.
- Foster, S.J., and Popham, D.L. (2002) Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. In *Bacillus subtilis and its closest relatives*. Sonenshein, A.L. (ed). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 21-41.
- Freeman, J.A., and Bassler, B.L. (1999) Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **181**: 899-906.
- Freymond, P.P., Lazarevic, V., Soldo, B., and Karamata, D. (2006) Poly(glucosyl-N-acetylgalactosamine 1-phosphate), a wall teichoic acid of *Bacillus subtilis* 168: its biosynthetic pathway and mode of attachment to peptidoglycan. *Microbiology* **152**: 1709-1718.
- Frick, I.M., Akesson, P., Rasmussen, M., Schmidtchen, A., and Bjorck, L. (2003) SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem* **278**: 16561-16566.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis. Washington DC: ASM Press.
- Froyshov, O., and Laland, S.G. (1974) On the biosynthesis of bacitracin by a soluble enzyme complex from *Bacillus licheniformis*. *Eur J Biochem* **46**: 235-242.
- Fujihashi, M., Zhang, Y.W., Higuchi, Y., Li, X.Y., Koyama, T., and Miki, K. (2001) Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4337-4342.



- Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frere, J.M., and Dideberg, O. (2005a) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol* **345**: 785-795.
- Garau, G., Di Guilmi, A.M., and Hall, B.G. (2005b) Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2778-2784.
- Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C., and Groisman, E.A. (1996) Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of Salmonella virulence. *Cell* **84**: 165-174.
- Garcia-Castellanos, R., Marrero, A., Mallorqui-Fernandez, G., Potempa, J., Coll, M., and Gomis-Ruth, F.X. (2003) Three-dimensional structure of MecI. Molecular basis for transcriptional regulation of staphylococcal methicillin resistance. *J Biol Chem* **278**: 39897-39905.
- Gardete, S., Wu, S.W., Gill, S., and Tomasz, A. (2006) Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3424-3434.
- Garrido, M.C., Herrero, M., Kolter, R., and Moreno, F. (1988) The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *Embo J* **7**: 1853-1862.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., and Shai, Y. (1995) Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**: 11479-11488.
- Ge, M., Chen, Z., Onishi, H.R., Kohler, J., Silver, L.L., Kerns, R., Fukuzawa, S., Thompson, C., and Kahne, D. (1999) Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala. *Science* **284**: 507-511.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T., and Tomizawa, J.I. (1977) Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 4772-4776.
- Giyanto, Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003) The *Bacillus subtilis* YvcRS transporter is induced by a peptide antibiotic through the action of the YvcPQ two component system. In *12th International Conference on Bacilli* Baveno, Italia.
- Goffin, C., Fraipont, C., Ayala, J., Terrak, M., Nguyen-Disteche, M., and Ghuysen, J.M. (1996) The non-penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded structure. *J Bacteriol* **178**: 5402-5409.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.M. (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1079-1093.
- Gold, H.S., and Moellering, R.C., Jr. (1996) Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* **335**: 1445-1453.
- Goldman, R., and Strominger, J.L. (1972) Purification and properties of C 55 - isoprenylpyrophosphate phosphatase from Micrococcus lysodeikticus. *J Biol Chem* **247**: 5116-5122.
- Golemi-Kotra, D., Meroueh, S.O., Kim, C., Vakulenko, S.B., Bulychev, A., Stemmler, A.J., Stemmler, T.L., and Mobashery, S. (2004) The importance of a critical protonation state and the fate of the catalytic steps in class A beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *J Biol Chem* **279**: 34665-34673.
- Gootz, T.D. (2004) Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2**: 317-327.
- Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427.
- Gotz, A., and Smalla, K. (1997) Manure Enhances Plasmid Mobilization and Survival of Pseudomonas putida Introduced into Field Soil. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1980-1986.

- Govaerts, C., Li, C., Orwa, J., Van Schepdael, A., Adams, E., Roets, E., and Hoogmartens, J. (2003) Sequencing of bacitracin A and related minor components by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**: 1366-1379.
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jansch, L., Hechard, Y., Hastings, J.W., and Knochel, S. (2002) High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **148**: 2361-2369.
- Grebe, T.W., and Stock, J.B. (1999) The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**: 139-227.
- Groisman, E.A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M., Lipps, C.J., and Heffron, F. (1992) Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11939-11943.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Grubner, T., Sharp, M., Tupy, J., and Young, B. (1998) The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. In *Symp. Quant. Biol.* Vol. 63. Harbor, C.S. (ed). New-York, pp. 141-155.
- Gross, E., and Morell, J.L. (1971) The structure of nisin. *J Am Chem Soc* **93**: 4634-4635.
- Guder, A., Schmitter, T., Wiedemann, I., Sahl, H.G., and Bierbaum, G. (2002) Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity. *Appl Environ Microbiol* **68**: 106-113.
- Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M., and Miller, S.I. (2000) A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **182**: 4077-4086.
- Gunn, J.S., Lim, K.B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., and Miller, S.I. (1998) PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* **27**: 1171-1182.
- Guo, L., Lim, K.B., Poduje, C.M., Daniel, M., Gunn, J.S., Hackett, M., and Miller, S.I. (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**: 189-198.
- Gusa, A.A., Gao, J., Stringer, V., Churchward, G., and Scott, J.R. (2006) Phosphorylation of the group A Streptococcal CovR response regulator causes dimerization and promoter-specific recruitment by RNA polymerase. *J Bacteriol* **188**: 4620-4626.
- Gutmann, L., Al-Obeid, S., Billot-Klein, D., Ebnet, E., and Fischer, W. (1996) Penicillin tolerance and modification of lipoteichoic acid associated with expression of vancomycin resistance in VanB-type *Enterococcus faecium* D366. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 257-259.
- Haavik, H.I., and Froyshov, O. (1975) Function of peptide antibiotics in producer organisms. *Nature* **254**: 79-82.
- Hakenbeck, R. (1995) Target-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Biochem Pharmacol* **50**: 1121-1127.
- Hakenbeck, R., Grebe, T., Zahner, D., and Stock, J.B. (1999) beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* **33**: 673-678.
- Hall, R.M. (1997) Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp* **207**: 192-202.
- Hancock, R., and Fitz-James, P.C. (1964) Some differences in the action of penicillin, bacitracin, and vancomycin on *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* **87**: 1044-1050.
- Hancock, R.E. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* **349**: 418-422.
- Hancock, R.E., and Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1317-1323.

- Hanover, J.A., and Lennarz, W.J. (1979) The topological orientation of N,N'-diacetylchitobiosylpyrophosphoryldolichol in artificial and natural membranes. *J Biol Chem* **254**: 9237-9246.
- Harel, Y.M., Bailone, A., and Bibi, E. (1999) Resistance to bacitracin as modulated by an Escherichia coli homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from Bacillus licheniformis. *J Bacteriol* **181**: 6176-6178.
- Harrington, C.R., and Baddiley, J. (1983) Peptidoglycan synthesis by partly autolyzed cells of Bacillus subtilis W23. *J Bacteriol* **155**: 776-792.
- Heaton, M.P., and Neuhaus, F.C. (1994) Role of the D-alanyl carrier protein in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid. *J Bacteriol* **176**: 681-690.
- Hechard, Y., and Sahl, H.G. (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**: 545-557.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.
- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N., and Simon, M.I. (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**: 79-87.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Higgins, C.F., and Gottesman, M.M. (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**: 18-21.
- Higgins, C.F., and Linton, K.J. (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 918-926.
- Hoch, J.A., and Silhavy, T.J. (1995) Two-component signal transduction. In *ASM Press* Washington D.C.
- Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**: 165-170.
- Holtje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 181-203.
- Hong, H.J., Paget, M.S., and Buttner, M.J. (2002) A signal transduction system in Streptomyces coelicolor that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Mol Microbiol* **44**: 1199-1211.
- Hopfner, K.P., and Tainer, J.A. (2003) Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 249-255.
- Horsburgh, M.J., and Moir, A. (1999) Sigma M, an ECF RNA polymerase sigma factor of Bacillus subtilis 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol Microbiol* **32**: 41-50.
- Horsburgh, M.J., Thackray, P.D., and Moir, A. (2001) Transcriptional responses during outgrowth of Bacillus subtilis endospores. *Microbiology* **147**: 2933-2941.
- Huang, H.W. (2000) Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* **39**: 8347-8352.
- Huang, X., Fredrick, K.L., and Helmann, J.D. (1998) Promoter recognition by Bacillus subtilis sigmaW: autoregulation and partial overlap with the sigmaX regulon. *J Bacteriol* **180**: 3765-3770.
- Huang, X., and Helmann, J.D. (1998) Identification of target promoters for the Bacillus subtilis sigma X factor using a consensus-directed search. *J Mol Biol* **279**: 165-173.
- Huang, X., Gaballa, A., Cao, M., and Helmann, J.D. (1999) Identification of target promoters for the Bacillus subtilis extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol Microbiol* **31**: 361-371.
- Huhne, K., Axelsson, L., Holck, A., and Krockel, L. (1996) Analysis of the sakacin P gene cluster from Lactobacillus sake Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains. *Microbiology* **142 ( Pt 6)**: 1437-1448.

- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., and Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**: 703-707.
- Hunke, S., Landmesser, H., and Schneider, E. (2000) Novel missense mutations that affect the transport function of MalK, the ATP-binding-cassette subunit of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium maltose transport system. *J Bacteriol* **182**: 1432-1436.
- Hutchings, M.I., Hong, H.J., and Buttner, M.J. (2006) The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **59**: 923-935.
- Icho, T., and Raetz, C.R. (1983) Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J Bacteriol* **153**: 722-730.
- Islam, D., Bandholtz, L., Nilsson, J., Wigzell, H., Christensson, B., Agerberth, B., and Gudmundsson, G. (2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* **7**: 180-185.
- Isono, F., and Inukai, M. (1991) Mureidomycin A, a new inhibitor of bacterial peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 234-236.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., and Ray, B. (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* **59**: 171-200.
- Jacobs, C., Frere, J.M., and Normark, S. (1997) Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88**: 823-832.
- Jacoby, G.A., and Archer, G.L. (1991) New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med* **324**: 601-612.
- Jacoby, G.A., Mills, D.M., and Chow, N. (2004) Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3203-3206.
- Jevons, M.P., Coe, A.W., and Parker, M.T. (1963) Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* **1**: 904-907.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A. (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* **172**: 1169-1176.
- Johnson, B.A., Anker, H., and Meleney, F.L. (1945) Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102**: 376-377.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Jones, R.N., Marshall, S.A., Pfaller, M.A., Wilke, W.W., Hollis, R.J., Erwin, M.E., Edmond, M.B., and Wenzel, R.P. (1997) Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* **29**: 95-102.
- Joseph, P. (2002) Relations entre systèmes à deux composants et transporteurs ABC chez *Bacillus subtilis*. In *Thèse de Doctorat* Marseille.
- Joseph, P., Fichant, G., Quentin, Y., and Denizot, F. (2002) Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 503-513.
- Joseph, P., Guiseppi, A., Sorokin, A., and Denizot, F. (2004) Characterization of the *Bacillus subtilis* YxdJ response regulator as the inducer of expression for the cognate ABC transporter YxdLM. *Microbiology* **150**: 2609-2617.

- Josephine, H.R., Charlier, P., Davies, C., Nicholas, R.A., and Pratt, R.F. (2006) Reactivity of Penicillin-Binding Proteins with Peptidoglycan-Mimetic beta-Lactams: What's Wrong with These Enzymes? *Biochemistry* **45**: 15873-15883.
- Jourlin, C., Bengrine, A., Chippaux, M., and Mejean, V. (1996) An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 1297-1306.
- Jung, G. (1991) Nisin and novel lantibiotics: proceedings of the first international work-shop on lantibiotics. Leiden, The Netherlands: ESCOM, pp. 1-34.
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., and Kropp, H. (1974) The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* **235**: 364-386.
- Kallipolitis, B.H., Ingmer, H., Gahan, C.G., Hill, C., and Sogaard-Andersen, L. (2003) CesRK, a two-component signal transduction system in *Listeria monocytogenes*, responds to the presence of cell wall-acting antibiotics and affects beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3421-3429.
- Kanof, N.B. (1970) Bacitracin and tyrothricin. *Med Clin North Am* **54**: 1291-1293.
- Kasahara, M., Nakata, A., and Shinagawa, H. (1991) Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* *phoN* gene, which encodes nonspecific acid phosphatase. *J Bacteriol* **173**: 6760-6765.
- Kato, J., Fujisaki, S., Nakajima, K., Nishimura, Y., Sato, M., and Nakano, A. (1999) The *Escherichia coli* homologue of yeast RER2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. *J Bacteriol* **181**: 2733-2738.
- Kerr, I.D., Reynolds, E.D., and Cove, J.H. (2005) ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochem Soc Trans* **33**: 1000-1002.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., and de Vos, W.M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**: 895-904.
- Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Stiles, M.E., and Quadri, L.E. (2001) A two-component signal-transduction cascade in *Carnobacterium piscicola* LV17B: two signaling peptides and one sensor-transmitter. *Peptides* **22**: 1597-1601.
- Kleerebezem, M. (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **25**: 1405-1414.
- Klein, C., and Entian, K.D. (1994) Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2793-2801.
- Koch, A.L. (1991) Effective growth by the simplest means: the bacterial way. In *ASM news*. Vol. 57, pp. 633-637.
- Koch, A.L. (1995) Bacterial growth and form. In *Chapman and Hall*. Chapman and Hall (eds). New-York, pp. 423.
- Koch, A.L. (1998) Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**: 689-701.
- Koch, A.L. (2003) Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clin Microbiol Rev* **16**: 673-687.
- Konz, D., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (1999) Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J Bacteriol* **181**: 133-140.
- Konz, D., and Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **6**: R39-48.
- Korat, B., Mottl, H., and Keck, W. (1991) Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the *dacB* gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Mol Microbiol* **5**: 675-684.

- Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P.V., Rosenberg, M., and Brown, J.R. (2000) Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol* **17**: 1956-1970.
- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I., and Koronakis, V. (1995) Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol Microbiol* **16**: 87-96.
- Kovacs, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., and Bruckner, R. (2006) A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**: 5797-5805.
- Kramer, N.E., van Hijum, S.A., Knol, J., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2006) Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1753-1761.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., and et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kupferwasser, L.I., Skurray, R.A., Brown, M.H., Firth, N., Yeaman, M.R., and Bayer, A.S. (1999) Plasmid-mediated resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in staphylococci: role of the *qacA* locus. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2395-2399.
- Kuroda, M., Kuwahara-Arai, K., and Hiramatsu, K. (2000) Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 485-490.
- Kwon, D.H., and Lu, C.D. (2006) Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1615-1622.
- Labischinski, H., Barnickel, G., Naumann, D., and Keller, P. (1985) Conformational and topological aspects of the three-dimensional architecture of bacterial peptidoglycan. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **136A**: 45-50.
- Labischinski, H., and Johannsen, L. (1986) On the relationships between conformational and biological properties of murein. In *Biological properties of peptidoglycan*. Seidl, P.H. and Schleifer, K.H. (eds). Berlin: Walter de Gruyter, pp. 37-42.
- Labischinski, H., and Maidhof, H. (1994) Bacterial peptidoglycan: overview and evolving concepts. In *Bacterial Cell Wall*. Ghuyssen, J.M. and Hakenbeck, R. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 23-38.
- Lage, H. (2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 188-199.
- Lambert, M.P., and Neuhaus, F.C. (1972) Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J Bacteriol* **110**: 978-987.
- Lawrence, P.J., and Strominger, J.L. (1970) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XVI. The reversible fixation of radioactive penicillin G to the D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **245**: 3660-3666.
- Lazarevic, V., Margot, P., Soldo, B., and Karamata, D. (1992) Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* *lytRABC* divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J Gen Microbiol* **138**: 1949-1961.
- Lazazzera, B.A., and Grossman, A.D. (1998) The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* **6**: 288-294.

- Lazazzera, B.A., Kurtser, I.G., McQuade, R.S., and Grossman, A.D. (1999) An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 5193-5200.
- Leaver, M., and Errington, J. (2005) Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **57**: 1196-1209.
- Lei, K.J., Shelly, L.L., Pan, C.J., Sidbury, J.B., and Chou, J.Y. (1993) Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* **262**: 580-583.
- Levy, S.B. (1992) *Antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*: Plenum Publishing Corporation.
- Levy, S.B., and Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* **10**: S122-129.
- Lewis, K., Salyers, A., Taber, H., and Wax, R. (2002) *Bacterial resistance to antimicrobials: mechanisms, genetics, medical practice and public health*. New-York: Marcel Dekker.
- Li, Q., Sherwood, J.S., and Logue, C.M. (2007) Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. *Lett Appl Microbiol* **44**: 86-91.
- Linden, P.K., and Miller, C.B. (1999) Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* **33**: 113-120.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**: 5-13.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (2006) Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch*.
- Lis, M., and Kuramitsu, H.K. (2003) The stress-responsive *dgk* gene from *Streptococcus mutans* encodes a putative undecaprenol kinase activity. *Infect Immun* **71**: 1938-1943.
- Liu, P., Mehn, M.P., Yan, F., Zhao, Z., Que, L., Jr., and Liu, H.W. (2004) Oxygenase activity in the self-hydroxylation of (s)-2-hydroxypropylphosphonic acid epoxidase involved in fosfomycin biosynthesis. *J Am Chem Soc* **126**: 10306-10312.
- Livermore, D.M. (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**: 557-584.
- Livermore, D.M. (2003) Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* **36**: S11-23.
- Lo, M.C., Men, H., Branstrom, A., Helm, J., Yao, N., Goldman, R., and Walker, S. (2000) A new mechanism of action proposed for ramoplanin. *Journal of American Chemical Society* **122**: 3540-3541.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-3849.
- Lorenz, M.G., and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**: 563-602.
- Ludwig, W., and Klenk, H.-P. (2001) Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. (eds). New York: Springer, pp. 49-65.
- Lynch, A.S., and Lin, E.C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**: 6238-6249.
- Lyon, B.R., and Skurray, R. (1987) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* **51**: 88-134.
- Machaidze, G., and Seelig, J. (2003) Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments. *Biochemistry* **42**: 12570-12576.
- Mainardi, J.L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.E., Dubost, L., Brouard, J.P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L., and Arthur, M. (2005) A novel peptidoglycan cross-linking

- enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J Biol Chem* **280**: 38146-38152.
- Manciu, L., Chang, X.B., Buyse, F., Hou, Y.X., Gustot, A., Riordan, J.R., and Ruyschaert, J.M. (2003) Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem* **278**: 3347-3356.
- Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M.C., Mollet, B., and Poolman, B. (1997) Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem* **272**: 14277-14284.
- Maris, A.E., Walther, D., Mattison, K., Byers, N., and Kenney, L.J. (2005) The response regulator OmpR oligomerizes via beta-sheets to form head-to-head dimers. *J Mol Biol* **350**: 843-856.
- Marshall, C.G., Lessard, I.A., Park, I., and Wright, G.D. (1998) Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2215-2220.
- Martinez-Hackert, E., and Stock, A.M. (1997) The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure* **5**: 109-124.
- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2003) Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* **50**: 1591-1604.
- Mascher, T. (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 133-144.
- Mascher, T., Heintz, M., Zahner, D., Merai, M., and Hakenbeck, R. (2006a) The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and by mutations in *pbp2x* involved in beta-lactam resistance. *J Bacteriol* **188**: 1959-1968.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006b) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 910-938.
- Massova, I., and Mobashery, S. (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1-17.
- Matsuzaki, K. (2001) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? *Biochem Soc Trans* **29**: 598-601.
- McCafferty, D.G., Cudic, P., Yu, M.K., Behenna, D.C., and Kruger, R. (1999) Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 672-680.
- McCafferty, D.G., Cudic, P., Frankel, B.A., Barkallah, S., Kruger, R.G., and Li, W. (2002) Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics. *Biopolymers* **66**: 261-284.
- McCallum, N., Spehar, G., Bischoff, M., and Berger-Bachi, B. (2006) Strain dependence of the cell wall-damage induced stimulon in *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 1475-1481.
- McCloskey, M.A., and Troy, F.A. (1980) Paramagnetic isoprenoid carrier lipids. 2. Dispersion and dynamics in lipid membranes. *Biochemistry* **19**: 2061-2066.
- McCoy, A.J., Liu, H., Falla, T.J., and Gunn, J.S. (2001) Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2030-2037.
- McGowan, L.L., Jackson, C.R., Barrett, J.B., Hiott, L.M., and Fedorka-Cray, P.J. (2006) Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot* **69**: 2976-2982.
- Mendoza, D., Schujman, G.E., and Aguilar, P.S. (2002) Biosynthesis and function of membrane lipids. In *Bacillus subtilis and its closest relatives*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 43-55.



- Meroueh, S.O., Fisher, J.F., Schlegel, H.B., and Mobashery, S. (2005) Ab initio QM/MM study of class A beta-lactamase acylation: dual participation of Glu166 and Lys73 in a concerted base promotion of Ser70. *J Am Chem Soc* **127**: 15397-15407.
- Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L., and Mobashery, S. (2006) Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4404-4409.
- Meyer, W., and Schafer, G. (1992) Characterization and purification of a membrane-bound archaeobacterial pyrophosphatase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem* **207**: 741-746.
- Miller, S.I., Pulkkinen, W.S., Selsted, M.E., and Mekalanos, J.J. (1990) Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **58**: 3706-3710.
- Ming, L.J., and Epperson, J.D. (2002) Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem* **91**: 46-58.
- Missiakas, D., and Raina, S. (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* **28**: 1059-1066.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Mohr, H., and Kleinkauf, H. (1978) Alamethicin biosynthesis: acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochim Biophys Acta* **526**: 375-386.
- Mondy, K.E., Shannon, W., and Mundy, L.M. (2001) Evaluation of zinc bacitracin capsules versus placebo for enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* **33**: 473-476.
- Mongodin, E., Finan, J., Climo, M.W., Rosato, A., Gill, S., and Archer, G.L. (2003) Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* **185**: 4638-4643.
- Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**: 6843-6850.
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2000) *NorM* of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na<sup>(+)</sup>-driven multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **182**: 6694-6697.
- Mosberg, H.I., Scogin, D.A., Storm, D.R., and Gennis, R.B. (1980) Proton nuclear magnetic resonance studies on bacitracin A and its interaction with zinc ion. *Biochemistry* **19**: 3353-3357.
- Munoz, R., Coffey, T.J., Daniels, M., Dowson, C.G., Laible, G., Casal, J., Hakenbeck, R., Jacobs, M., Musser, J.M., Spratt, B.G., and et al. (1991) Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **164**: 302-306.
- Munoz, R., Dowson, C.G., Daniels, M., Coffey, T.J., Martin, C., Hakenbeck, R., and Spratt, B.G. (1992) Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **6**: 2461-2465.
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. (2003) SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *Embo J* **22**: 427-437.
- Nanninga, N. (1998) Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 110-129.
- Navaratna, M.A., Sahl, H.G., and Tagg, J.R. (1999) Identification of genes encoding two-component lantibiotic production in *Staphylococcus aureus* C55 and other phage group II *S. aureus* strains and demonstration of an association with the exfoliative toxin B gene. *Infect Immun* **67**: 4268-4271.

- Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., Kenney, L.J., Gunn, J.S., Fang, F.C., and Libby, S.J. (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**: 492-508.
- Navarro, J., Chabot, J., Sherrill, K., Aneja, R., Zahler, S.A., and Racker, E. (1985) Interaction of duramycin with artificial and natural membranes. *Biochemistry* **24**: 4645-4650.
- Nes, I.F., and Holo, H. (2000) Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* **55**: 50-61.
- Nes, I.F., Diep, D.B., and Holo, H. (2006) Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol.*
- Neuhaus, F.C., Heaton, M.P., Debabov, D.V., and Zhang, Q. (1996) The *dlt* operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*. *Microb Drug Resist* **2**: 77-84.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 686-723.
- Neumuller, A.M., Konz, D., and Marahiel, M.A. (2001) The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem* **268**: 3180-3189.
- Nikaido, H. (1999) Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J Bacteriol* **181**: 4-8.
- Nizet, V. (2005) Antimicrobial peptides in human health and disease. In *Antimicrobial peptides in human health and disease*. Gallo, R.L. (ed). Norfolk: Horizon Bioscience, pp. 277-304.
- Noda, M., Kawahara, Y., Ichikawa, A., Matoba, Y., Matsuo, H., Lee, D.G., Kumagai, T., and Sugiyama, M. (2004a) Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae*. Gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *J Biol Chem* **279**: 46143-46152.
- Noda, M., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M. (2004b) Structural evidence that alanine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product. *J Biol Chem* **279**: 46153-46161.
- Nogales, J., Munoz, S., Olivares, J., and Sanjuan, J. (2006) *Sinorhizobium meliloti* genes involved in tolerance to the antimicrobial peptide protamine. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 160-167.
- Novick, R.P., and Muir, T.W. (1999) Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**: 40-45.
- Nukaga, M., Mayama, K., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., and Knox, J.R. (2003) Ultrahigh resolution structure of a class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *J Mol Biol* **328**: 289-301.
- Nwosu, V.C., and Ladapo, J.A. (1999) Antibiotic response and plasmid profile of bacteria isolated from a landfill. *Curr Microbiol* **39**: 249-253.
- Nwosu, V.C. (2001) Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol* **152**: 421-430.
- Nyberg, P., Rasmussen, M., and Bjorck, L. (2004) alpha2-Macroglobulin-proteinase complexes protect *Streptococcus pyogenes* from killing by the antimicrobial peptide LL-37. *J Biol Chem* **279**: 52820-52823.
- Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M., and Igarashi, Y. (2003) Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem* **278**: 1268-1272.

- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003a) The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 1135-1144.
- Ohki, R., Tateno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., Murata, M., and Aiso, T. (2003b) A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol* **185**: 51-59.
- O'Keeffe, T., Hill, C., and Ross, R.P. (1999) Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1506-1515.
- Olekhovich, I.N., Dahl, J.L., and Kadner, R.J. (1999) Separate contributions of UhpA and CAP to activation of transcription of the uhpT promoter of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **292**: 973-986.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., and Blazquez, J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251-1254.
- Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A., and Jault, J.M. (2003) The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J Biol Chem* **278**: 47002-47008.
- Oren, Z., and Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**: 451-463.
- Oren, Z., Lerman, J.C., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., and Shai, Y. (1999) Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* **341 ( Pt 3)**: 501-513.
- Orencia, M.C., Yoon, J.S., Ness, J.E., Stemmer, W.P., and Stevens, R.C. (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat Struct Biol* **8**: 238-242.
- Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K., and Koshland, D.E., Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* **285**: 1751-1754.
- Pag, U., and Sahl, H.G. (2002) Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Curr Pharm Des* **8**: 815-833.
- Pakhomova, S., Rife, C.L., Armstrong, R.N., and Newcomer, M.E. (2004) Structure of fosfomycin resistance protein FosA from transposon Tn2921. *Protein Sci* **13**: 1260-1265.
- Partridge, S.R., and Hall, R.M. (2005) Gene cassettes potentially encoding fosfomycin resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 860-861.
- Patel, R., Piper, K., Cockerill, F.R., 3rd, Steckelberg, J.M., and Yousten, A.A. (2000) The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 705-709.
- Pedersen, L.B., Angert, E.R., and Setlow, P. (1999) Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 3201-3211.
- Peng, H., and Mariani, K.J. (1993) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* **268**: 24481-24490.
- Perego, M. (1998) Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol* **6**: 366-370.
- Perraud, A.L., Weiss, V., and Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**: 115-120.

- Peschel, A., and Gotz, F. (1996) Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *-E*, and *-G* involved in epidermin immunity. *J Bacteriol* **178**: 531-536.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Gotz, F. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405-8410.
- Peschel, A., and Collins, L.V. (2001) Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* **22**: 1651-1659.
- Peschel, A., and Sahl, H.G. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 529-536.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Volker, U., and Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 5617-5631.
- Piddock, L.J. (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58 Suppl 2**: 11-18.
- Pietiainen, M., Gardemeister, M., Mecklin, M., Leskela, S., Sarvas, M., and Kontinen, V.P. (2005) Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* **151**: 1577-1592.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R., and Grabnar, M. (1995) *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* **16**: 969-976.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., and Grabnar, M. (2000) The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol Lett* **188**: 103-106.
- Pollock, T.J., Thorne, L., Yamazaki, M., Mikolajczak, M.J., and Armentrout, R.W. (1994) Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J Bacteriol* **176**: 6229-6237.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., and Shai, Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31**: 12416-12423.
- Pratt, L.A., and Silhavy, T.J. (1995) Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *Mol Microbiol* **17**: 565-573.
- Putman, M., Van Veen, H.W., Degener, J.E., and Konings, W.N. (2000) Antibiotic resistance: era of the multidrug pump. *Mol Microbiol* **36**: 772-773.
- Qin, L., Yoshida, T., and Inouye, M. (2001) The critical role of DNA in the equilibrium between OmpR and phosphorylated OmpR mediated by EnvZ in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 908-913.
- Quentin, Y., Fichant, G., and Denizot, F. (1999) Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J Mol Biol* **287**: 467-484.
- Quentin, Y., and Fichant, G. (2000) ABCdb: an ABC transporter database. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 501-504.
- Ra, S.R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I., and Saris, E.J. (1996) Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology* **142 (Pt 5)**: 1281-1288.
- Racker, E., Riegler, C., and Abdel-Ghany, M. (1984) Stimulation of glycolysis by placental polypeptides and inhibition by duramycin. *Cancer Res* **44**: 1364-1367.
- Rahal, J.J., Urban, C., and Segal-Maurer, S. (2002) Nosocomial antibiotic resistance in multiple gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance balloon at multiple sites. *Clin Infect Dis* **34**: 499-503.
- Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K., and Hastings, J.W. (2000) Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium

- dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3098-3101.
- Reynolds, P.E., and Somner, E.A. (1990) Comparison of the target sites and mechanisms of action of glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Drugs Exp Clin Res* **16**: 385-389.
- Rice, L.B., and Murray, B.E. (1995) Beta-lactamase-producing enterococci. *Dev Biol Stand* **85**: 107-114.
- Rice, L.B. (2000) Bacterial monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. *Clin Infect Dis* **31**: 762-769.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V., and Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**: 498-504.
- Romeis, T., and Holtje, J.V. (1994) Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 21603-21607.
- Rose, L., Kaufmann, S.H., and Daugelat, S. (2004) Involvement of *Mycobacterium smegmatis* undecaprenyl phosphokinase in biofilm and smegma formation. *Microbes Infect* **6**: 965-971.
- Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I.D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K.J., and Higgins, C.F. (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J* **20**: 5615-5625.
- Rossiter, S., Joyce, K., Johnson, S., Gregg, C., Steiner, C., Gilbert, L., Franko, E., Debess, E., Taylor, B., Madden, J., Angulo, F., and team, t.E.i.p.e.r.s. (2001) High prevalence of bacitracin resistance among enterococci isolated from human stools and grocery store chicken in the United States. In *American Society for Microbiology General Meeting Orlando, FL*.
- Ruoff, K.L., de la Maza, L., Murtagh, M.J., Spargo, J.D., and Ferraro, M.J. (1990) Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **28**: 435-437.
- Sablon, E., Contreras, B., and Vandamme, E. (2000) Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **68**: 21-60.
- Sahl, H.G., Jack, R.W., and Bierbaum, G. (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem* **230**: 827-853.
- Sahl, H.G., and Bierbaum, G. (1998) Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**: 41-79.
- Sahm, D.F., Free, L., and Handwerker, S. (1995) Inducible and constitutive expression of vanC-1-encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1480-1484.
- Salyers, A.A., and Shoemaker, N.B. (1996) Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. *Clin Infect Dis* **23 Suppl 1**: S36-43.
- Salyers, A.A., and Amabile-Cuevas, C.F. (1997) Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2321-2325.
- Sanchez-Perez, G.F., Bautista, J.M., and Pajares, M.A. (2004) Methionine adenosyltransferase as a useful molecular systematics tool revealed by phylogenetic and structural analyses. *J Mol Biol* **335**: 693-706.
- Saurin, W., Koster, W., and Dassa, E. (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol* **12**: 993-1004.

- Schechter, N., Momose, K., and Rudney, H. (1972) The effect of bacitracin and Ca<sup>++</sup> on the formation of polyprenylpyrophosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem Biophys Res Commun* **48**: 833-839.
- Schindler, C.A., and Schuhardt, V.T. (1964) Lysostaphin: A New Bacteriolytic Agent for the Staphylococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 414-421.
- Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., Landmesser, H., and Schneider, E. (1999) Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur J Biochem* **266**: 420-430.
- Schmidtchen, A., Frick, I.M., Andersson, E., Tapper, H., and Bjorck, L. (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* **46**: 157-168.
- Schmitz, S., Hoffmann, A., Szekat, C., Rudd, B., and Bierbaum, G. (2006) The lantibiotic mersacidin is an autoinducing peptide. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7270-7277.
- Schneider, E., and Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 1-20.
- Schote, U., Ganz, P., Fahr, A., and Seelig, J. (2002) Interactions of cyclosporines with lipid membranes as studied by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-sensitivity titration calorimetry. *J Pharm Sci* **91**: 856-867.
- Scogin, D.A., Baldwin, T.O., and Gennis, R.B. (1983) Studies on the complex formed between bacitracin A and divalent cations. *Biochim Biophys Acta* **742**: 184-188.
- Seelig, J. (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 40-50.
- Shafer, W.M., Qu, X., Waring, A.J., and Lehrer, R.I. (1998) Modulation of Neisseria gonorrhoeae susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1829-1833.
- Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 55-70.
- Shi, L., Liu, W., and Hulett, F.M. (1999) Decay of activated Bacillus subtilis pho response regulator, PhoP approximately P, involves the PhoR approximately P intermediate. *Biochemistry* **38**: 10119-10125.
- Shi, Y., Cromie, M.J., Hsu, F.F., Turk, J., and Groisman, E.A. (2004) PhoP-regulated Salmonella resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B. *Mol Microbiol* **53**: 229-241.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., and Ames, G.F. (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* **266**: 18714-18719.
- Siegers, K., and Entian, K.D. (1995) Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by Lactococcus lactis 6F3. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1082-1089.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wojcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., and Potempa, J. (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4673-4679.
- Siewert, G., and Strominger, J. L. (1967) Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**: 767-773.

- Simon, G., Mejean, V., Jourlin, C., Chippaux, M., and Pascal, M.C. (1994) The torR gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. *J Bacteriol* **176**: 5601-5606.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146 ( Pt 2)**: 249-262.
- Somner, E.A., and Reynolds, P.E. (1990) Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 413-419.
- Song, J.H., Lee, N.Y., Ichiyama, S., Yoshida, R., Hirakata, Y., Fu, W., Chongthaleong, A., Aswapokee, N., Chiu, C.H., Lalitha, M.K., Thomas, K., Perera, J., Yee, T.T., Jamal, F., Warsa, U.C., Vinh, B.X., Jacobs, M.R., Appelbaum, P.C., and Pai, C.H. (1999) Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin Infect Dis* **28**: 1206-1211.
- Sonveaux, N., Vigano, C., Shapiro, A.B., Ling, V., and Ruyschaert, J.M. (1999) Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem* **274**: 17649-17654.
- Soualhine, H., Brochu, V., Menard, F., Papadopoulou, B., Weiss, K., Bergeron, M.G., Legare, D., Drummel-Smith, J., and Ouellette, M. (2005) A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. *Mol Microbiol* **58**: 1430-1440.
- Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A. (1995) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem* **270**: 6163-6169.
- Staubitz, P., Neumann, H., Schneider, T., Wiedemann, I., and Peschel, A. (2004) MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 67-71.
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., and Morris, H.R. (1994) Detection of 4'-phosphopantetheine at the thioester binding site for L-valine of gramicidinS synthetase 2. *FEBS Lett* **340**: 39-44.
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., and Morris, H.R. (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* **271**: 15428-15435.
- Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S., and Entian, K.D. (2005) Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J Bacteriol* **187**: 822-828.
- Stephenson, K., and Hoch, J.A. (2002) Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther* **93**: 293-305.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 450-490.
- Stone, K.J., and Strominger, J.L. (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 3223-3227.
- Storm, D.R., and Strominger, J.L. (1973) Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J Biol Chem* **248**: 3940-3945.
- Stukey, J., and Carman, G.M. (1997) Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci* **6**: 469-472.
- Styers, D., Sheehan, D.J., Hogan, P., and Sahm, D.F. (2006) Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **5**: 2.

- Tagg, J.R., Dajani, A.S., and Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* **40**: 722-756.
- Takala, T.M., and Saris, P.E. (2006) C terminus of NisI provides specificity to nisin. *Microbiology* **152**: 3543-3549.
- Thackray, P.D., and Moir, A. (2003) SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J Bacteriol* **185**: 3491-3498.
- Thomason, P., and Kay, R. (2000) Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci* **113** ( Pt 18): 3141-3150.
- Throup, J.P., Koretke, K.K., Bryant, A.P., Ingraham, K.A., Chalker, A.F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N.G., Brown, J.R., Holmes, D.J., Rosenberg, M., and Burnham, M.K. (2000) A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**: 566-576.
- Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII. Inhibition of cross-linking by penicillins and cephalosporins: studies in *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Biol Chem* **243**: 3169-3179.
- Tiwari, H.K., and Sen, M.R. (2006) Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infectious Diseases* **6**: 156-162.
- Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M.B., Fang, X., Rudner, D.Z., and Walker, S. (2006) Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11033-11038.
- Todd, J.A., Bone, E.J., and Ellar, D.J. (1985) The sporulation-specific penicillin-binding protein 5a from *Bacillus subtilis* is a DD-carboxypeptidase in vitro. *Biochem J* **230**: 825-828.
- Touhami, A., Jericho, M.H., and Beveridge, T.J. (2004) Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **186**: 3286-3295.
- Trieu-Cuot, P., Arthur, M., and Courvalin, P. (1987) Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. *Microbiol Sci* **4**: 263-266.
- Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y., and Koga, T. (2002) Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3756-3764.
- Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J., and Proud, C.G. (2000) ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* **275**: 34131-34139.
- Udo, E.E., and Jacob, L.E. (1998) Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance and the mobilization of non-conjugative plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* **4**: 185-193.
- Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1996) Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *Embo J* **15**: 1028-1036.
- Upton, M., Tagg, J.R., Wescombe, P., and Jenkinson, H.F. (2001) Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *J Bacteriol* **183**: 3931-3938.
- Urbatsch, I.L., Tyndall, G.A., Tomblin, G., and Senior, A.E. (2003) P-glycoprotein catalytic mechanism: studies of the ADP-vanadate inhibited state. *J Biol Chem* **278**: 23171-23179.
- Utaiida, S., Dunman, P.M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Singh, V.K., Jayaswal, R.K., and Wilkinson, B.J. (2003) Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology* **149**: 2719-2732.



- Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Hechard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W., and Rautenbach, M. (2004a) Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* **150**: 3025-3033.
- Vadyvaloo, V., Snoep, J.L., Hastings, J.W., and Rautenbach, M. (2004b) Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* **150**: 335-340.
- Van Bambeke, F., Balzi, E., and Tulkens, P.M. (2000) Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* **60**: 457-470.
- Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Plesiat, P., Pechere, J.C., and Tulkens, P.M. (2003) Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1055-1065.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J., and Venema, G. (1991) Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol* **57**: 492-498.
- Van Den Hooven, H.W., Spronk, C.A., Van De Kamp, M., Konings, R.N., Hilbers, C.W., and Van De Van, F.J. (1996) Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur J Biochem* **235**: 394-403.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M., and Holtje, J.V. (1999) Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 6726-6734.
- Wallmark, G., and Finland, M. (1961) Phage types and antibiotic susceptibility of pathogenic staphylococci. Results at Boston City Hospital 1959-1960 and comparison with strains of previous years. *Jama* **175**: 886-897.
- Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**: 775-781.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* **18**: 306-325.
- Wang, F., Cassidy, C., and Sacchettini, J.C. (2006) Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-lactamase reveal its critical role in resistance to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2762-2771.
- Ward, J.B. (1973) The chain length of the glycans in bacterial cell walls. *Biochem J* **133**: 395-398.
- Waxman, D.J., and Strominger, J.L. (1983) Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* **52**: 825-869.
- Webb, V., and Davies, J. (1993) Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes? *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 2379-2384.
- Wecke, T., Veith, B., Ehrenreich, A., and Mascher, T. (2006) Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J Bacteriol* **188**: 7500-7511.
- Weisblum, B. (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 577-585.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., and Sahl, H.G. (2001) Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* **276**: 1772-1779.
- Wiedemann, I., Benz, R., and Sahl, H.G. (2004) Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J Bacteriol* **186**: 3259-3261.
- Williams, D.H. (1996) The glycopeptide story--how to kill the deadly 'superbugs'. *Nat Prod Rep* **13**: 469-477.

- Williamson, R., Calderwood, S.B., Moellering, R.C., Jr., and Tomasz, A. (1983) Studies on the mechanism of intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in group D streptococci. *J Gen Microbiol* **129**: 813-822.
- Wong, H., Bowie, J.H., and Carver, J.A. (1997) The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *Eur J Biochem* **247**: 545-557.
- Wosten, M.M., Kox, L.F., Chamnongpol, S., Soncini, F.C., and Groisman, E.A. (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103**: 113-125.
- Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* **22**: 172-176.
- Xu, Q., and West, A.H. (1999) Conservation of structure and function among histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains as revealed by the crystal structure of YPD1. *J Mol Biol* **292**: 1039-1050.
- Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I., and Huang, H.W. (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J* **79**: 2002-2009.
- Yanouri, A., Daniel, R.A., Errington, J., and Buchanan, C.E. (1993) Cloning and sequencing of the cell division gene *pbpB*, which encodes penicillin-binding protein 2B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**: 7604-7616.
- Yin, S., Daum, R.S., and Boyle-Vavra, S. (2006) *VraSR* two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 336-343.
- Young, J., and Holland, I.B. (1999) ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 177-200.
- Ysern, P., Clerch, B., Castano, M., Gibert, I., Barbe, J., and Llagostera, M. (1990) Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis* **5**: 63-66.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.
- Zimmermann, N., Metzger, J.W., and Jung, G. (1995) The tetracyclic lantibiotic actagardine. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR assignments and revised primary structure. *Eur J Biochem* **228**: 786-797.

# YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*

Remi Bernard, Pascale Joseph<sup>1</sup>, Annick Guiseppi, Marc Chippaux, François Denizot\*

Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

Received 29 July 2003; received in revised form 22 September 2003; accepted 22 September 2003

First published online 14 October 2003

## Abstract

The *Bacillus subtilis* *yts*, *yxd* and *yvc* gene clusters encode a putative ABC transporter and a functionally coupled two-component system. When tested for their sensitivity towards a series of antibiotics, null *yts* mutants were found to be sensitive to bacitracin. Real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments demonstrated that the presence of bacitracin in the growth medium strongly stimulates the expression of the *ytsCD* genes encoding the ABC transporter and that this stimulation strictly depends on the YtsA response regulator. The *ywoA* gene encodes a protein known to confer some resistance to bacitracin on the bacterium. When it was mutated in a null *yts* background, the *ywoA yts* double mutant was found to be five times more sensitive than the *yts* one. We propose that (i) the YtsCD ABC transporter exports the bacitracin; (ii) YwoA, the protein that contains an acidPPc (PAP2 or PgpB) domain, is not part of an ABC transporter but competes with bacitracin for the dephosphorylation of the C55-isoprenyl pyrophosphate (IPP); (iii) the two resistance mechanisms are independent and complementary.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; ABC transporter

## 1. Introduction

In normal conditions, bacteria such as *Bacillus subtilis* experience drastic changes in environmental conditions. They usually have various systems to ensure detection and subsequent transduction of stimuli generated by modifications of their biotope, so that appropriate response can be developed. This adaptative response often involves two-component regulatory systems (TCS), usually composed of a sensor kinase (HK) and a response regulator (RR), and ABC transporters composed of membrane spanning domain (MSD) and membrane binding domain (MBD) [1–3].

Each of the *B. subtilis* *yts*, *yvc* and *yxd* gene clusters contains two operons encoding putative TCS and ABC transporter. In an earlier paper [4] we demonstrated func-

tional coupling between the regulatory and transport systems, with the RR controlling expression of the ABC transporter structural genes. As these last were predicted to be exporter systems, putatively involved in antibiotic excretion, it was of interest to test their possible involvement in antibiotic resistance in *B. subtilis* strain 168. Accordingly, we have screened a series of *yts*, *yvc* and *yxd* mutants for their sensitivity towards a series of antibiotics. In this paper, we demonstrate that the *yts* cluster encodes the main system involved in the resistance of *B. subtilis* to bacitracin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

We used *B. subtilis* 168 [5] as parental strain. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Complementation in trans was done using the pDG148-Stu plasmid [6]. The BFS48, BFS81, BFS82, BFS83, YXDJd, YXDJLd and BFS235 strains were obtained from the Japanese/European consortium for *B. subtilis* genome function analysis (BSORF and Micado databases,

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 91164387; Fax: +33 4 91718914.  
E-mail address: [denizot@ibsm.cnrs-mrs.fr](mailto:denizot@ibsm.cnrs-mrs.fr) (F. Denizot).

<sup>1</sup> Present address: Department of Molecular Biology and Microbiology, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA 02111, USA.

<http://bacillus.genome.ad.jp/> and <http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/genmic/madbase/progs/madbase.operl>.

*Escherichia coli* and *B. subtilis* were grown in Luria broth (LB) at 37°C with aeration.

Recombinant strains were grown in medium containing antibiotic at the indicated concentration: ampicillin (50 µg ml<sup>-1</sup>), erythromycin (0.3 µg ml<sup>-1</sup>), kanamycin (20 µg ml<sup>-1</sup>) and spectinomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>). All antibiotics were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

## 2.2. Assays of drug sensitivity

Screening for antibiotic sensitivity was done on solid medium. A 50-µl aliquot of a fresh *B. subtilis* mid-log phase culture grown at 37°C in LB medium was mixed with 3 ml of 0.55% soft LB medium and poured on top of LB agar. After cooling, 7-mm diameter filter papers carrying the antibiotic were placed on the top agar and the plates incubated overnight at 37°C. The diameters of the growth inhibition areas were compared. The following antibiotics were tested at the amounts indicated (mg per disk), D-cycloserine (0.1), fosfomicin (0.2), bacitracin (0.1), nigericin (0.01), penicillin G (0.1), colistin (0.1), lincomycin (0.05), chloramphenicol (0.05), spectinomycin (0.1), rifampicin (0.02), norfloxacin (0.1), vancomycin (0.1), mixture of gramicidin A, B, C and D (0.1), novobiocin (0.1), tetracyclin (0.1), cephalosporin C (0.2) and geneticin (0.5). Lincomycin was used as control antibiotic since all strains bearing an erythromycin resistance cassette should be resistant to this antibiotic.

The concentration of antibiotic giving 50% of growth inhibition (IC<sub>50</sub>) was determined using the microtiter tray assay described by Ohki et al. [7].

## 2.3. Disruption of *ywoA* gene

The following primers were used for this purpose: *spec1\_inv*, 5'-CCGACACAGCCAAGCTCGATTTTCG-TTCGTAATACATG-3'; *spec2\_inv*, 5'-CCAGGAGG-GCACGGATACCAATTAGAATGAATATTTCCC-3'; *ywoA1*, 5'-GCTAAAAGGGTGCTGAAAACG-3'; *ywoA2*, 5'-TCCGTGCCCTCCTGGAGAGATAGTCCATG-GATTGCTTTA-3'; *ywoA3*, 5'-GCTTGGCTGTGTGCG-GAGTGAGGATCTACGAAGCCATTATC-3'; *ywoA4*, 5'-GTGCTGACATATTTGCTGTGGA-3'.

A DNA fragment corresponding to the *ywoA* coding sequence together with about 300 bp of the upstream and 300 bp of the downstream adjacent sequences was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using *ywoA1/ywoA4* as primer couple and genomic DNA from *B. subtilis* 168 as template. This fragment was cloned into the *Sma*I-digested pJM105 plasmid [8] (carrying the resistance to chloramphenicol). The resulting plasmid pJM105*ywoA* was used as template for a PCR amplification using the two divergent *ywoA2/ywoA3* primers, which hybridize with the 5' and the 3' ends of the *ywoA*

coding sequence, respectively. The PCR product was treated with T4 polymerase in the presence of deoxythymidine triphosphate (dTTP) yielding a fragment with 5' overhangs and mixed with the spectinomycin (Spec<sup>r</sup>) cassette bearing complementary overhangs. This cassette was obtained by PCR amplification using plasmid pDG1727 DNA as template and *spec1\_inv* and *spec2\_inv* as primers and treated with T4 polymerase in the presence of deoxyadenosine triphosphate (dATP). Both DNA fragments were then submitted to ligation-independent cloning [9] leading to plasmid pJM105*ywoA::Spec<sup>r</sup>*. This plasmid was transformed into *B. subtilis* 168. Spectinomycin-resistant clones were selected and screened for the absence of chloramphenicol resistance due to pJM105. One such clone was retained and submitted to PCR amplification with the *ywoA1/ywoA4* primer couple, to ensure that the *ywoA* wild allele had actually been eliminated and replaced by the *ywoA::Spec<sup>r</sup>* mutated allele.

## 2.4. Real-time PCR

RNA preparations, reverse transcription (RT) and real-time PCR experiments were carried out as described previously [4]. Amplification of 16S rRNA was used for sample normalization using primers listed below. The results of quantitative RT-PCR are expressed as stimulation indices (ratio of relative amounts of RNA obtained in the presence or absence of antibiotic). The following primers were used in real-time PCR assays: *ytsC\_sg1*, 5'-TTGCG-GGATAAATACCCGAA-3'; *ytsC\_sg2*, 5'-GCTCTTCC-AGCGGATGTTCTC-3'; *ywoA\_sg1*, 5'-CATTATGGT-C TTCATCACGGAATA-3'; *ywoA\_sg2*, 5'-CAAACAG-CCAGATTGCCAATAG-3'; 16S\_SG1, 5'-AGCCGCG-GTAATACGTAGGTG-3'; 16S\_SG2, 5'-CCCCAGTTT-CCAATGACCC-3'.

## 3. Results and discussion

A genetically well-defined null mutant of each of the *ytsAC*, *yvcPR* and *yxdJL* genes was tested with the different antibiotics. Only bacitracin was observed to significantly affect the growth of *yts* null mutants (Table 2). The IC<sub>50</sub> for this antibiotic decreases from 355 µg ml<sup>-1</sup> for the parental strain to 6.4 and 7.8 µg ml<sup>-1</sup> for the *ytsA* and *ytsC* mutants, respectively (Fig. 1). Interestingly, all the *yts* null mutants, including the *ytsB* and *ytsD* mutants, give almost the same IC<sub>50</sub> (data not shown). When the *ytsA* wild allele was introduced in trans in the corresponding mutant, the bacitracin resistance was restored to the level of that of the parental strain. This indicates that YtsA is directly involved in resistance to this antibiotic. A similar result was observed for the *ytsC* mutant even if the complementation was not total (data not shown).

The observed IC<sub>50</sub> (about 7 µg ml<sup>-1</sup>) is independent of the *yts* mutated gene. This indicates that each of the four

Table 1  
Strains, plasmids used in this study

Strains	Relevant characteristics	Construction
<i>B. subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	[5]
BFS48	168 <i>ytsA</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	Micado website
BFS81	168 <i>ytsB</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	Micado website
BFS82	168 <i>ytsC</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	Micado website
BFS83	168 <i>ytsD</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	Micado website
YXDJd	168 <i>yxdJ</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	BSORF website
YXDLd	168 <i>yxdL</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	BSORF website
BSmrs86	168 <i>yvcP</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	this work
BSmrs106	168 <i>yvcR</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	this work
BFS235	168 <i>ywoA</i> '-lacZ <i>Em</i> <sup>r</sup>	Micado website
BSmrs173	168 <i>ywoA</i> ::Spec	this work
BSmrs104	BFS48/pDG148-Stu- <i>ytsA</i>	this work
BSmrs168	BFS82/ <i>ywoA</i> ::Spec	this work
Plasmids		
pJM105	<i>amp</i>	[8]
pDG148-Stu	<i>amp kan</i>	[6]
pDG148-Stu- <i>ytsA</i>	<i>amp kan Pspac-ytsA</i>	this work

Micado website: <http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/genmic/madbase/progs/madbase.operl>; BSORF website: <http://bacillus.genome.ad.jp/>.

Yts proteins is equally required to confer bacitracin resistance. As already reported, the YtsA response regulator controls the expression of the *ytsCD* operon [4]. The fact that the absence of either one of the TCS components led to the same sensitivity to bacitracin as the absence of the ABC transporter itself indicated that none of these proteins is dispensable and that the YtsA seems to be the master regulator of the system.

It was therefore of interest to know whether bacitracin

was the stimulus detected by the YtsAB TCS. For that purpose, the parental strain was grown in the presence or absence of this antibiotic. The cells were harvested after 45 min of incubation and total RNA extracted to be used in real-time PCR experiments. Results given as stimulation indices indicated that the presence of bacitracin stimulates 2900 times the *ytsC* expression (Table 3). As expected, when the same experiment was repeated with the *ytsA* null mutant strain almost no induction could be observed, confirming that the stimulation of the *ytsC* expression observed in the parental strain was depending on the YtsA component. Altogether, these results strongly suggest that the *ytsAB* operon encodes a TCS involved in the detection of bacitracin and subsequent transmission of this information, and that the *ytsCD* operon encodes an ABC transport system involved in the resistance to bacitracin, very likely by exporting the antibiotic out of the cell.

Ohki et al. [7] have reported the existence in the *B. subtilis* genome of the *ywoA* gene encoding a protein homologous to the BcrC protein of *Bacillus licheniformis* and they have proposed that YwoA is the MSD of an ABC transporter involved in the resistance of *B. subtilis* to bacitracin. When studying the resistance to bacitracin of a null *ywoA* mutant we found that (i) although it is almost eight times lower than that of the parental strain, its IC<sub>50</sub> is much higher than that of any of the *yts* mutants, i.e. 48 µg ml<sup>-1</sup> compared with 6–8 µg ml<sup>-1</sup> (Fig. 1); (ii) the *ywoA* expression is induced by bacitracin but does not depend on the YtsAB TCS as the *ywoA* expression is not affected in a *ytsA* mutant, as demonstrated by real-time PCR experiments (Table 3).

Table 2  
Susceptibility of *B. subtilis* strains to various antibiotics

Antibiotics	Strains						
	168 <sup>a</sup>	BFS48 <sup>b</sup>	BFS82 <sup>b</sup>	BFS86 <sup>b</sup>	BFS106 <sup>b</sup>	YXDJd <sup>b</sup>	YXDLd <sup>b</sup>
Gramicidin	7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Spectinomycin	14	1.3	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2
Chloramphenicol	25	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Novobiocin	26	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0
Geneticin	26	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9
Colistin	16	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Vancomycin	29	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1
Tetracyclin	20	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	0.9
Rifampicin	20	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1
D-cycloserine	20	0.8	0.8	0.9	1	1	1
Bacitracin	10	2.4	2.4	1.1	1.1	1.1	1.1
Fosfomycin <sup>c</sup>	7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Nigericin	15	1.0	1.2	1.0	1.1	1.0	1.0
Penicillin G	24	1.1	1.3	1.2	1.1	1.2	1.1
Norfloxacine	28	1.0	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1
Cephalosporin C	34	1.2	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1

Tests for antibiotic susceptibility were done on solid medium as described in Section 2 using filters with a 7-mm diameter. For a given antibiotic, the diameter of the area with growth inhibition is determined for each strain. Similar results have been repeatedly obtained in several independent experiments.

<sup>a</sup>In the first column which corresponds to data obtained with parental strain, the diameter of the zone of growth inhibition (in mm) is reported.

<sup>b</sup>In the other columns, for each antibiotic results are reported as the ratio corresponding to the diameter of the area of growth inhibition for a given strain divided by the diameter of the area of growth inhibition for the parental strain.

<sup>c</sup>A slight halo reflecting a partial growth inhibition is always observed around the filter using this antibiotic.

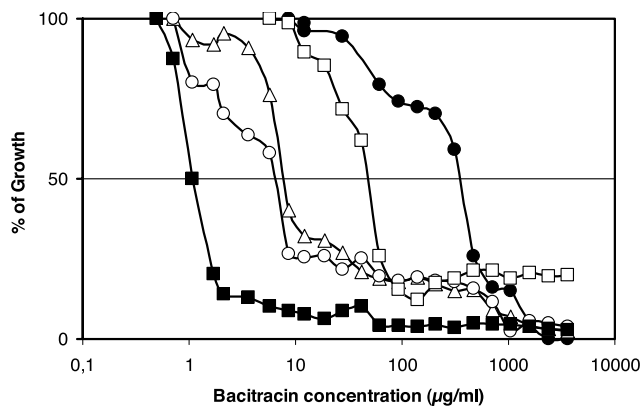


Fig. 1. Bacitracin sensitivity of several *B. subtilis* mutants. Cultures were done as previously described [7] in 96-well titer plate and the OD monitored using a TECAN microtiter tray reader at 620 nm. Full circles, parental 168 strain; open squares, BSMrs173; open triangles, BFS82; open circles, BFS48; full squares, BSMrs168. IC<sub>50</sub> is determined for each strain and corresponds to the bacitracin concentration giving 50% of cells survival. Data were consistently obtained in more than three different experiments.

To check whether the mechanisms of resistance of the YtsCD system and of the YwoA protein are depending on each other, we have constructed a series of double mutants, each carrying a null *ywoA* allele together with one of the null *yts* alleles. Disruption of the *ywoA* gene was done by a double recombination event leading to the deletion of the coding sequence and the integration of the *ywoA*:::Spec<sup>r</sup> mutated allele as indicated in Section 2.

Results are given for the *ytsA ywoA* double mutant. Data reported in Fig. 1 indicate that its IC<sub>50</sub> is about six times lower than that of the *ytsA* single mutant, i.e. 1.1 µg ml<sup>-1</sup> versus 6.4 µg ml<sup>-1</sup>. Whatever the genetic background, however, a *yts* mutation reduces the IC<sub>50</sub> about 50-fold, whereas a *ywoA* mutation always corresponds to a six-fold reduction in IC<sub>50</sub>. Taken together, these results indicate that the resistances conferred by the YtsAB system and that conferred by the YwoA protein are complementary, and it is very likely that the two mechanisms are independent.

*B. subtilis* 168 has two very different but complementary ways of surviving the presence of bacitracin in the growth medium. The absence of both of them is detrimental to the cells even in the presence of very small concentrations of bacitracin.

The first is the powerful YtsAB ABC transporter system, which is certainly in charge of exporting the majority of the incoming bacitracin; in its absence there is a drastic decrease in resistance, as indicated by the strong reduction of the IC<sub>50</sub> for bacitracin of all *yts* mutants. Accordingly, we propose to rename the *ytsABCD* genes as *barABCD* in future work. It is noteworthy that the BarCD transporter belongs to a peculiar group of ABC transporters (subfamily 9 in ABCdb [10]), few of which were attributed a functional role. Indeed, it is the first time that a member of subfamily 9 is involved in the resistance directed against peptide antibiotic. Up to now, this function had mainly been attributed to ABC transporters of subfamily 7, such as the EpiEFG system involved in *Staphylococcus epidermidis* resistance to epidermin [11], the NisFEG system that confers resistance to nisin of *Lactococcus lactis* [12], the SpaFEG and MrsFGE systems respectively responsible for subtilin and mersacidin resistance of *Bacillus* sp. [13,14], and finally the already mentioned bacitracin resistance BcrABC system from *B. licheniformis* [15].

The second, the membrane-bound YwoA, only leads to a less pronounced decrease of resistance when deleted in *B. subtilis*. This protein was predicted to be part of an ABC transporter system mainly on the basis of its similarity with the BcrC protein of *B. licheniformis* that had been predicted to be an MSD [15]. However, the BLAST program, together with the non-redundant database from NCBI, showed the proteins presenting the highest similarity with YwoA to be membrane-associated proteins found in *Firmicutes* and *Proteobacteria*. They present four to five transmembrane domains and are predicted to belong to the PA-phosphatase family (IPR000326 at InterPro, <http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Indeed, together with BcrC from *B. licheniformis* and YgjG from *E. coli*, YwoA possesses a characteristic signature sequence called acidPPc (smart00014), PAP2 (pfam01569) or PgpB (COG0671) depending of the reference database. The PA-phosphatase family comprises more than 400 members spread over most of the living kingdoms, and the phosphatase activity of some of them has been unambiguously demonstrated. Indeed, the *E. coli* PgpB is a phosphatidyl glycerophosphate phosphatase [16], the *Salmonella typhimurium* PhoN [17] and the *Zymomonas mobilis* PhoC [18] are bacterial acid phosphatases, the *Treponema denticola* PhoN [19] is a neutral phosphatase, the *Saccharomyces cerevisiae* AUR1

Table 3  
Comparison of gene expression levels in the presence or absence of bacitracin

Gene tested	<i>ytsC</i>		<i>ywoA</i>	
Strains	168	BSF48	168	BSF48
Stimulation index ± S.D.	2950 ± 150	3 ± 2	19 ± 1	12 ± 1

Bacteria were grown in LB medium until mid-log phase. The culture was split and bacitracin added to one part at a 0.2 µg ml<sup>-1</sup> final concentration. Both cultures were then incubated for an additional 45 min. Bacteria were collected, total RNA prepared and cDNA synthesized. For each gene mRNA was quantified using real-time PCR as indicated in Section 2. We used amplification of 16S rRNA for sample normalization. Results are expressed as stimulation indices corresponding to the ratio of the mRNA amount of a gene expressed in the presence of bacitracin to the mRNA amount of the same gene expressed in the absence of bacitracin. Data are given as mean value from three independent cultures ± standard deviation.



displays an inositol phosphorylceramide synthetase activity [20], and finally two human phosphatidic acid phosphatases have been characterized [21]. The fact that YwoA as well as other BcrC homologs might have a phosphatase activity is of real importance, given the fact that the antibiotic action of bacitracin is due to its binding to isoprenyl pyrophosphate (IPP), thus preventing its dephosphorylation into isoprenyl phosphate (IP) by specific phosphatase(s). In fact, the *E. coli* YgjB was shown to lead to an increased bacitracin resistance of the cells when overproduced [22]. The absence, in this bacterium, of BcrA or BcrB analogs able together with YgjB to constitute a fully active equivalent of the BcrABC *B. licheniformis* system strongly suggests that YgjB might act on its own and like YwoA from *B. subtilis* might constitute a fully independent way to resist bacitracin. We therefore propose that the intrinsic membrane proteins YgjB and YwoA are not the MSD of ABC transporters, but rather are membrane phosphatases with IPP pyrophosphatase activity, allowing them to compete with residual bacitracin for IPP in order to regenerate the IP. This assumption might be extended to BcrC from *B. licheniformis*.

We are currently investigating our proposition that BarCD actually exports bacitracin and that YwoA possesses an IPP phosphatase activity.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Marilyn Foglino for helpful discussions and Athel Cornish-Bowden for critical reading of the manuscript. We also thank Jeannine Busuttill for her advice during the course of this study. This work was funded in part by grants from CNRS, HMR (FRHMR2/9932), CNRS 'puce à ADN'.

## References

- [1] Parkinson, J.S. and Kofoid, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26, 71–112.
- [2] Ames, G.F. (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 397–425.
- [3] Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W. and Hermodson, M.A. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323, 448–450.
- [4] Joseph, P., Fichant, G., Quentin, Y. and Denizot, F. (2002) Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 5, 503–513.
- [5] Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81, 741–746.
- [6] Joseph, P., Fantino, J.R., Herbaud, M.L. and Denizot, F. (2001) Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 91–97.
- [7] Ohki, R., Tateno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., Murata, M. and Aiso, T. (2003) A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J. Bacteriol.* 185, 51–59.
- [8] Anagnostopoulos, C., Piggot, P.J. and Hoch, J.A. (1993) In: *Integrational Vectors for Genetic Manipulation in Bacillus subtilis* (Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R., Eds.). American Society for Microbiology Washington, DC.
- [9] Aslanidis, C. and de Jong, P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* 18, 6069–6074.
- [10] Quentin, Y. and Fichant, G. (2000) ABCdb: an ABC transporter database. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 501–504.
- [11] Peschel, A. and Gotz, F. (1996) Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes epiF, -E, and -G involved in epidermin immunity. *J. Bacteriol.* 178, 531–536.
- [12] Ra, S.R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I. and Saris, E.J. (1996) Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology* 142 (Pt. 5), 1281–1288.
- [13] Klein, C. and Entian, K.D. (1994) Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2793–2801.
- [14] Altena, K., Guder, A., Cramer, C. and Bierbaum, G. (2000) Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2565–2571.
- [15] Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R. and Grabnar, M. (1995) *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol. Microbiol.* 16, 969–976.
- [16] Icho, T. (1988) Membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli*: sequence of the pgpB gene and dual subcellular localization of the pgpB product. *J. Bacteriol.* 170, 5117–5124.
- [17] Kasahara, M., Nakata, A. and Shinagawa, H. (1991) Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* phoN gene, which encodes non-specific acid phosphatase. *J. Bacteriol.* 173, 6760–6765.
- [18] Pond, J.L., Eddy, C.K., Mackenzie, K.F., Conway, T., Borecky, D.J. and Ingram, L.O. (1989) Cloning, sequencing, and characterization of the principal acid phosphatase, the phoC+ product, from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 171, 767–774.
- [19] Ishihara, K. and Kuramitsu, H.K. (1995) Cloning and expression of a neutral phosphatase gene from *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* 63, 1147–1152.
- [20] Kuroda, M., Hashida-Okado, T., Yasumoto, R., Gomi, K., Kato, I. and Takesako, K. (1999) An aureobasidin A resistance gene isolated from *Aspergillus* is a homologue of yeast AUR1, a gene responsible for inositol phosphorylceramide (IPC) synthase activity. *Mol. Gen. Genet.* 261, 290–296.
- [21] Leung, D.W., Tompkins, C.K. and White, T. (1998) Molecular cloning of two alternatively spliced forms of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells. *DNA Cell Biol.* 17, 377–385.
- [22] Harel, Y.M., Bailone, A. and Bibi, E. (1999) Resistance to bacitracin as modulated by an *Escherichia coli* homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 181, 6176–6178.

## BcrC from *Bacillus subtilis* Acts as an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase in Bacitracin Resistance\*

Received for publication, December 7, 2004, and in revised form, May 31, 2005  
Published, JBC Papers in Press, June 9, 2005, DOI 10.1074/jbc.M413750200

Remi Bernard<sup>‡§</sup>, Meriem El Ghachi<sup>¶</sup>, Dominique Mengin-Lecreulx<sup>¶</sup>, Marc Chippaux<sup>‡</sup>,  
and François Denizot<sup>‡¶</sup>

From the <sup>‡</sup>Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20 and <sup>¶</sup>Laboratoire des Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 8619 CNRS, Université Paris-Sud, Bâtiment 430, 91405 Orsay Cedex, France

**Overexpression of the BcrC<sub>Bs</sub> protein, formerly called YwoA, in *Escherichia coli* or in *Bacillus subtilis* allows these bacteria to stand higher concentrations of bacitracin. It was suggested that BcrC<sub>Bs</sub> was a membrane-spanning domain of an ATP binding cassette (ABC) transporter involved in bacitracin resistance. However, we hypothesized that this protein has an undecaprenyl pyrophosphate (UPP) phosphatase activity able to compete with bacitracin for UPP. We found that overexpression of a recombinant His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein in *E. coli* (i) increased the resistance of the cells to bacitracin and (ii) increased UPP phosphatase activity in membrane preparations by 600-fold. We solubilized and prepared an electrophoretically pure protein exhibiting a strong UPP phosphatase activity. BcrC<sub>Bs</sub>, which belongs to the type 2 phosphatidic acid phosphatase (PAP2) phosphatase superfamily (PF01569), differs totally from the already known BacA UPP phosphatase from *E. coli*, a member of the PF02673 family of the Protein family (Pfam) database. Thus, BcrC<sub>Bs</sub> and its orthologs form a new class of proteins within the PAP2 phosphatase superfamily, and likely all of them share a UPP phosphatase activity.**

Bacitracin, a mixture of related cyclic polypeptides, is a powerful antibiotic that strongly binds as a complex with metallic ions to undecaprenyl pyrophosphate (UPP),<sup>1</sup> (1) thus preventing its dephosphorylation into undecaprenyl phosphate (UP) (2). UP is a lipid carrier that is essential for the synthesis of many cell wall polymers and, more specially, for peptidoglycan biosynthesis. By sequestering UPP and preventing its dephosphorylation back into UP, bacitracin weakens UP loading or reloading with peptidoglycan precursors. Because translocation of these precursors to the external side of the membrane is drastically or totally impaired, further biosynthesis of the con-

stituents of the cell envelope is stopped, eventually resulting in cell death.

Bacitracin is produced by several species of *Bacillus* such as *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Both in the *B. licheniformis* bacitracin-producing strains and in the *B. subtilis* naturally resistant non-producing strains, resistance to the antibiotic is ensured by an efficient specific ABC export system (3–6). Simultaneously with others (4–6), we identified a second bacitracin resistance system in *B. subtilis* 168. This bacterium has at least two different and independent bacitracin resistance systems, both belonging to the bacitracin regulon (5). The first, an ABC exporter (family 9 (7)), is encoded by the *bceAB<sub>Bs</sub>* operon, the expression of which is strongly induced by bacitracin via a classical two-component system, BceRS<sub>Bs</sub> (5, 6, 8). After the addition of the antibiotic, the response regulator triggers the transcription of the *bceAB<sub>Bs</sub>* genes, probably strongly increasing the ABC protein level in the membrane. The putative transporter of ABC type, BceAB<sub>Bs</sub>, causes most of the resistance of the cells to bacitracin. When it is lacking, the IC<sub>50</sub> of the cells decreases from 251 to 6 μM (6). The second system, BcrC<sub>Bs</sub> (YwoA), is similar to BcrC<sub>Bl</sub> from *B. licheniformis* (3) and to BcrC<sub>Ec</sub> from *Escherichia coli* (9), both of which are involved in bacitracin resistance. BcrC<sub>Bs</sub> is encoded by the *bcrC<sub>Bs</sub>* (*ywoA*) structural gene and also participates, but to a lesser extent than BceAB<sub>Bs</sub>, in the *B. subtilis* resistance to bacitracin. When BcrC<sub>Bs</sub> is lacking, the IC<sub>50</sub> of the cells decreases from 251 to 31 μM (6). The expression of the *bcrC<sub>Bs</sub>* gene is also controlled by bacitracin but does not depend on the BceRS two-component system (6). Although the molecular mechanism of induction by bacitracin is not clear, it depends on σM, σX, and both σW and its cognate anti-σ, RsiW (4, 10).

BcrC<sub>Bl</sub> was formerly classified as a putative membrane-spanning domain of an ABC transporter (3). Accordingly, BcrC orthologs, which all have at least four putative transmembrane domains, have been annotated in databases as putative membrane proteins. Their predicted functions go from unknown to bacitracin transporter. All, however, also belong to the PF01569 Pfam family of PAP2 phosphatases, which contains more than 600 proteins. Some members of this family, but no BcrC orthologs, have a demonstrated phosphatase activity. This is the case, for instance, for PhoC from *Morganella morganii* (11) and *Zymomonas mobilis* (12), PhoN from *Salmonella typhimurium* (13), PgpB from *E. coli* (14), LpxE from *Rhizobium leguminosarum* (15), and two DOLPP1 orthologs from *Saccharomyces cerevisiae* and *Mus musculus* (16, 17). We then hypothesized (6) that such might also be the case for the BcrC<sub>Bs</sub> protein and that its true function would be to dephosphorylate UPP. To test these hypotheses, we purified and characterized the BcrC<sub>Bs</sub> protein from *B. subtilis*. We showed that BcrC<sub>Bs</sub> has

\* This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (to D. M.-L. and F. D.) and by grants from the European Community (Grant FP6, LSHM-CT-2003-503335, "COBRA" project) (to D. M.-L.) and from Hoechst Marion Roussel (Grant FRHMR2/9932) (to F. D.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipients of a scholarship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-91164387; Fax: 33-4-91718914; E-mail: denizot@ibsm.cnrs-mrs.fr.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: UPP, undecaprenyl pyrophosphate; UP, undecaprenyl phosphate; IPTG, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside; DM, *n*-dodecyl-β-D-maltoside; Ni<sup>2+</sup>-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; ABC, ATP binding cassette; PAP2, type 2 phosphatidic acid phosphatase; Pfam, Protein family.



TABLE I  
Strains and plasmids used in this study

Strains	Relevant characteristics	Relevant markers	Source/Construction
<i>B. subtilis</i>			
168	<i>trpC2</i>		Ref. 40
BFS82	168 <i>bceA'</i> - <i>lacZ</i>	<i>erm</i>	Micado website
BFS235	168 <i>bcrC'</i> - <i>lacZ</i>	<i>erm</i>	Micado website
BFS245	168 <i>yubB'</i> - <i>lacZ</i>	<i>erm</i>	Micado website
BSmrs173	168 <i>bcrC</i> :: <i>spec</i>	<i>spec</i>	Ref. 6
BSmrs168	BFS82 <i>bcrC</i> :: <i>spec</i>	<i>spec</i>	Ref. 6
BSmrs175	BSmrs173 carrying pDG148-Stu- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>spec, kan</i>	This work
BSmrs194	BSmrs168 carrying pDG148-Stu- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>erm, kan</i>	This work
BSmrs201	BFS245 <i>bcrC</i> :: <i>spec</i>	<i>spec</i>	This work
<i>E. coli</i>			
DH5α	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17 phoA supE44</i> λ <sup>-</sup> <i>thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>		Invitrogen
C41(DE3)	<i>dcm ompT hsdS</i> (rB mB) <i>gal</i> λ(DE3)/pLysS		Avidis S.A. (France)
Ecmrs144	C41(DE3) carrying pET22-Pml- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>amp</i>	This work
Ecmrs151	C41(DE3) carrying pDG148-Stu- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>amp, kan</i>	This work
Ecmrs150	DH5α carrying pDG148-Stu- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>amp, kan</i>	This work
Plasmids			
pDG148-Stu		<i>amp, kan</i>	Ref. 20
pDG148-Stu- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>bcrC</i> <sub>Bs</sub> cloned into pDG148-Stu; <i>Pspac-bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>amp, kan</i>	This work
pET22-Pml		<i>amp</i>	Ref. 21
pET22-Pml- <i>bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>bcrC</i> <sub>Bs</sub> cloned into pET22-Pml, <i>T7-bcrC</i> <sub>Bs</sub>	<i>amp</i>	This work

UPP phosphatase activity and that it is probably not involved in an ABC transport system.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions**—The bacterial strains and plasmids are listed in Table I. *E. coli* and *B. subtilis* strains were grown in Luria-Bertani broth medium. The following antibiotics were used: ampicillin at 50 μg/ml in *E. coli* and kanamycin, erythromycin, and spectinomycin at 20, 0.3, and 100 μg/ml, respectively, in *B. subtilis*. All antibiotics were from Sigma.

**General Molecular Biology Techniques**—Unless otherwise stated, all molecular biology procedures were carried out as described in Sambrook and Russell (18). DNA-modifying enzymes were used as recommended by the manufacturer (New England Biolabs). DNA fragments were purified using either a Microcon-30 (Millipore) or the Qiaquick nucleotide removal kit (Qiagen). Cloning of DNA was done either in *E. coli* DH5α or in *E. coli* C41(DE3) strain. PCR amplifications were done in a 50-μl final volume, using Yellow Star polymerase (Eurogentec) as recommended by the manufacturer. All oligonucleotides are listed in Table II. The interrupted *bcrC*<sub>Bs</sub> mutant was constructed following the modified long flanking homology-PCR method (5, 19) using the *bcrC1*, *bcrC2*, *bcrC3*, *bcrC4*, *2rspec2\_inv*, and *2rspec1\_inv* oligonucleotides (Table II).

**Cloning of the *bcrC*<sub>Bs</sub> Coding Sequence into the pDG148-Stu or the pET22-Pml Plasmid**—The entire *bcrC*<sub>Bs</sub> coding sequence was amplified by PCR from the *B. subtilis* chromosome using the BcrC(pdg)ATG and BcrC(pdg)stop oligonucleotides. The amplified DNA fragment was introduced into the pDG148-Stu plasmid (20). After transformation of the DH5α strain with the resulting mixture, plasmid carrying the DNA fragment was used to transform *B. subtilis* (wild type or mutant) or *E. coli* C41(DE3) strain.

A 779-bp DNA fragment encompassing the entire *bcrC*<sub>Bs</sub> coding sequence but lacking the start codon was amplified by PCR from the *B. subtilis* chromosome using the BcrC-dir and BcrC-rev oligonucleotides. It was then cloned into the pET22-Pml plasmid, a modified version of pET22b+ (Novagen), as described previously (21). The resulting mixture was used to transform either the DH5α or the C41(DE3) strain. In each case, the sequence inserted in the recombinant plasmid was checked by DNA sequencing.

**Preparation of Membrane Fraction and Purification of the BcrC<sub>Bs</sub> Protein**—*E. coli* C41(DE3) cells carrying the pET22-Pml-*bcrC*<sub>Bs</sub> plasmid were grown at 37 °C in LB medium supplemented with ampicillin (1-liter culture). When the absorbance at 600 nm reached 0.6, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 1 mM, and growth was continued for 4 h. Cells were harvested by low speed centrifugation, washed twice with 10 ml of cold 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride buffer, pH 8, supplemented with 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The cell pellet was suspended in 10 ml of the same buffer, and the cells were lysed, in the cold, by two successive passages through a French pressure cell (16,000 p.s.i.). Cold 500 mM EDTA (500 μl), pH 8,

was added to the resulting suspension and submitted to a 30-min centrifugation at 15,000 × *g* at 4 °C. Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM final concentration) was added to the resulting supernatant (crude extract) and then submitted to a 90-min centrifugation at 100,000 × *g* at 4 °C. The pellet was suspended and solubilized by *n*-dodecyl-β-D-maltoside (DM) (0.9%, w/v) following all the steps described by El Ghachi *et al.* (22). The BcrC<sub>Bs</sub> purification involved a final affinity step with Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetate agarose (Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose, from Qiagen) using the procedure recommended by the manufacturer.

**Bacitracin Sensitivity Assay**—The concentration of bacitracin leading to 50% of growth inhibition (IC<sub>50</sub>) was determined using the micro-titer tray assay described by Ohki *et al.* (4).

**UPP Phosphatase Assay**—UPP phosphatase activity of biological samples was determined as described previously (22).

**Bioinformatic Analysis**—Transmembrane domains in proteins were searched through the TMHMM program (23). Protein Blast (24) searches on *B. subtilis* were done on the SubtiList data base (25). Membership to a particular Pfam family (26) was defined using the Pfam database.

#### RESULTS

**Reserpine Does Not Affect BcrC<sub>Bs</sub> Functioning**—The plant alkaloid reserpine is a powerful inhibitor of both mammalian and Gram-positive bacterial efflux systems, and its inhibitory effect on bacteria ABC transporters is well documented (27, 28). Accordingly, the addition of reserpine (at sublethal concentration) during bacterial growth should drastically decrease the bacitracin resistance of the cells if this resistance is mostly due to an ABC transporter. If it is not, almost no effect should be observed. As shown in Fig. 1, the addition of reserpine to a culture of the *B. subtilis* 168 parental strain resulted in a 16-fold decrease in the cellular IC<sub>50</sub> for bacitracin, indicating that at least one system is strongly inhibited. Similarly, when the BcrC<sub>Bs</sub><sup>-</sup> BSmrs173 mutant in which only the putative ABC transporter BceAB<sub>Bs</sub> system is functional was grown in the presence of reserpine, the IC<sub>50</sub> of the cells was again dramatically decreased (18-fold). Inversely, reserpine had only a slight effect (less than 2-fold) on the IC<sub>50</sub> of the BceAB<sub>Bs</sub><sup>-</sup> BFS82 mutant in which the resistance to bacitracin depends only on the BcrC<sub>Bs</sub> system. Together, these results indicated that reserpine (i) inhibits the functioning of the BceAB<sub>Bs</sub> involved in *B. subtilis* resistance but (ii) does not affect that of BcrC<sub>Bs</sub>, making it very unlikely for this protein to be involved as a membrane-spanning domain partner in an ABC transporter.

**Overexpression of BcrC<sub>Bs</sub> Allows *B. subtilis* and *E. coli* to Stand Higher Concentrations of Bacitracin**—When the

TABLE II  
Oligonucleotides used in this study

Oligo	Sequence (5' to 3')
BcrC(pdg)ATG	TGAACTACGAAATTTTAAAGCAATC
BcrC(pdg)stop	GGTTTATATGTGTTGGCGAAGC
bcrC1	GCGTCTTCGCGGCCAGCTAAAAGGGTGCTGAAAACG
bcrC2	TCCGTGCCCTCCTGGAGAGATAGTCCATGGATTGCTTTA
bcrC3	GCTTGGCTGTGTCGGAGTGAGGATCTACGAAGCCATTATC
bcrC4	CGCTGCGTCGGTTGAGTGTGACATATTTGCTGTGGA
2rspec1_inv	CCGACACAGCCAAGCTCGATTTTCGTTTCGTGAATACATG
2rspec2_inv	CCAGGAGGGCACGGATACCAATTAGAATGAATATTTCCC
BcrC-dir	TTGAACTACGAAATTTTAAAGC
BcrC-rev	GGACGCGCCGTGTTTATATGTGTTGGCGAAGC

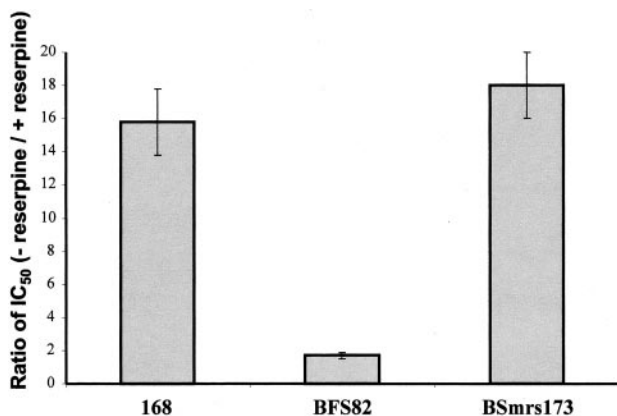


FIG. 1. Effect of reserpine on the bacitracin resistance of different *B. subtilis* strains. Cultures were done as described previously (4) in a 96-well titer plate, and the OD was monitored using a TECAN microtiter tray reader at 620 nm. IC<sub>50</sub> is determined for each strain and corresponds to the bacitracin concentration giving 50% of cell survival. Reserpine was used at a final 40  $\mu$ M concentration. For each strain, the results correspond to the mean of IC<sub>50</sub> value in the absence of reserpine divided by the IC<sub>50</sub> value in the presence of reserpine for three different experiments. Bars indicate the standard deviation. *B. subtilis* strain or mutants are as follows: 168, wild type; BFS82, *bceA*; BSmsr173, *bcrC*.

pDG148-Stu-*bcrC*<sub>Bs</sub> overexpression plasmid was introduced into DH5 $\alpha$  or C41(DE3) strain, the IC<sub>50</sub> of the cells for bacitracin increased 3-fold in cells grown with 1 mM IPTG (data not shown). This increase indicates that the BcrC<sub>Bs</sub> protein is also active in *E. coli* and that it allows the cell to resist to higher concentrations of the antibiotic. As shown on Fig. 2, when the pDG148-Stu-*bcrC*<sub>Bs</sub> plasmid was introduced into the *B. subtilis* *bcrC*<sub>Bs</sub> *bceA*<sub>Bs</sub> double mutant, the resistance to bacitracin of the mutant increased 8-fold; the IC<sub>50</sub> of the cells rose from 0.9 to 7.4  $\mu$ M. A similar increase was observed with the *B. subtilis* *bcrC*<sub>Bs</sub> mutant (IC<sub>50</sub> rose from 31 to 420  $\mu$ M). All these data indicated that the native BcrC<sub>Bs</sub> protein can participate in the resistance to bacitracin in *B. subtilis* and in *E. coli*.

The *bcrC*<sub>Bs</sub> coding sequence was then cloned into a modified version of the pET22-Pml expression vector (21) immediately downstream from the His<sub>6</sub> tag coding sequence carried by the vector, leading to plasmid pET22-Pml-*bcrC*<sub>Bs</sub>. In this construction, expression of the gene fusion encoding a His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> hybrid protein is controlled by the addition of IPTG. After growth in the presence of IPTG of the C41(DE3)/pET22-Pml-*bcrC*<sub>Bs</sub> strain, the IC<sub>50</sub> of the cells for bacitracin increased from 1.4 to 5.6 mM, indicating that this hybrid protein is active (data not shown).

**Overexpression of BcrC<sub>Bs</sub> Increases UPP Phosphatase Activity**—The *E. coli* C41(DE3) cells harboring plasmid pET22-Pml-*bcrC*<sub>Bs</sub> were grown without IPTG to be used as control cells or with 1 mM IPTG to overproduce the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein for further studies. Crude extracts and membrane fractions prepared from these cells, as indicated under "Materials and Methods," were analyzed by SDS-PAGE. Coomassie Blue stain-

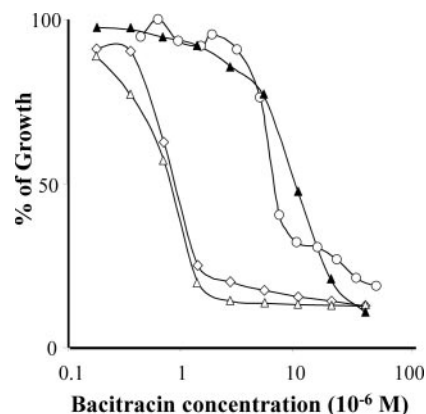


FIG. 2. Bacitracin resistance of *B. subtilis* strains overexpressing or not BcrC<sub>Bs</sub>. Experiments were done as described in legend for Fig. 1. Open diamond, BSmsr168 strain (*bcrC bceA*); open circle, BFS82 (*bceA*); open triangle, BSmsr194 (*bcrC bceA/pbcrC*<sup>+</sup>); closed triangle, BSmsr194 (*bcrC bceA/pbcrC*<sup>+</sup>) + IPTG. IPTG was used at a final 1 mM concentration. Data were reproduced in at least three different experiments.

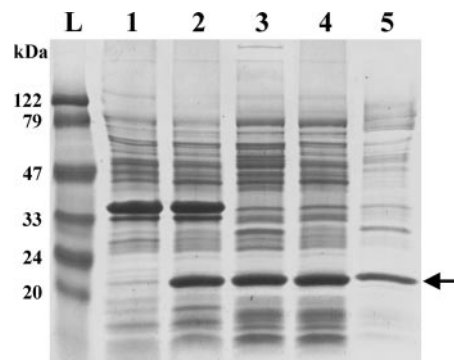


FIG. 3. SDS-PAGE of different fractions during BcrC<sub>Bs</sub> purification. His<sub>6</sub>-tagged BcrC<sub>Bs</sub> protein was overproduced in *E. coli* C41(DE3) (strain ECmrs144) and submitted to different purification steps. Fractions were subjected to electrophoresis on a 12.5% acrylamide gel. L, ladder of molecular mass standards corresponding to  $\beta$ -galactosidase, 122 kDa; bovine serum albumin, 79 kDa; ovalbumin, 47 kDa; carbonic anhydrase, 33 kDa;  $\beta$ -lactoglobulin, 24 kDa; and lysozyme, 20 kDa. Lane 1, crude lysate of non-induced bacteria; lanes 2–5, crude lysate, membrane preparation, DM1 extract of membrane preparation, and DM2 extract of membrane preparation, respectively, of induced bacteria. Bacterial induction was done at a 1 mM final concentration of IPTG. The arrow points toward the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein, which migrates as a 22-kDa protein.

ing of the gel (Fig. 3, lanes 1–3) showed a broad band corresponding to a protein species of about 22 kDa, the size expected for the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> hybrid protein, in the membrane fraction of the cells in which the expression of the gene had been induced by IPTG. Scanning of the stained gel indicated that this band represented almost 41% of all membrane proteins. In contrast, no such band was detected in the soluble fraction of the same cells or in soluble fractions of the cells grown without IPTG

TABLE III  
 UPP-phosphatase activity of fractions obtained during His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> purification

The following samples were tested during His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> purification from Ecmrs144 bacteria over-expressing the protein after induction with 1 mM IPTG (see "Materials and Methods"): *membrane*, enriched membrane fraction after high speed centrifugation; *DM1*, first step of DM extraction, *flow-through and washes*, pool of flow-through and 10 mM imidazole containing washing fractions; *30 mM*, *60 mM* and *80 mM*, fractions eluted with 30 mM, 60 mM and 80 mM imidazole, respectively; *purified His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub>*, purified fraction eluted with 300 mM imidazole from the Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column.

	Protein amounts <sup>a</sup>	Estimated His <sub>6</sub> -BcrC <sub>Bs</sub> <sup>b</sup>		UPP-phosphatase activity <sup>d</sup>
		mg ± S.D.	Amounts	
		mg	%	nmol/min/mg of protein ± S.D.
Membrane	10.05 ± 0.4	4.1		198 ± 9
DM1	6.75 ± 0.3	3.3	100	230 ± 18
Flow-through and washes	4.7 ± 0.2	1.9	58	ND <sup>e</sup>
30 mM	1 ± 0.1	0.2	6	ND <sup>e</sup>
60 mM	0.4 ± 0.05	0.32	9.7	ND <sup>e</sup>
80 mM	0.6 ± 0.05	0.56	17	ND <sup>e</sup>
Purified His <sub>6</sub> -BcrC <sub>Bs</sub>	0.12 ± 0.006	0.12	3.6	730 ± 60

<sup>a</sup> Protein amounts were determined using Bradford (Bio-Rad) and/or BCA (Sigma) kits. Values are expressed as the mean of three measurements for each method of quantification.

<sup>b</sup> His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> amounts were estimated after scanning with a Bio-Rad GS-800 densitometer of a Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel on which the different fractions were loaded.

<sup>c</sup> Yield is calculated with DM1 fraction as reference.

<sup>d</sup> UPP-phosphatase activities are expressed as the mean of three determinations with the same sample ± S.D.

<sup>e</sup> ND, not determined.

(data not shown). There was, however, a faint band at the same position in the crude extract of non-induced cells, probably due to a leakage of the promoter controlling the T7 polymerase expression (Fig. 3, lane 1).

The identification of this ~22-kDa protein species with the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein was confirmed by Western blot detection using antibodies directed against the His<sub>6</sub> tag. As expected, no signal could be detected in the other soluble fractions (see above), indicating that the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> hybrid protein is totally inserted in the membrane (data not shown). Although this protein seemed to be present in the membrane of the non-induced control cells, it was not detected by the antibody, probably because it has a low affinity for the His tag. UPP phosphatase activity was then determined as described previously (22) in membrane fractions originating from control cells and from cells overproducing the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein. The membrane fraction from the non-induced C41(DE3)/pET22-Pml-bcrC<sub>Bs</sub> cells already has UPP phosphatase activity, which reaches 13.5 ± 0.5 nmol of UPP transformed per minute and per mg of protein (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). This level was higher than that found (0.3 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) in a membrane preparation from the C43(DE3) *E. coli* strain containing the plasmid without insert, and it probably reflects a leakage of the T7 polymerase promoter that controls the expression of the inserted gene in the pET22-Pml plasmid.

As expected, however, a much higher level of UPP phosphatase activity, up to 198 ± 9 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (a 660-fold increase), was observed in the membrane fraction originating from the C41(DE3)/pET22-Pml-bcrC<sub>Bs</sub> cells in which expression of the tagged BcrC<sub>Bs</sub> protein had been induced. This observation strongly supported the hypothesis that the BcrC<sub>Bs</sub> protein has UPP phosphatase activity. Accounting for the very low basal level of UPP phosphatase activity in *E. coli* cell membranes (0.3 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> corresponds to almost all the activity detected in the membrane preparation coming from the induced cells. In this fraction in which the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein represents 41 ± 1% of all proteins, the specific activity of the pure membrane-embedded His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein can be estimated to be greater than 450 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>.

*Purified BcrC<sub>Bs</sub> Protein Displays UPP Phosphatase Activity*—The detergent DM is efficient for extracting the BacA<sub>Ec</sub> protein from membranes of *E. coli* cells (22). Accordingly, the membrane fractions originating from the C41(DE3)/pET22-

Pml-bcrC<sub>Bs</sub> cells overproducing or not the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein were subjected to four successive extraction treatments with DM, leading to fractions DM1–4. SDS-PAGE analysis of each fraction followed by Coomassie Blue staining and scanning of the gel indicated that up to 93% of the membrane proteins were recovered in fractions DM1 and DM2 (Fig. 3, lanes 4 and 5). The His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein was observed in the DM1 and DM2 fractions but not in the DM3 and DM4 fractions. Scanning of the Coomassie Blue stained gel indicated that the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein, if alone in the 22-kDa band, represented 49 ± 1% of the proteins of fraction DM1. The UPP phosphatase activity of this fraction reached 230 ± 18 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Table III). Thus, because the estimated specific activities of the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein before and after DM extraction were similar, the protein is apparently not damaged during this extraction step.

6.7 mg of proteins (supposedly containing 3.3 mg of the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein, Table III) from the DM1 fraction was subjected to Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose purification. Each fraction (flow-through, washes, and elutions with imidazole) was then analyzed for its protein content by SDS-PAGE analysis followed by Coomassie Blue staining (Fig. 4) and Western blot analysis (data not shown). 4.7 mg of proteins (supposedly containing 1.9 mg of the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein, Table III) was recovered in the flow-through, washes, and 10 mM imidazole pooled fraction. Thus, almost 58% of the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein was not retained on the Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column, explaining the very poor yield of His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> purification. This might be due to a low affinity of the His<sub>6</sub>-BcrC protein for Ni<sup>2+</sup>-NTA in the presence of *n*-dodecyl-β-D-maltoside. The His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein was detected in the 30, 60, and 80 mM imidazole fractions (0.2, 0.32, and 0.56 mg, respectively; Table III). Unfortunately, all these fractions contained some contaminant proteins as judged on SDS-PAGE gel (Fig. 4). Only the last elution fraction done with 300 mM imidazole showed a single band corresponding to the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein (Fig. 4) and allowed us to recover about 0.12 mg of protein. Determination of its UPP phosphatase activity indicated that it has a specific activity of 730 ± 60 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Table III).

When comparing our purification procedure to that used for BacA<sub>Ec</sub> (see "Materials and Methods"), it appeared that the additional low speed centrifugation step greatly facilitates the action of the mild detergent used to extract the proteins from membranes. The elimination of large debris and unbroken cells before the high speed centrifugation step led to a membrane



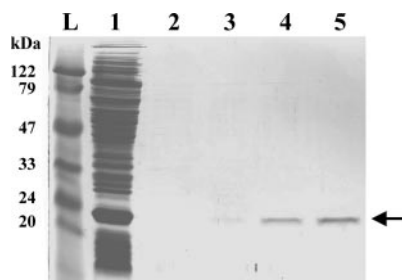


FIG. 4. SDS-PAGE of fractions during the final steps of His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> purification. A one-step purification on Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose was performed as described under "Materials and Methods." Aliquots of purified material were subjected to SDS-PAGE and compared with an aliquot of the membrane preparation. L, ladder of molecular mass standards (see the legend for Fig. 3). Lane 1, DM1 extract of membrane preparation; lanes 2–5, 10, 30, 80, and 300 mM imidazole eluate fractions, respectively. The arrow indicates the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein.

preparation devoid of jamming material and thus more susceptible to the DM treatment and also allowed a better extraction of all membrane-embedded proteins, with 80% of them extracted in the first DM fraction.

*BcrC<sub>Bs</sub> Protein Is Not Active on Bacitracin-bound UPP*—The UPP phosphatase activity of the purified His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein was determined in the presence of various concentrations of bacitracin and was compared with that of the native membrane-embedded enzyme. For that purpose, we used aliquots of both preparations giving the same percentage of substrate transformation. As seen in Fig. 5, similar results were obtained with both preparations, the fraction of dephosphorylated substrate remaining almost unaffected as long as the concentration of the antibiotic was lower than the initial concentration of the substrate. When both concentrations were of the same order, the activity started to decrease in parallel with the increase in bacitracin concentration. According to the association constant (10<sup>-6</sup> M) between UPP and bacitracin (1) and assuming that there is no interaction between bacitracin and the enzyme, our results indicated that the enzyme, native or solubilized, has no access to bacitracin-bound UPP and acts only on free UPP.

*Research of Other Putative UPP Phosphatases in B. subtilis*—As the *B. subtilis* bcrC<sub>Bs</sub> deleted mutant could still grow, we looked within the protein sequences of the bacterium for other proteins able to synthesize or recycle UPP. First, we focused on possible *B. subtilis* ortholog(s) of BacA<sub>Ec</sub> UPP phosphatase (22). In the Pfam data base, BacA<sub>Ec</sub> belongs to the PF02673 family, whereas BcrC<sub>Bs</sub> and BcrC<sub>B1</sub> belong to the PF01569 family. Using BacA<sub>Ec</sub> to scan all the putative proteins from *B. subtilis*, only one hypothetical protein, YubB<sub>Bs</sub>, showed a high score after Blast screening. A yubB<sub>Bs</sub> mutant, obtained by insertion of the pMUTIN plasmid (29), was constructed by the *B. subtilis* functional analysis consortium (30). This suggested that YubB<sub>Bs</sub> might not be essential in *B. subtilis*, although Cao and Helmann (10) did not succeed in obtaining a yubB<sub>Bs</sub> deletion mutant. It is worth noting that deletion mutants have been reported for the bacA orthologous genes in *E. coli* (22), *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* (31). We constructed the yubB<sub>Bs</sub> bcrC<sub>Bs</sub> double mutant, which grew perfectly in LB medium and presented the same sensitivity to bacitracin as the single bcrC<sub>Bs</sub> mutant (data not shown). These results suggested that (i) YubB<sub>Bs</sub> does not contribute significantly to bacitracin resistance in *B. subtilis* and (ii) at least one other protein might be required for UP and peptidoglycan synthesis in this double mutant.

#### DISCUSSION

BLAST analysis indicated that BcrC<sub>Bs</sub> presents the most similarities with proteins from Gram-positive bacteria such as

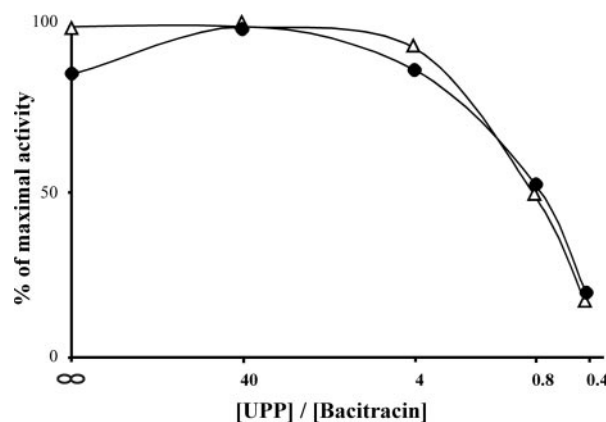


FIG. 5. Inhibition by bacitracin of UPP phosphatase activity from native and purified His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> proteins. Phosphatase activity was tested as described under "Materials and Methods" on [<sup>14</sup>C]UPP used at a 2.7 μM final concentration. Bacitracin was premixed to the substrate before adding the biological samples to test. Different concentrations of bacitracin were used to obtain the indicated UPP/bacitracin concentration ratios. After 1 h of incubation at 37 °C, samples were subjected to thin layer chromatography as described previously (22). Full circles, purified BcrC<sub>Bs</sub> protein; open triangles, membrane embedded BcrC<sub>Bs</sub> protein.

*Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, and *Clostridium acetobutylicum* and from Gram-negative bacteria such as *Methanosarcina masei*, *Salmonella typhi*, and *E. coli*, all predicted to belong to the PF01569 Pfam family of PAP2 phosphatases. Because bacitracin prevents the dephosphorylation of UPP into UP, we had hypothesized (6) that the BcrC<sub>Bs</sub> protein might be an intrinsic membrane phosphatase with UPP phosphatase activity that competed with bacitracin for UPP, rather than the membrane-spanning domain partner of an ABC transporter.

A first indication of the non-inference of BcrC<sub>Bs</sub> in a transport system is provided by the plant alkaloid reserpine, a strong inhibitor of efflux systems. Reserpine has only a marginal effect on the bacitracin resistance due to the BcrC<sub>Bs</sub> protein, but it drastically affects that due to the putative transporter BceAB<sub>Bs</sub>. The inhibitory effect of reserpine on BceAB<sub>Bs</sub> suggested that it participates in active transport, but this is unlikely for BcrC<sub>Bs</sub> because reserpine does not inhibit this protein. This latter point prompted us to check whether BcrC<sub>Bs</sub> has UPP phosphatase activity.

The native BcrC<sub>Bs</sub> protein was overproduced in *B. subtilis* or *E. coli*, and a His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> tagged protein was overproduced in *E. coli*. In each case, a strong stimulation of the resistance of the cells to bacitracin was observed, indicating that the respective proteins are functional in both bacteria. After several purification steps, the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein was observed in the membrane fraction but not in the soluble fraction of the ultracentrifugation step, which confirmed that BcrC<sub>Bs</sub> is an intrinsic membrane protein.

As the membrane fraction enriched in the His<sub>6</sub>-BcrC<sub>Bs</sub> protein had significantly increased UPP phosphatase activity, the protein was purified by the same protocol as that for BacA<sub>Ec</sub> of *E. coli*, the only protein known to have UPP phosphatase activity (22). The electrophoretically pure extracted BcrC<sub>Bs</sub> protein had a significant UPP phosphatase specific activity of the same order of magnitude as that of BacA<sub>Ec</sub> (2200 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) (22).

The specific activity of the electrophoretically pure extracted BcrC<sub>Bs</sub> protein did not differ significantly from that of the membrane-embedded BcrC<sub>Bs</sub> protein (730 versus 450 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), and no protein had access to the bacitracin-bound UPP. That the protein presents the same enzymatic

characteristics in different environments suggests that it has not been dramatically affected by the extraction procedure. One can then hypothesize that the quaternary structure of the solubilized form may not be very different from that of the membrane form, at least in the vicinity of the active center. This consideration is of interest for any structure/function study of the BcrC<sub>Bs</sub> UPP phosphatase.

Although BcrC<sub>Bs</sub> and BacA<sub>Ec</sub> belong to completely different Pfam families, their specific activities are highly similar. Thus, for the first time, the enzymatic characterization of a BcrC<sub>Bs</sub> protein has been performed and, as we had suggested in an earlier publication (6), the BcrC<sub>Bs</sub> protein has UPP phosphatase activity and is probably not involved in the formation of an ABC transporter. It is then tempting to postulate that this will be true for all BcrC orthologs and that they all have UPP phosphatase activity.

Only 24 members of the PAP2 superfamily have been biochemically characterized; all others are considered putative or hypothetical proteins. All 24 characterized proteins but two display phosphatase activity. Interestingly, the UPP phosphatase activity of the BcrC<sub>Bs</sub> protein enlarges the spectrum of the phosphatases of the PAP2 protein superfamily known to contain acid and neutral phosphatases (32, 33), lipid A 1-phosphatase (15), phosphotyrosyl phosphatase (34), glucose-6-phosphatase (35), phosphatidylglycerophosphate phosphatase (14), dolichylpyrophosphate phosphatase (16), lipid phosphate phosphohydrolase (36), diacylglycerol pyrophosphate phosphatase (37), and sphingosin-1-phosphate phosphatase (38) (only one reference is given for each type of substrate). Closer examination in the UniProt data base of the two proteins of the PAP2 superfamily, Q6U5Q3 and Q6WB33, referred to as signal peptidases, reveals that they bear, in addition to the PAP2 domain, a Peptidase\_A8 domain (PF01252) responsible for signal peptidase activity (39). It is then probable that all members of the PAP2 superfamily have phosphatase activity in addition to other enzymatic activity or not.

In *B. subtilis*, BcrC<sub>Bs</sub> participates in bacitracin resistance concomitantly with the BceAB system, and their structural genes belong to the bacitracin regulon (5). The present work showed that BcrC<sub>Bs</sub> acts as a UPP phosphatase, thus i) withdrawing the bacitracin target and ii) participating in UP metabolism. As pointed out in the Introduction, UP is a carrier lipid essential for the synthesis of many cell wall polymers, and the bacterium requires a minimal level of global UPP phosphatase for growth. That no growth defect could be observed in the *B. subtilis* bcrC<sub>Bs</sub> mutant indicates that the BcrC<sub>Bs</sub> enzyme is dispensable and that other protein(s) fulfill the need for UPP phosphatase. The YubB<sub>Bs</sub> protein could be a candidate since it is orthologous to BacA<sub>Ec</sub>. The yubB<sub>Bs</sub> mutant being viable without visible growth defect, the YubB<sub>Bs</sub> protein also seems to be dispensable. Since a yubB<sub>Bs</sub> bcrC<sub>Bs</sub> double mutant is also viable without visible growth defect, we are currently looking for another protein able to ensure the viability of this *B. subtilis* double mutant.

**Acknowledgments**—The authors gratefully acknowledge Marilyne Foglino for helpful discussions and Athel Cornish-Bowden for careful reading of the manuscript and Gary Burkhardt for intensive linguistic revision.

#### REFERENCES

- Storm, D. R., and Strominger, J. L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3940–3945
- Siewert, G., and Strominger, J. L. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **57**, 767–773
- Podlasek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R., and Grabnar, M. (1995) *Mol. Microbiol.* **16**, 969–976
- Ohki, R., Tateno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., Murata, M., and Aiso, T. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 51–59
- Mascher, T., Margulis, N. G., Wang, T., Ye, R. W., and Helmann, J. D. (2003) *Mol. Microbiol.* **50**, 1591–1604
- Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M., and Denizot, F. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 93–97
- Quentin, Y., Fichant, G., and Denizot, F. (1999) *J. Mol. Biol.* **287**, 467–484
- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**, 1135–1144
- Harel, Y. M., Bailone, A., and Bibi, E. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 6176–6178
- Cao, M., and Helmann, J. D. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 6123–6129
- Thaller, M. C., Berlutti, F., Schippa, S., Lombardi, G., and Rossolini, G. M. (1994) *Microbiology (Read.)* **140**, 1341–1350
- Pond, J. L., Eddy, C. K., Mackenzie, K. F., Conway, T., Borecky, D. J., and Ingram, L. O. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 767–774
- Kasahara, M., Nakata, A., and Shinagawa, H. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 6760–6765
- Icho, T. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 5117–5124
- Karbarz, M. J., Kalb, S. R., Cotter, R. J., and Raetz, C. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39269–39279
- Fernandez, F., Rush, J. S., Toke, D. A., Han, G. S., Quinn, J. E., Carman, G. M., Choi, J. Y., Voelker, D. R., Aebi, M., and Waechter, C. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 41455–41464
- Rush, J. S., Cho, S. K., Jiang, S., Hofmann, S. L., and Waechter, C. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45226–45234
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Wach, A. (1996) *Yeast* **12**, 259–265
- Joseph, P., Fantino, J. R., Herbaud, M. L., and Denizot, F. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **205**, 91–97
- Joseph, P., Guiseppi, A., Sorokin, A., and Denizot, F. (2004) *Microbiology (N.Y.)* **150**, 2609–2617
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D., and Mengin-Lecreux, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30106–30113
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**, 175–182
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
- Moszer, I., Glaser, P., and Danchin, A. (1995) *Microbiology (N.Y.)* **141**, 261–268
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M., and Sonnhammer, E. L. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 276–280
- Choudhuri, B. S., Bhakta, S., Barik, R., Basu, J., Kundu, M., and Chakrabarti, P. (2002) *Biochem. J.* **367**, 279–285
- Pasca, M. R., Guglielame, P., Arcesi, F., Bellinzoni, M., De Rossi, E., and Riccardi, G. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3175–3178
- Vagner, V., Dervyn, E., and Ehrlich, S. D. (1998) *Microbiology (N.Y.)* **144**, 3097–3104
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S. C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L. C., Danchin, A., Debarbouille, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S. K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S. J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C. R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M. F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauel, C., Meima, R., Mellado, R. P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H. M., Rapoport, G., Rawlins, J. P., Rivas, L. A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H. H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J. F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H. B., Vagner, V., van Dijk, J. M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U., and Ogasawara, N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4678–4683
- Chalker, A. F., Ingraham, K. A., Lunsford, R. D., Bryant, A. P., Bryant, J., Wallis, N. G., Broskey, J. P., Pearson, S. C., and Holmes, D. J. (2000) *Microbiology (N.Y.)* **146**, 1547–1553
- Ishihara, K., and Kuramitsu, H. K. (1995) *Infect. Immun.* **63**, 1147–1152
- Uchiya, K. I., Tohsuji, M., Nikai, T., Sugihara, H., and Sasakawa, C. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 4548–4554
- Chen, X., Ansai, T., Awano, S., Iida, T., Barik, S., and Takehara, T. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 7107–7114
- Shelly, L. L., Lei, K. J., Pan, C. J., Sakata, S. F., Ruppert, S., Schutz, G., and Chou, J. Y. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21482–21485
- Toke, D. A., Bennett, W. L., Oshiro, J., Wu, W. I., Voelker, D. R., and Carman, G. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14331–14338
- Toke, D. A., Bennett, W. L., Dillon, D. A., Wu, W. I., Chen, X., Ostrand, D. B., Oshiro, J., Cremesti, A., Voelker, D. R., Fischl, A. S., and Carman, G. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3278–3284
- Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M., and Igarashi, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 1268–1272
- Innis, M. A., Tokunaga, M., Williams, M. E., Loranger, J. M., Chang, S. Y., Chang, S., and Wu, H. C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3708–3712
- Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961) *J. Bacteriol.* **81**, 741–746

## Resistance to Bacitracin in *Bacillus subtilis*: Unexpected Requirement of the BceAB ABC Transporter in the Control of Expression of Its Own Structural Genes<sup>∇†</sup>

Remi Bernard,<sup>‡</sup> Annick Guiseppi, Marc Chippaux, Maryline Foglino, and François Denizot\*

Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France

Received 18 July 2007/Accepted 18 September 2007

**The *Bacillus subtilis* BceAB ABC transporter involved in a defense mechanism against bacitracin is composed of a membrane-spanning domain and a nucleotide-binding domain. Induction of the structural *bceAB* genes requires the BceR response regulator and the BceS histidine kinase of a signal transduction system. However, despite the presence of such a transduction system and of bacitracin, no transcription from an unaltered *bceA* promoter is observed in cells lacking the BceAB transporter. Expression in *trans* of the BceAB transporter in these *bceAB* cells restores the transcription from the *bceA* promoter. Cells possessing a mutated nucleotide-binding domain of the transporter are also no longer able to trigger transcription from the *bceA* promoter in the presence of bacitracin, although the mutated ABC transporter is still bound to the membrane. In these cells, expression of the *bceA* promoter can no longer be detected, indicating that the ABC transporter not only must be present in the cell membrane, but also must be expressed in a native form for the induction of the *bceAB* genes. Several hypotheses are discussed to explain the simultaneous need for bacitracin, a native signal transduction system, and an active BceAB ABC transporter to trigger transcription from the *bceA* promoter.**

Bacitracin is an antibiotic composed of a complex mixture of branched cyclic dodecylpeptides synthesized by some species of bacilli. In the presence of divalent metal ions needed for its biological activity, bacitracin binds to undecaprenyl pyrophosphate (UPP) (33), leading to the arrest of bacterial peptidoglycan biosynthesis. Indeed, during this cellular process, undecaprenyl phosphate (UP) serves as a lipid carrier and is essential for the synthesis of many cell wall polymers. In the case of peptidoglycan biosynthesis, UP is responsible for the translocation of peptidoglycan building blocks from the cytosol to the external side of the cytoplasmic membrane. Transfer of these precursors to the extremity of the nascent peptidoglycan chain releases UPP, which is then dephosphorylated by UPP phosphatases, regenerating the UP. By preventing this recycling step, the binding of bacitracin to UPP reduces the amount of UP available for peptidoglycan precursor translocation, thus impeding further peptidoglycan synthesis and eventually leading to cell lysis.

Due to the presence of an outer membrane, gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, are not very susceptible to bacitracin, and various UPP phosphatases ensure a high level of resistance (6). UPP phosphatases of the PAP2 family, such as BcrC in *Bacillus subtilis* (formerly YwoA) (3), are found in some gram-positive bacteria, in which they compete with bac-

itracin for UPP, thus conferring a certain level of protection on the cells (4, 23). The bacitracin producer *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 possess two PAP2 family members, BcrC and a BcrC-like protein (YP\_080959) (21, 27, 38). However, in addition to the UPP phosphatases, some gram-positive bacteria also possess an ABC transporter(s), which is an even more efficient bacitracin protection system. Such is the case for *B. subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, and *B. licheniformis* ATCC 10716 (4, 17, 19, 21, 22, 36). However, the mechanism by which these transporters mediate bacitracin resistance remains unknown. According to the ABCDB database (<http://www-abcdb.biotoul.fr/>) (28), these ABC transporters fall into two different families. BcrAB from *B. licheniformis* and BcrAB from *E. faecalis* belong to family 7, and both the elements controlling the expression of their structural genes and the way these elements operate differ (21). Family 9 contains BceAB from *B. subtilis*, YtsCD from *B. licheniformis*, and MbrAB from *S. mutans*, each genetically and functionally linked to a signal transduction system including a histidine kinase and a response regulator (4, 22, 36, 38).

BceAB from *B. subtilis* is composed of a nucleotide-binding domain (NBD) (BceA) and a membrane-spanning domain (BceB). The *bceA* and *bceB* cognate structural genes constitute a transcriptional unit whose expression is under the control of the BceRS signal transduction system (4, 22). In a classical view of the phenomenon, after detecting the presence of bacitracin, the BceS histidine kinase is thought to autophosphorylate and to activate the BceR response regulator by transphosphorylation (32). Once activated, the phosphorylated regulator can modulate the expression of its main target genes, including the *bceAB* operon. However, unlike most histidine kinases, BceS does not possess an extracytoplasmic input domain. Classified in the intramembrane-sensing histidine kinase family (18), it is supposed to sense a signal at the level of the

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France. Phone: (33) 491164387. Fax: (33) 491718914. E-mail: denizot@ibsm.cnrs-mrs.fr.

‡ Present address: Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 28 September 2007.



TABLE 1. *E. coli* and *B. subtilis* strains used in this study

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\lambda^-$ $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( $r_K^-$ $m_K^-$ ) <i>supE44</i> <i>thi-1 gyrA relA1</i>	Invitrogen
C41DE3	F $^-$ <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ $m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Avidis S. A., France
<i>B. subtilis</i>		
Wild type 168	<i>trpC2</i>	1
BSGY005	168 <i>amyE::bceAp::lacZ</i> ; Cm $^r$	22
BFS82	168 <i>bceA::pMUTIN::lacZ</i> ; Em $^r$	Micado web site
BFS83	168 <i>bceB::pMUTIN::lacZ</i> ; Em $^r$	Micado web site
BSmrs92	BFS82/pDG <i>bceR</i> ; Em $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs171	BFS82/pDG <i>bceA</i> ; Em $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs197	BSGY005/pDG <i>bceR</i> ; Em $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs230	BSGY005/pDG; Cm $^r$ Em $^r$	This study
BSmrs231	BSGY005/pDG <i>His<sub>6</sub>-bceA(E169A)</i> ; Cm $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs232	BSGY005/pDG <i>His<sub>6</sub>-bceA</i> ; Cm $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs241	BFS83/pDG <i>bceAB</i> ; Em $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs246	BFS82/pDG <i>His<sub>6</sub>-bceA</i> ; Em $^r$ Km $^r$	This study
BSmrs247	BFS82/pDG <i>His<sub>6</sub>-bceA(E169A)</i> ; Em $^r$ Km $^r$	This study

membrane or within it, and it has been postulated that BceS may detect either the bacitracin-UPP complex directly or, alternatively, a perturbation of the cell envelope structure (19).

To better understand the induction process of the *bceAB* genes, we used a strain carrying a *bceA::lacZ* transcriptional fusion due to a pMUTIN plasmid insertion (37). Unexpectedly, we observed that the *bceA::pMUTIN* mutant was unable to express the *lacZ* gene upon addition of bacitracin. This paper reports the surprising observation that the BceAB ABC transporter is required, together with the BceRS transduction system, for *B. subtilis* to trigger transcription from its own promoter in the presence of bacitracin in the medium.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1 and Table S1 in the supplemental material, respectively. All complementations *in trans* were done using the pDG148-Stu plasmid (which is referred to as pDG below) as a vector, following the procedure described previously (11). In each case, the sequence of the recombinant plasmid was checked by DNA sequencing. The BFS82 and BFS83 strains were obtained from the Japanese/European Consortium for *B. subtilis* Genome Function Analysis (14). Strain BSGY005 (22) was kindly provided by Kazuo Kobayashi. *E. coli* and *B. subtilis* were grown in Luria broth (LB) at 37°C with aeration. Unless otherwise stated, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was present throughout growth at a 1 mM final concentration and  $\beta$ -galactosidase activity was determined in cells collected 1 hour after bacitracin addition at mid-exponential growth phase.

Recombinant strains were grown in medium containing antibiotics at the following concentrations: ampicillin (50  $\mu$ g ml $^{-1}$ ) for *E. coli* and erythromycin (0.3  $\mu$ g ml $^{-1}$ ), kanamycin (20  $\mu$ g ml $^{-1}$ ), tetracycline (10  $\mu$ g ml $^{-1}$ ), and chloramphenicol (5  $\mu$ g ml $^{-1}$ ) for *B. subtilis*. All antibiotics were from Sigma-Aldrich.

**General molecular biology techniques.** Unless otherwise stated, all molecular biology procedures were carried out as described by Sambrook and Russell (30). DNA fragments were purified using either a Microcon-30 (Millipore) or the Qiaquick nucleotide removal kit (Qiagen). Cloning of DNA was done in either the *E. coli* DH5 $\alpha$  or C41DE3 strain. PCR amplifications were done in a 50- $\mu$ l final volume, using Expand high-fidelity PCR (Roche Diagnostics) as recommended by the manufacturer. Plasmid purifications were done using either a plasmid Midi kit or a plasmid Mini kit from Qiagen.

All oligonucleotides used in this study are listed in Table S2 in the supplemental material.

**mRNA preparation, cDNA synthesis, and quantitative PCR.** All mRNA preparation, cDNA synthesis, and quantitative PCR procedures were done as previously described (12).

**Obtaining *His<sub>6</sub>-bceA* and *His<sub>6</sub>-bceA(E169A)* genes. (i) *bceA* cloning into the pET22-Pml plasmid.** An 831-bp DNA fragment encompassing the entire *bceA* coding sequence but lacking the start codon was obtained by PCR using *bceA-dir* and *bceA-rev* as primers (see Table S2 in the supplemental material) and *B. subtilis* genomic DNA as a template. The fragment was cloned into the pET22-Pml plasmid as described previously (13). The recombinant plasmid pET22-Pml-*bceA* was used to transform *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . The sequence of the entire insert was checked.

**(ii) Site-directed mutagenesis of the pET22-Pml-*bceA* plasmid.** Mutagenesis was performed on the pET22-Pml-*bceA* plasmid as described previously (2) using the *bceA-mut1* and *bceA-mut2* primers (see Table S2 in the supplemental material), leading to the plasmid pET22-Pml-*bceA*<sub>E169A</sub>. The mixture was treated with DpnI (New England Biolabs) to eliminate the native pET22-Pml-*bceA* plasmid and then used to transform *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . After plasmid purification, the DNA sequence of the insert was checked for the presence of the mutation.

**(iii) Cloning of *His<sub>6</sub>-bceA* and *His<sub>6</sub>-bceA(E169A)* into the pDG plasmid.** The entire *His<sub>6</sub>-bceA* or *His<sub>6</sub>-bceA(E169A)* gene was amplified by PCR from the corresponding plasmid pET22-Pml-*bceA* or pET22-Pml-*bceA(E169A)* using *bceA(pdg)atg* and *bceA(pdg)stop* as primers (see Table S2 in the supplemental material) and introduced into pDG as described above. After purification of the recombinant plasmids, the entire sequence of each insert was checked.

**Inhibition of the bacitracin response by reserpin.** Strain BSGY005 was grown in the appropriate medium to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3. Then, 50  $\mu$ g/ml of bacitracin was added and the culture was immediately split. A solution of reserpin (Sigma-Aldrich) in ethanol was added to one of the split cultures to reach a 40  $\mu$ M final reserpin concentration. The same volume of ethanol alone was added to the other culture. After 45 min of culture at 37°C under agitation, the bacteria were harvested and the  $\beta$ -galactosidase activity was measured. We observed no bacterial lysis after 1 hour of incubation in the presence of bacitracin and/or reserpin.

**Cell lysate and membrane preparation.** For cell lysate and membrane preparation, we followed the procedure described by Bernard et al. (3).

**$\beta$ -Galactosidase assay.** One milliliter of cell culture was centrifuged, and the pellets were suspended in 1 ml of Z buffer (20). A volume, *V* (expressed in milliliters), was diluted with Z buffer to a 980- $\mu$ l final volume. The mixture was incubated for 15 min at 37°C after the addition of 10  $\mu$ l of lysosyme (10 mg/ml). We then added 10  $\mu$ l of 10% Triton X-100 and incubated the resulting mixture at 28°C. The assay was started with the addition of 200  $\mu$ l of orthonitrophenyl-galactoside (Sigma-Aldrich) solution (4 mg/ml) and stopped by the addition of 500  $\mu$ l of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and the OD was measured at 420 nm.  $\beta$ -Galactosidase units are expressed according to the following equation: 1 unit = 1,000/4.8  $\times$  OD<sub>420</sub>  $\times$  1/*t*  $\times$  1.7/*V*  $\times$  1/OD<sub>600</sub>, where *t* represents the time of enzymatic reaction (in minutes) and OD<sub>600</sub> reflects the cell density just before assay.

## RESULTS

**The BceAB ABC transporter is needed for the induction of the *bceAB* operon by bacitracin in *B. subtilis*.** As mutants of each of the components of the *bce* system are much more sensitive to bacitracin (50% inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>] = 6  $\mu$ g/ml) than the parental strain (IC<sub>50</sub> = 350  $\mu$ g/ml) (4), for all the *bce::pMUTIN* mutants constructed by the Japanese/European Consortium for *B. subtilis* Genome Function Analysis (14; Micado database [http://genome.jouy.inra.fr/cgi-bin/micado/index.cgi]), a bacitracin concentration of 4  $\mu$ g/ml was routinely used. It is worth noting that this bacitracin concentration is sufficient to allow *bceAB* induction in a wild-type background. Indeed, in an *amyE::bceAp::lacZ* strain,  $\beta$ -galactosidase activities of 60 and 130 units were detected using 1  $\mu$ g/ml and 10  $\mu$ g/ml of bacitracin, respectively, whereas almost no  $\beta$ -galactosidase (<1 unit) was detected in the absence of bacitracin. Note that upon integration of pMUTIN, the affected gene is interrupted, a *lacZ* transcriptional fusion is generated, and downstream genes belonging to the same multicistronic unit are placed under the control of the inducible *Pspac* promoter carried by pMUTIN (37). When the *bceA::pMUTIN* mutant (strain BFS82) was grown in the presence of either bacitracin alone or

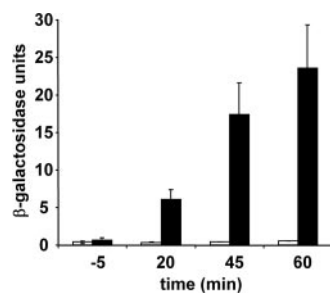


FIG. 1.  $\beta$ -Galactosidase specific activity of a *bceA* strain complemented or not complemented by *bceA* in trans. A *bceA*::pMutin strain carrying the plasmid pDG-*bceA* was inoculated into LB medium supplemented with (■) or without (□) IPTG. Bacitracin (4  $\mu$ g/ml) was added at mid-exponential growth phase, taken as time zero. Cells were harvested at the indicated times. The results are given as the mean values from three experiments plus standard deviations.

bacitracin plus IPTG to induce the expression of the *bceB* gene, no  $\beta$ -galactosidase activity could be detected (data not shown). The same negative result was observed when the *bceB*::pMUTIN strain (BFS83) was grown in the presence of bacitracin. In many signal transduction systems, overexpression of the response regulator mimics the presence of the inducer (24, 31). When plasmid pDG*bceR* carrying the *bceR* response regulator structural gene under the control of IPTG was introduced into the *bceA*::pMUTIN strain, almost no  $\beta$ -galactosidase activity was obtained in cells grown in the absence of IPTG, whereas  $300 \pm 25$  units of  $\beta$ -galactosidase was found when *bceR* expression was induced in the presence of IPTG, indicating that the *bceA* promoter was functional and that it had not been affected by the pMUTIN insertion. Unless otherwise stated, in all experiments  $\beta$ -galactosidase activities were measured 1 hour after bacitracin addition and IPTG was present throughout growth.

As the only known defect of strains BFS82 and BFS83 is the lack of the BceAB transporter, a complementation experiment was performed to confirm that this absence was indeed responsible for the lack of *bceA*::*lacZ* fusion expression. A plasmid bearing the *bceA* gene under the control of IPTG was introduced into strain BFS82, and the *bceA*::pMUTIN/pDG*bceA* cells (BFS171) were grown in the presence of bacitracin with or without IPTG. In these experiments, it is worth noting that IPTG induces the expression of both *bceA* (carried by the pDG*bceA* plasmid) and *bceB* (placed under the control of the inducible *Pspac* promoter carried by pMUTIN). Almost no  $\beta$ -galactosidase activity was detected in the *bceA*::pMUTIN/pDG*bceA* cells grown in the absence of IPTG, whereas a significant level was noted in its presence. Indeed, upon the addition of bacitracin,  $6 \pm 1$  units and  $24 \pm 5$  units of  $\beta$ -galactosidase activity were observed after 20 min and 60 min of incubation, respectively (Fig. 1). Similar results were obtained using the *bceB*::pMUTIN/pDG*bceAB* strain when it was grown in the presence of bacitracin and IPTG to induce the expression of *bceAB* (data not shown).

Strain BSGY005, which contains a *bceAp*::*lacZ* fusion at the *amyE* locus, was used to follow the response to bacitracin in a BceAB BceRS wild-type context (22). We first checked that this *amyE*::*bceAp*::*lacZ* strain was able to respond at low bacitracin concentrations (see the results above), indicating that

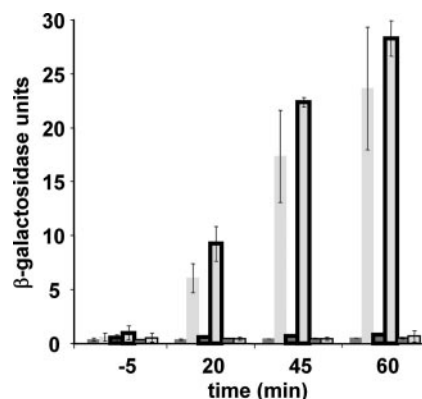


FIG. 2. Effects of BceA, His-BceA, and His-BceA(E169A) overexpression in a *bceA* strain. The *bceA*::pMutin cells carrying plasmid pDG*bceA* (bars without outlines), pDG*His6-bceA* (bars with thick outlines), or pDG*His6-bceA(E169A)* (bars with thin outlines) were inoculated into LB medium supplemented (light gray) or not (dark gray) with IPTG. Bacitracin (4  $\mu$ g/ml) was added at the mid-exponential growth phase, taken as time zero. Cells were harvested at the indicated times, and  $\beta$ -galactosidase activities were measured. The results are given as the mean values from three experiments, and standard deviations are indicated.

the *bceAp* promoter is perfectly functional when located at that ectopic position.

**Inhibition of the BceAB transporter affects the response to bacitracin.** In an earlier paper, we showed that the bacitracin resistance due to the BceAB ABC transporter is drastically affected by the plant alkaloid reserpin, a strong inhibitor of efflux systems (4). We tested the effect of 40  $\mu$ M reserpin (a sublethal concentration) on the response of the *amyE*::*bceAp*::*lacZ* strain to bacitracin. For cells grown with 50  $\mu$ g/ml of bacitracin,  $\beta$ -galactosidase activity was almost 60% lower than for cells grown without reserpin ( $71 \pm 11$  versus  $160 \pm 20$  units), suggesting that the BceAB transporter must possess its full transport capacity to allow the cells to respond to bacitracin.

**Mutation of the NBD subunit (BceA) of the BceAB transporter eliminates the response to bacitracin.** The ATP-binding site of an ABC transporter NBD subunit often contains a conserved glutamyl residue that is important for the ATPase activity (25). This residue was changed in BceA, and His<sub>6</sub>-tagged derivatives (mutated or not) were expressed in *bceA*::pMUTIN cells using the pDG plasmid. The resulting cells were grown in the presence of bacitracin with or without IPTG. In all cultures, IPTG was added at the indicated times before bacitracin, itself always added in the mid-exponential growth phase. Cells were harvested 45 min after the addition of bacitracin, and the  $\beta$ -galactosidase activity was determined. A faint  $\beta$ -galactosidase activity (<1 unit) could be detected in *bceA*::pMUTIN/pDG*His6-bceA* cells grown without IPTG, while a 28-fold increase of activity was recorded in cells grown with IPTG, indicating that the His<sub>6</sub>-BceA protein was fully active (Fig. 2). When the above-mentioned conserved glutamyl residue was replaced by an alaninyl residue, almost no  $\beta$ -galactosidase activity was detected in the *bceA*::pMUTIN/pDG*His6-bceA(E169A)* cells grown with IPTG despite the presence of bacitracin (Fig. 2). As this negative result could be explained either by the absence of the mutant protein due to



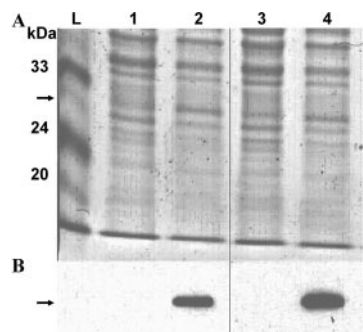


FIG. 3. Levels of His-BceA and His-BceA(E169A) proteins in *B. subtilis* strains. (A) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of crude lysates obtained from *bceA::pMutin* strains carrying either the pDGhis<sub>6</sub>-*bceA* (lanes 1 and 2) or pDGhis<sub>6</sub>-*bceA*(E169A) (lanes 3 and 4) plasmid. The cells were grown for 4 h at 37°C under agitation with (lanes 2 and 4) or without (lanes 1 and 3) IPTG (1 mM). After being harvested, they were broken by two passages through a French press (16,000 lb/in<sup>2</sup>). Fractions containing the same amount of proteins were subjected to electrophoresis on a 12.5% acrylamide gel. L, ladder of molecular mass standards corresponding to carbonic anhydrase (33 kDa), β-lactoglobulin (24 kDa), and lysozyme (20 kDa). (B) Immunoblot of the corresponding gel probed with a mouse anti-His antibody. A second antibody (rabbit anti-mouse immunoglobulin G) coupled with peroxidase was used to reveal the blot with the GE Healthcare ECL Plus Western blotting detection system. All products were from GE Healthcare. The arrows indicate the expected molecular masses (28 kDa) of the proteins.

increased proteolysis or by its wrong localization resulting from the glutamyl replacement by alaninyl, its production was followed using an anti-His<sub>6</sub> tag antibody. As indicated in Fig. 3, neither the His<sub>6</sub>-BceA nor the His<sub>6</sub>-BceA(E169A) protein was detected when IPTG was omitted during bacterial growth, whereas both proteins with the expected molecular mass (ca. 28 kDa) were present when IPTG was added. It is worth noting that no such signal was found in *bceA::pMUTIN/pDG* cells grown in the presence of IPTG (data not shown). Subcellular fractionations of the crude extracts indicated that these proteins are very likely localized in the membrane fraction (see Fig. S1 in the supplemental material).

A competition between the native BceA and the His<sub>6</sub>-BceA(E169A) mutated hybrid proteins was then done in which the pDGhis<sub>6</sub>-*bceA*(E169A) plasmid was introduced into the *amyE::bceAp::lacZ* strain. A series of experiments were conducted in which IPTG was added at different times relative to bacitracin, which was added in the mid-exponential growth phase. Cells were collected 45 min after the addition of bacitracin, and β-galactosidase activity was determined (Fig. 4A). In fact, the earlier the addition of IPTG, the lower the activity; the maximum effect corresponded to an almost complete lack of β-galactosidase detection being observed when IPTG was present in both the preculture and the culture (Fig. 4A, time ∞). Using these conditions, the β-galactosidase activities in *amyE::bceAp::lacZ* cells bearing the pDG plasmid and either the pDGhis<sub>6</sub>-*bceA* or pDGhis<sub>6</sub>-*bceA*(E169A) plasmid were compared. As shown in Fig. 4B, similar and significant levels of activity were obtained in cells containing the pDG plasmid and in cells expressing the His<sub>6</sub>-BceA protein. On the other hand, a very low level of β-galactosidase activity was recorded in bacteria expressing the His<sub>6</sub>-BceA(E169A) protein. These re-

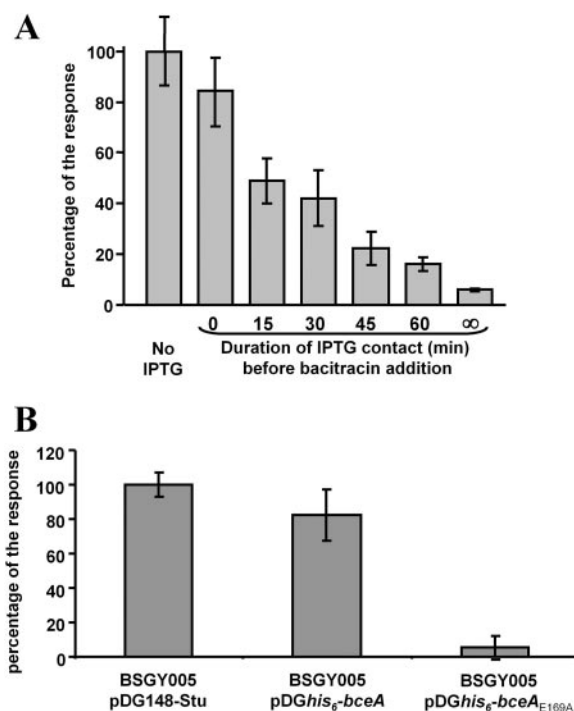


FIG. 4. Effects of the overproduction of His-BceA and His-BceA(E169A) on the response to bacitracin. Bacteria were harvested 45 min after bacitracin addition, and β-galactosidase specific activities were determined. The results are given as the mean values from three experiments, and standard deviations are indicated. (A) The *amyE::bceAp::lacZ* (BSGY005) strain carrying the pDGhis<sub>6</sub>-*bceA*(E169A) plasmid was grown on LB medium until mid-exponential phase. Overproduction of His-BceA(E169A) was either uninduced or induced by adding IPTG, which was added at the indicated times before the addition of bacitracin at 4 μg/ml. ∞ indicates that the cells were always in contact with IPTG (during preculture and culture). The results are expressed as the percentages of the β-galactosidase response obtained in the absence of IPTG (35 ± 5 units). (B) BSGY005 cells carrying the empty plasmid, the pDGhis<sub>6</sub>-*bceA* plasmid, or the pDGhis<sub>6</sub>-*bceA*(E169A) plasmid were grown in medium supplemented with IPTG (1 mM) during both preculture and culture. When the cultures reached mid-exponential phase, bacitracin was added (4-μg/ml final concentration) to the culture media. The results are expressed as the percentages of the β-galactosidase response obtained in the BSGY005/pDG strain grown in the presence of IPTG (20 ± 2 units). The error bars indicate standard deviations.

sults clearly indicated that (i) the His<sub>6</sub> tag was not responsible for the observed decrease in β-galactosidase activity, (ii) overproduction of the tagged BceA protein did not affect β-galactosidase synthesis, and (iii) the His<sub>6</sub>-BceA(E169A) protein seemed able to compete with native BceA, likely by interacting with the native BceB subunit, thus titrating the latter to give an inactive ABC transporter.

#### *bceB* transcription levels needed for response to bacitracin.

In the *bceA::pMUTIN/pDGbceA* cells, the chromosomal *bceB* gene is under the control of the IPTG-inducible *Pspac* promoter of pMUTIN while the pDG-borne *bceA* gene is under the control of an IPTG-inducible promoter carried by the plasmid. Accordingly, one would expect both genes to be induced by IPTG efficiently enough for the BceAB ABC transporter to be produced and for cells to be resistant to bacitracin. However, this was not the case, since they were as sensitive to

TABLE 2. Measurement of  $\beta$ -galactosidase specific activity in response to bacitracin in the *amyE::bceAp::lacZ* BSGY005 strain expressing BcrC or not<sup>a</sup>

Strain	Bacitracin <sup>a</sup>	IPTG <sup>a</sup>	$\beta$ -Galactosidase units <sup>b</sup>
BSGY005/pDG	–	+	0.62 $\pm$ 0.4
	+	+	102 $\pm$ 4
BSGY005/pDG <b>bcrC</b>	–	+	0.38 $\pm$ 0.1
	+	+	31.5 $\pm$ 8

<sup>a</sup> +, present; –, absent.

<sup>b</sup> Bacteria were grown in LB medium to mid-exponential phase. Bacitracin (50  $\mu$ g/ml) and IPTG (1 mM) were added at the indicated concentrations, and the bacteria were incubated for 45 min at 37°C with agitation. Bacteria were collected, and  $\beta$ -galactosidase activity was determined. The results are given as mean values from three experiments  $\pm$  standard deviations.

the antibiotic as the uncomplemented *bceA::pMUTIN* cells. As the *bceA* gene was carried on a multicopy plasmid while a unique copy of *bceB* was present on the chromosome, we suspected that the level of *bceB* transcripts was limiting for BceB production. Using a real-time quantitative PCR technique, the levels of *bceB* transcripts were measured in different strains and/or under different growth conditions. Cells were grown and collected for mRNA preparation as described in Materials and Methods. The *bceB* transcript level of parental cells grown in LB medium without bacitracin was taken as 1  $\pm$  0.02 arbitrary units (AU). Under the same conditions, the *bceB* transcript level in the *bceA::pMUTIN/pDGbceA* cells was only 0.02  $\pm$  0.002 AU. However, when these cells were grown in the presence of IPTG, the *bceB* transcript level increased 15-fold, reaching 0.3  $\pm$  0.005 AU. Although threefold lower than that of the noninduced wild-type cells, this level of *bceB* transcripts was sufficient to produce enough BceB subunits to associate with the BceA subunits produced from the pDG*bceA* plasmid. This yielded enough ABC transporter to trigger a limited but detectable transcription of the chromosomal *bceAp::lacZ* fusion (formed upon insertion of pMUTIN) in the presence of bacitracin. Indeed, in the presence of both IPTG and bacitracin, the  $\beta$ -galactosidase activity observed in the *bceA::pMUTIN/pDGbceA* cells reached 25 units, whereas no detectable activity could be found in the *bceA::pMUTIN* cells (Fig. 1).

**Modulating UPP/UP recycling modulates the bacitracin response.** In the *amyE::bceAp::lacZ/pDGbcrC* strain, overexpression of the BcrC UPP phosphatase upon IPTG induction enhanced the IC<sub>50</sub> from 350 to 420  $\mu$ g/ml. This strain and *amyE::bceAp::lacZ/pDG* were grown under different conditions, and the  $\beta$ -galactosidase activities were recorded. When these strains were grown in the presence of IPTG but without bacitracin, a very low level of  $\beta$ -galactosidase activity was observed (<1 unit) (Table 2). However, when growth occurred in the presence of IPTG and 50  $\mu$ g/ml bacitracin, a high level of  $\beta$ -galactosidase (102  $\pm$  4 units) was found in cells from the *amyE::bceAp::lacZ/pDG* strain, whereas an almost 70% decrease in  $\beta$ -galactosidase production was observed in cells of the *amyE::bceAp::lacZ/pDGbcrC* strain (Table 2). As BcrC overproduction, as well as that of other UPP-phosphatases, was proposed to reduce the UPP pool of the cells (6), this result very likely points to an important role of UPP in triggering transcription from the *bceA* promoter in response to bacitracin.

## DISCUSSION

Various authors have reported that the level of transcripts from the *B. subtilis bceA* promoter is tremendously enhanced upon the addition of bacitracin and that this increase is mediated through the BceRS signal transduction system (4, 19, 22). Using a *bceA::lacZ* fusion, we accumulated the following information concerning transcription from the *bceA* promoter: (i) when one partner of the BceAB transporter is missing, almost no  $\beta$ -galactosidase activity can be detected in the presence of bacitracin; (ii) the expression of the *bceA::lacZ* fusion is restored upon expression of the BceAB transporter in *trans*, and (iii) a nonfunctional His<sub>6</sub>-BceA(E169A) mutant protein competes with the native BceA NBD subunit, resulting in a drastic decrease in  $\beta$ -galactosidase activity. Finally, as supported by the small but detectable level of *bceA* and *bceB* transcripts in noninduced wild-type cells, enough BceAB transporter molecules are already present in the membrane to play their role in the induction process (12). Altogether, these data demonstrate that in *B. subtilis* growing in the presence of bacitracin, transcription from the *bceA* promoter is entirely dependent not only on the BceRS components of the signal transduction system, but also on the native BceAB ABC transporter.

In cells devoid of the BceAB ABC transporter, at least three hypotheses can explain the lack of transcription from the *bceA* promoter upon addition of bacitracin. In the first hypothesis, the stimulus is detected by the sensor but the BceR response regulator remains unphosphorylated in the absence of the BceAB transporter. This could result either from the dephosphorylation of phosphorylated BceR (BceR~P) by a phosphatase or from a BceR status that would impede its transphosphorylation by BceS~P. One can then postulate that the ABC transporter inactivates the putative phosphatase when interacting with it or that BceR can only be transphosphorylated when interacting with the ABC transporter. Interactions of regulators and transporters have been described in several instances (5, 16, 35), but never with a native ABC transporter. Only once was an interaction with an NBD subunit reported. Indeed, MalK, the NBD of the MalKEFG maltodextrin ABC transporter from *E. coli*, was shown to negatively control the status of the MalT regulator (10, 29). In the second hypothesis, the stimulus does exist in the absence of the transporter but is not detected by the sensor. The lack of detection of the existing stimulus by the BceS histidine kinase in the absence of the BceAB ABC transporter could be explained either by supposing that the sensor needs a direct contact with the BceAB transporter to be active or that the transporter presents the stimulus to the sensor. Alternatively, in the third hypothesis, the stimulus might not exist at all in the absence of the ABC transporter. This situation is encountered for  $\beta$ -lactam resistance induction in the gram-negative bacterium *Enterobacter cloacae*. Indeed, the AmpG transporter involved in recycling of muropeptides was shown to be essential for high-level expression of the AmpC  $\beta$ -lactamase in response to cefotaxime addition (15). Once imported into the cell, the muropeptides are enzymatically modified, giving rise to 1,6-anhydro-MurNAc tripeptide and UDP-MurNAc pentapeptide (9). These peptides act as effectors, modulating the AmpR regulator activity for  $\beta$ -lactamase induction.

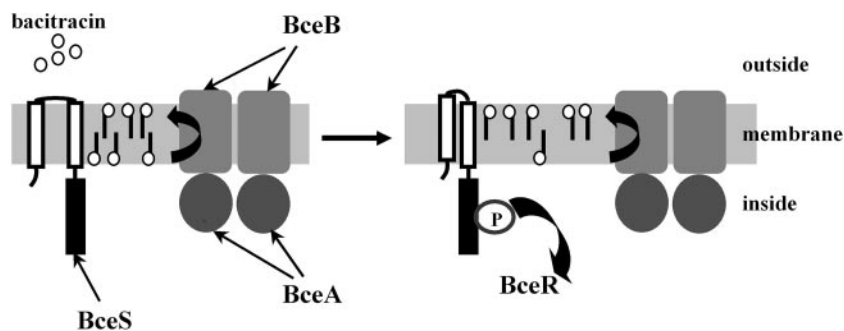


FIG. 5. UPP-bacitracin flipping and membrane asymmetry. Bacitracin (○) interacts with UPP (black stems) to form the UPP-bacitracin complex (circles on stems). Assuming that the complexes are able to freely diffuse from the outer to the inner leaflet (and vice versa), they might be equally distributed between the two leaflets (left part of the diagram). When the BceAB ABC transporter flips the UPP-bacitracin complex from the inner to the outer leaflet of the membrane (right part of the diagram), a membrane asymmetry is created. One can imagine that this asymmetry leads to repositioning of the two transmembrane domains (white rectangles) of the BceS histidine kinase, inducing the autophosphorylation of its transmitter domain (black rectangle). Thus, the response regulator can be activated after transferring the phosphate group (P in circle) to the receiver domain.

BceAB belongs to an ABC transporter family containing more than 500 members, which are all predicted to be exporters, since no substrate binding protein has ever been associated with any of them (28; <http://www-abcd.biotoul.fr/>). If we speculate that the BceAB export capacity is involved in the constitution of the stimulus detected by the BceS sensor, what might be its transported substrate?

An antagonist neutralizing the bacitracin in the external medium might be a good candidate, supposing that the true inducer will be the antagonist-bacitracin complex. However, such a compound was not found in the supernatant of an *S. mutans* culture (36) and our preliminary results do not favor this hypothesis. As UPP is the membrane target of bacitracin (33) and as bacitracin is required but is not sufficient for induction, we propose that the UPP-bacitracin complex is the transported substrate. Both BcrC UPP phosphatase and bacitracin compete for UPP in the cells. Accordingly, the increased resistance of *B. subtilis* to bacitracin upon overexpression of BcrC (4, 23) might be due to the rapid conversion of UPP to UP, which decreases the internal pool of UPP, as proposed previously (6). Thus, the threefold reduction of  $\beta$ -galactosidase activity we observed in the *amyE::bceAp::lacZ* cells overproducing BcrC supports the notion that UPP plays a central role in stimulus generation.

To account for the very short extracytoplasmic loop (three residues) of the BceS histidine kinase, Mascher and collaborators had already proposed that this protein directly senses the UPP-bacitracin complex through an interaction with its transmembrane helices (19). However, if this were sufficient to trigger transcription from the *bceA* promoter in the presence of bacitracin, there should be no need for the ABC transporter. The fact that no activity at all was detected in a  $\Delta bceAB amyE::bceAp::lacZ$  strain excludes any direct stimulation of BceS by the UPP-bacitracin complex.

The site of UPP dephosphorylation, the mechanism of UP recycling, and the cellular location of bacitracin are still open questions. As UPP, the bacitracin target, is a membrane component, it is legitimate to suppose that the UPP-bacitracin complex is located within the membrane. Assuming that this complex is able to freely diffuse from one side of the mem-

brane to the other, it might be equally distributed between the inner and outer leaflets. In this context, BceAB would work as a flippase (8), accumulating the UPP-bacitracin complex in the outer leaflet of the bacterial membrane and thus creating an asymmetric distribution of the complex (Fig. 5) that might be detected by the BceS sensor. In this scenario, the low basal level of BceAB is sufficient to generate a membrane asymmetry detected by BceS, thus triggering the *bceAB* gene expression that leads to a chain reaction with a very high final level of BceAB ABC transporter production. In this context, UPP-bacitracin will accumulate in the outer leaflet, reaching a very high local concentration. Taking into account the weak binding constant ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ ) for the interaction between bacitracin A and UPP (34), part of the bacitracin might be released into the external medium. As a result of this event cascade, bacitracin would be pumped out of the bacterial membrane and the cells would be protected from its action.

In accounting for the very special regulation of *bceAB* of *B. subtilis*, it is tempting to speculate that YtsAB transporter of *B. licheniformis* or MbrAB transporter of *S. mutans* is also required for the expression of their cognate structural genes in response to bacitracin. Can this feature be generalized to other members of the genetically and functionally linked signal transduction systems/ABC transporters (family 9) found in the phylum *Firmicutes* (12, 13, 18)? We are currently investigating whether this is true for YtsABCD from *B. licheniformis* and MbrABCD of *S. mutans*, using bacitracin as an inducer, as well as for YvcPQRS and YxdJKLM of *B. subtilis*, which have recently been shown to be induced by enduracidin, a peptide antibiotic (7), and LL-37, a human antimicrobial peptide (26), respectively.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We greatly appreciate helpful discussions with Vincent Méjean. We thank Kazuo Kobayashi for his generous gift of mutant strains. We are grateful to Pascale Joseph and Coralie Lefebvre for their help.

Remi Bernard was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (France), followed by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (France). This work was supported by CNRS, an IMP-BIO grant from the Ministère de la Recherche, and the Université de la Méditerranée.



## REFERENCES

- Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**:741–746.
- Ansaldi, M., M. Lepelletier, and V. Mejean. 1996. Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal. Biochem.* **234**:110–111.
- Bernard, R., M. El Ghachi, D. Mengin-Lecreux, M. Chippaux, and F. Denizot. 2005. BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J. Biol. Chem.* **280**:28852–28857.
- Bernard, R., P. Joseph, A. Guiseppi, M. Chippaux, and F. Denizot. 2003. YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**:93–97.
- Coutts, G., G. Thomas, D. Blakey, and M. Merrick. 2002. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.* **21**:536–545.
- El Ghachi, M., A. Derbise, A. Bouhss, and D. Mengin-Lecreux. 2005. Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**:18689–18695.
- Giyanto, K. Kobayashi, and N. Osagawara. 2003. Abstr. 12th Int. Conf. Bacilli., abstr. P66.
- Higgins, C. F., and M. M. Gottesman. 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* **17**:18–21.
- Jacobs, C., J. M. Frere, and S. Normark. 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88**:823–832.
- Joly, N., A. Bohm, W. Boos, and E. Richet. 2004. MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator MalT by antagonizing inducer binding. *J. Biol. Chem.* **279**:33123–33130.
- Joseph, P., J. R. Fantino, M. L. Herbaud, and F. Denizot. 2001. Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:91–97.
- Joseph, P., G. Fichant, Y. Quentin, and F. Denizot. 2002. Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**:503–513.
- Joseph, P., A. Guiseppi, A. Sorokin, and F. Denizot. 2004. Characterization of the *Bacillus subtilis* YxdJ response regulator as the inducer of expression for the cognate ABC transporter YxdLM. *Microbiology* **150**:2609–2617.
- Kobayashi, K., S. D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K. K. Andersen, and M. E. A. Arnaud. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:4678–4683.
- Korfmann, G., and C. C. Sanders. 1989. *ampG* is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1946–1951.
- Lee, S. J., W. Boos, J. P. Bouche, and J. Plumbridge. 2000. Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **19**:5353–5361.
- Manson, J. M., S. Keis, J. M. Smith, and G. M. Cook. 2004. Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory protein, BcrR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3743–3748.
- Mascher, T. 2006. Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**:133–144.
- Mascher, T., N. G. Margulis, T. Wang, R. W. Ye, and J. D. Helmann. 2003. Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol. Microbiol.* **50**:1591–1604.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Neumuller, A. M., D. Konz, and M. A. Marahiel. 2001. The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur. J. Biochem.* **268**:3180–3189.
- Ohki, R., Giyanto, K. Tateno, W. Masuyama, S. Moriya, K. Kobayashi, and N. Ogasawara. 2003. The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**:1135–1144.
- Ohki, R., K. Tateno, Y. Okada, H. Okajima, K. Asai, Y. Sadaie, M. Murata, and T. Aiso. 2003. A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J. Bacteriol.* **185**:51–59.
- Olekhovich, I. N., J. L. Dahl, and R. J. Kadner. 1999. Separate contributions of UhpA and CAP to activation of transcription of the uhpT promoter of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **292**:973–986.
- Orelle, C., O. Dalmás, P. Gros, A. Di Pietro, and J. M. Jault. 2003. The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* **278**:47002–47008.
- Pietainen, M., M. Gardemeister, M. Mecklin, S. Leskela, M. Sarvas, and V. P. Kontinen. 2005. Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* **151**:1577–1592.
- Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, and M. Grabnar. 2000. The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**:103–106.
- Quentin, Y., and G. Fichant. 2000. ABCdb: an ABC transporter database. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:501–504.
- Reyes, M., and H. A. Shuman. 1988. Overproduction of MalK protein prevents expression of the *Escherichia coli* mal regulon. *J. Bacteriol.* **170**:4598–4602.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Simon, G., V. Mejean, C. Jourlin, M. Chippaux, and M. C. Pascal. 1994. The *torR* gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. *J. Bacteriol.* **176**:5601–5606.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:450–490.
- Stone, K. J., and J. L. Strominger. 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**:3223–3227.
- Storm, D. R., and J. L. Strominger. 1974. Binding of bacitracin to cells and protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Biol. Chem.* **249**:1823–1827.
- Tanaka, Y., K. Kimata, and H. Aiba. 2000. A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *EMBO J.* **19**:5344–5352.
- Tsuda, H., Y. Yamashita, Y. Shibata, Y. Nakano, and T. Koga. 2002. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3756–3764.
- Vagner, V., E. Dervyn, and S. D. Ehrlich. 1998. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **144**:3097–3104.
- Wecke, T., B. Veith, A. Ehrenreich, and T. Mascher. 2006. Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J. Bacteriol.* **188**:7500–7511.

# Table 1- partie 1

		Kramer <i>et al.</i> , 2006	Mc Callum <i>et al.</i> , 2006; Mongodin <i>et al.</i> , 2003	Utaiida <i>et al.</i> , 2003	Pietiäinen <i>et al.</i> , 2005	Wecke <i>et al.</i> , 2006	
Bactéries / Antibiotiques		<i>Lactococcus lactis</i> / Nisine	<i>Staphylococcus aureus</i> / vancomycine	<i>S. aureus</i> / bacitracine et/ou D-cyclosérine et/ou oxacilline	<i>Bacillus subtilis</i> / peptides antimicrobiens cationiques (gènes induits seulement)	<i>Bacillus licheniformis</i> / bacitracine et/ou vancomycine (gènes induits seulement)	
Métabolisme	acides aminés	opéron <i>arc</i> (voie de dégradation arginine)		<i>arcB</i> (dégradation arginine)		<i>rocR-yckK/JI</i> (utilisation arginine)	
			<i>argS</i> (arginyl t-RNA synthase)	<i>argH</i> (arginosuccinate lyase)			
			<i>hutH</i> (histidine lyase)	<i>hutH</i> (histidine lyase)			
				<i>thrC</i> (thréonine synthase)			
	global (conversion d'énergie)	<i>butA</i> (acétoïne réductase)					<i>ytrABCE</i> F (utilisation acétoïne)
							opéron <i>pyr</i> (métabolisme pyrimidine)
			opéron <i>pur</i> (biosynthèse purines)			<i>purE</i> (biosynthèse purines)	
		<i>apl</i> (alkaline phosphatase)					
			<i>gap</i> (Glyceraldéhyde 3P déshydrogénase)		<i>glpK</i> (glycérol kinase)	<i>glpD</i> (glycérol 3P déshydrogénase)	
			<i>icd</i> (Isocitrate déshydrogénase)				
			<i>citZ</i> (citrate synthase)	<i>citB</i> , <i>citC</i> , <i>citZ</i> (citrate synthase)	<i>citB</i> (citrate synthase)		
			<i>pflAB</i> (formateacétyltransférase)	<i>pflB</i> (formate acétyltransférase)			
			<i>guaC</i> (utilisation GMP)			<i>guaC</i> (utilisation GMP)	
			<i>lctE</i> (L-lactate déshydrogénase)	<i>lctE</i> (L-lactate déshydrogénase)			
			<i>nasD</i> (nitrite réductase)	<i>narI</i> , <i>narG</i> , <i>narH</i> , <i>narK</i> , <i>nasE</i> (nitrate réductase)			
	<i>yeeA</i> (hydrolase maltose)						
	<i>glgD</i> (synthèse glycogène)						
		<i>fruK</i> (phosphofructokinase, Glycolyse)					
		<i>pgi</i> (Glucose 6P isomérase, glycolyse)					
Fonctions liées à l'enveloppe Bactérienne	Paroi (modification ou augmentation du rendement de synthèse)	<i>nagA</i> (NAG 6P déacétylase, rendement de synthèse)	<i>nagB</i> (Glucosamine 6P isomérase, rendement de synthèse)	<i>nagB</i> (Glucosamine 6P isomérase, rendement de synthèse)			
			<i>glmS</i> (Glucosamine transférase)				
			<i>murA</i> (synthèse peptidoglycane)	<i>murI</i> , <i>murZ</i> (synthèse peptidoglycane)	<i>murE</i> , <i>murG</i> (synthèse peptidoglycane)		
				<i>uppS</i> (synthèse lipid carrier)			
					<i>tagA</i> , <i>tagG</i> (synthèse Tas)		
				SA0244 (synthèse TAs)			
		opéron <i>gal</i> (incorporation galactose dans LTAs)					
		opéron <i>dlt</i> (D-alanylation des Tas et LTAs)			opéron <i>dlt</i> (D-alanylation des Tas et LTAs)	opéron <i>dlt</i> (D-alanylation des Tas et LTAs)	
			<i>sgtB</i> (homologue PBP1A et 1B)	<i>sgtB</i> (homologue PBP1A et 1B)			
						<i>ponA</i> (PBP)	
					<i>pbpE</i> , <i>pbpX</i> (PBPs)	<i>pbpE</i> , <i>pbpX</i> (PBPs)	
		<i>pbp2a</i> (PBP2A)	<i>mecA</i> (PBP2')	<i>pbp2</i> (PBP2)			
			SA0849 (similaire PBP)				
			<i>capADIK</i> (synthèse polysaccharides de la capsule)				
		<i>lytM</i> (hydrolase peptidoglycane)					
		<i>atl</i> (autolysine)	<i>fmt</i> (autolysine)				
	membrane plasmique	<i>ipil</i> (synthèse membrane)					
opéron <i>fab</i> (synthèse acides gras)							
<i>p/pABCD</i> (précurseur lipoprotéine)							
				<i>ywiE</i> (cardiolipine synthase)			

## Table 1- partie 2

		Kramer <i>et al.</i> , 2006	Mc Callum <i>et al.</i> , 2006; Mongodin <i>et al.</i> , 2003	Utaida <i>et al.</i> , 2003	Pietäinen <i>et al.</i> , 2005	Wecke <i>et al.</i> , 2006	
Bactéries / Antibiotiques		<i>Lactococcus lactis</i> / Nisine	<i>Staphylococcus aureus</i> / vancomycine	<i>S. aureus</i> / bacitracine et/ou D-cyclosérine et/ou oxacilline	<i>Bacillus subtilis</i> / peptides antimicrobiens cationiques (gènes induits seulement)	<i>Bacillus licheniformis</i> / bacitracine et/ou vancomycine (gènes induits seulement)	
Virulence ou productions antibiotiques	production antibiotique		SA0205 (homologue précurseur lysothaphine, bactériocine)				
				SA0173 (synthèse surfactine)			
	Facteurs de virulence			<i>isaA</i> (antigène A)			
				<i>spa</i> (précurseur de protéine de surface reconnue par immunoglobuline G)			
				<i>set8</i> (exotoxine 8)			
				<i>set10</i> (exotoxine 10)			
				<i>set13</i> (exotoxine 13)			
				SA1009 (homologue exotoxine)			
				SA1010 (homologue exotoxine)			
				SA1011 (homologue exotoxine)			
		SA2291 (synthèse staphyloxanthine)					
		SA2295 (synthèse staphyloxanthine)					
Gènes de stress et modifications ADN	phage shock	<i>ythBA</i>			<i>pspA</i> (phage shock)		
	autres protéines de stress					<i>hspG</i> (heat shock)	
						opéron <i>ctsR</i> (heat shock)	
		<i>dnaK, grpE</i> (heat shock)					
				<i>asp23</i> (alkaline shock)		<i>yocKJ</i> (similaires gènes de stress général)	
	Recombinaison réplication réparation					<i>ruvB</i> (hélicase)	
						<i>ligA</i> (ligase)	
				<i>xerC</i> (recombinase)			
				<i>recU</i> (recombinase)	<i>recU</i> (recombinase)		<i>recU</i> (recombinase)
					SA0827 (nucléase)		
					SA1093 (topoisomérase)		
						<i>ydiP</i> (similaire DNA méthylation)	
						<i>radC</i> (Réparation ADN)	
				<i>parC</i> (ségrégation chromosome)			

# Table 1- partie 3

	Kramer <i>et al.</i> , 2006	Mc Callum <i>et al.</i> , 2006; Mongodin <i>et al.</i> , 2003	Utaida <i>et al.</i> , 2003	Pietäinen <i>et al.</i> , 2005	Wecke <i>et al.</i> , 2006
Bactéries / Antibiotiques	<i>Lactococcus lactis</i> / Nisine	<i>Staphylococcus aureus</i> / vancomycine	<i>S. aureus</i> / bacitracine et/ou D-cyclosérine et/ou oxacilline	<i>Bacillus subtilis</i> / peptides antimicrobiens cationiques (gènes induits seulement)	<i>Bacillus licheniformis</i> / bacitracine et/ou vancomycine (gènes induits seulement)

Transports	systèmes PTS		SA1255 (système PTS IIA glucose)	SA1255 (système PTS IIA glucose)		
			SA0233 (système PTS II)			
		<i>ptcA</i> (PTS cellobiose)	SA0320 (système PTS IIBC fructose)	SA0320 (système PTS IIBC fructose)		
		<i>yedEF</i> (système PTS β-glucoside)				
			<i>mtlF</i> (PTS mannitol)			
	autres transports métaboliques (conversion d'énergie)	<i>ypcAGH</i> (ABC transporteur sucre)				
		<i>glpF1, glpF2</i> (import glycérol)				
			<i>gltS</i> (transport glutamate)			
				<i>czrB</i> (efflux de cations)	<i>ydbO</i> (similaire efflux cations)	
		<i>glnP</i> (transporteur ABC glutamine)				
			SA0301 (formate/nitrite transport)			
	Transporteurs (ABC, MDR...)	<i>ynaCD</i> (homologue MDR E. faecalis)	SA0172 (homologue LmrP, MDR)			
			<i>vraDE</i> et <i>vraFG</i> (ABC transporteur)			<i>ytsCD</i> (homologue <i>bceAB</i> , transporteur ABC, notre étude)
					<i>yxdLM</i> (transporteur ABC)	<i>yxdL2M2</i> (transporteur ABC)
					<i>yvcRS</i> (transporteur ABC)	
		<i>potD</i> (ABC putatif)			<i>yhcG</i> (ABC putatif)	
		<i>yhcA</i> (ABC putatif)				
		<i>yjyBC</i> (perméase)				
			SA0264 (transporteur ABC putatif)	SA1654 (transporteur ABC)		
				SA0639 (transporteur ABC)		
						<i>yhcHI</i> (transporteur ABC)
						<i>yusCBA</i> (similaire transporteur ABC)
			<i>proP</i> (transporteur proline osmoprotectant)		SA0640 (transporteur ABC)	
					SA1970 (MDR similaire)	

Autres Résistances	<i>ysa ABCD</i> (résistance bacitracine)				
	<i>ynhCD</i> (résistance tellurite)			<i>yceC</i> (similaire résistance tellurium)	<i>yceCDE</i> (similaire résistance tellurium)
	<i>yneGH</i> (résistance arsenic)				
			<i>bacA</i> (résistance bacitracine)		
				<i>yaaKN</i> (similaire résistance cations toxiques)	
				<i>yndN</i> (similaire résistance fosfomycine)	
				<i>bcrC</i> (notre étude)	<i>ywoA</i> (homologue BcrC notre étude)
		SA0122 (similaire résistance tétracycline)			

Abbréviations : TAs, acides téichoïques ; LTAs, acides lipotéichoïques ; PBP, penicillin binding protein

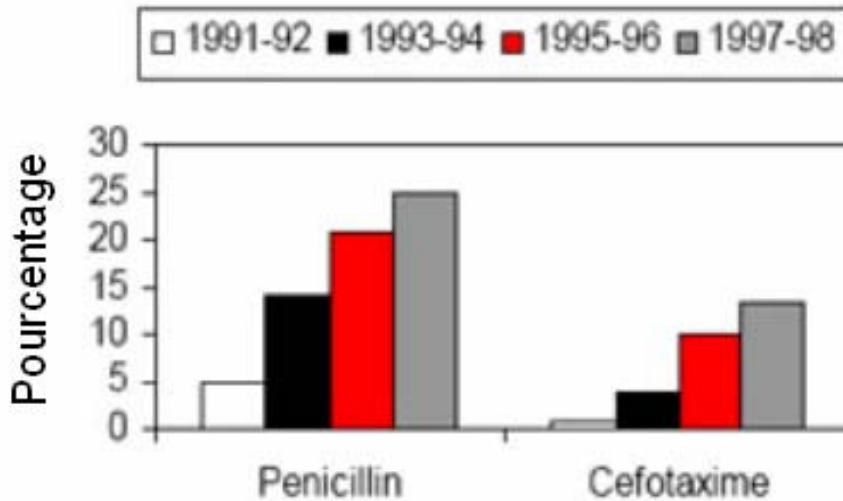


Fig.1 : Proportion de *S. pneumoniae* résistante à la pénicilline ou la céfotaxime entre 1991 et 1998. La proportion est calculée sur l'ensemble des isolats de *S. pneumoniae* répertoriés dans le monde (d'après un rapport du CDC, 2001).

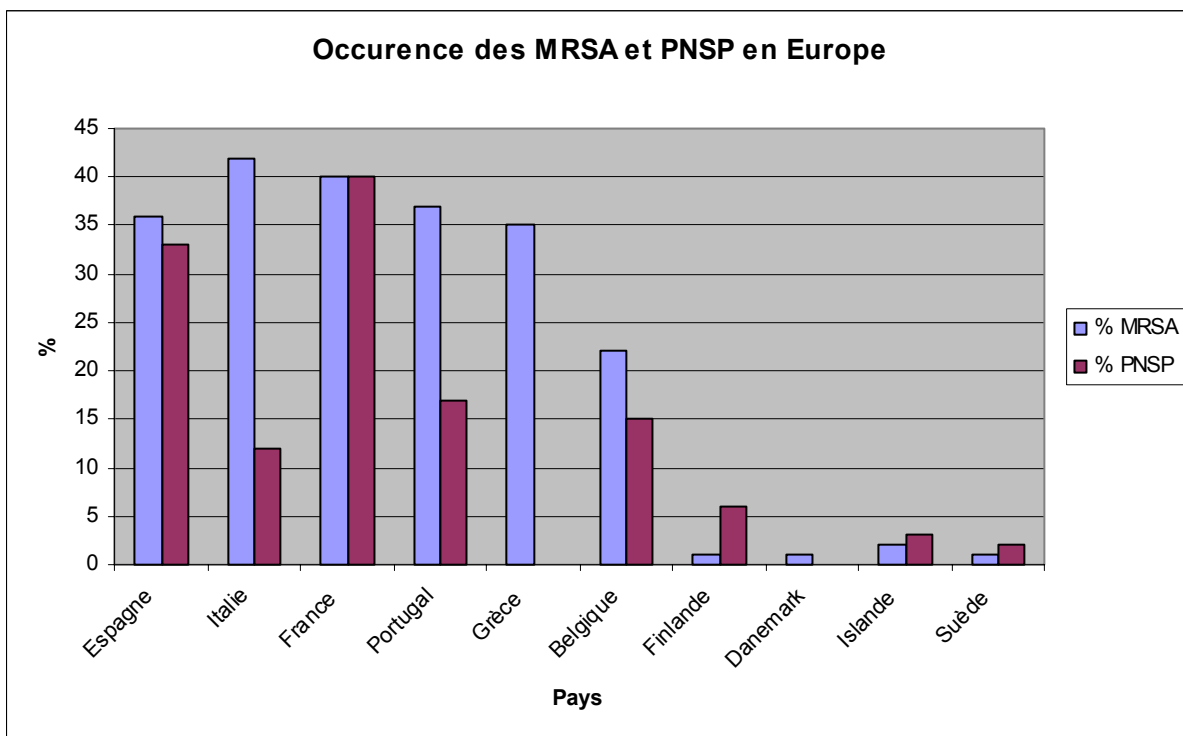


Fig.2 : Comparaison de la proportion des MRSA et PNSP dans les pays européens. D'après un rapport Eurosurveillance de janvier 2001. MRSA, Methicillin Résistant Staphylococcus aureus ; PNSP, Pneumocoques Non Susceptibles à la Pénicilline. Le pourcentage de PNSP n'a pas été déterminé en Grèce et au Danemark.



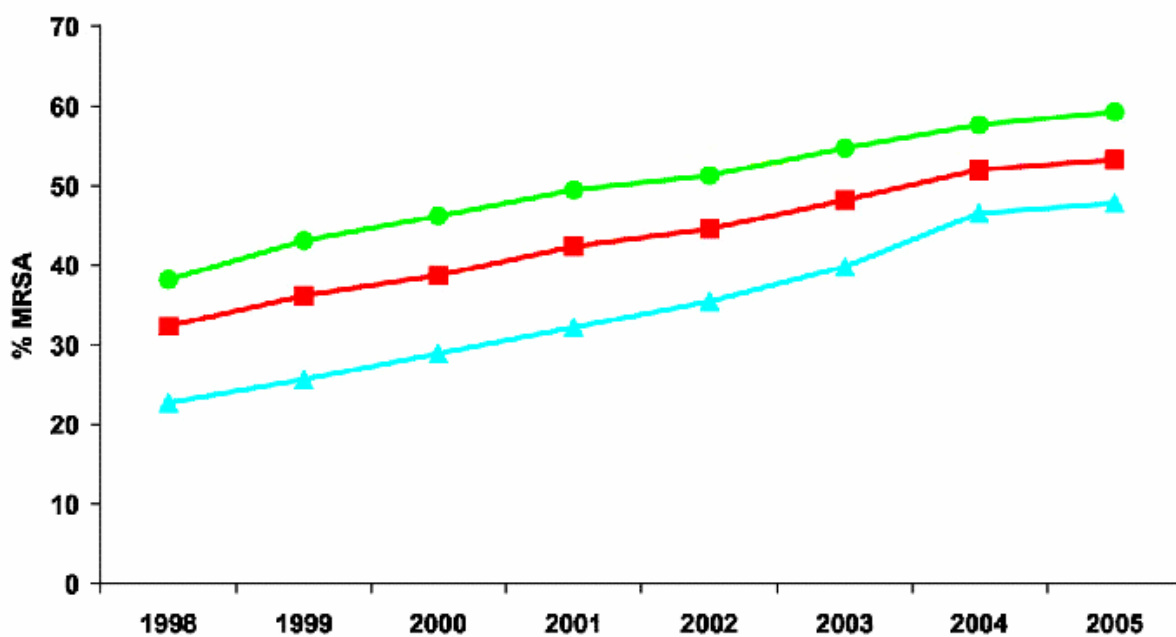


Fig.3 : Proportion de MRSA chez les patients américains entre 1998 et 2005. Courbe verte, patients de la communauté américaine ; courbe bleue, patients américains hospitalisés ; courbe rouge, proportion moyenne chez l'ensemble des patients. Adapté de *Styers et al*, 2006.

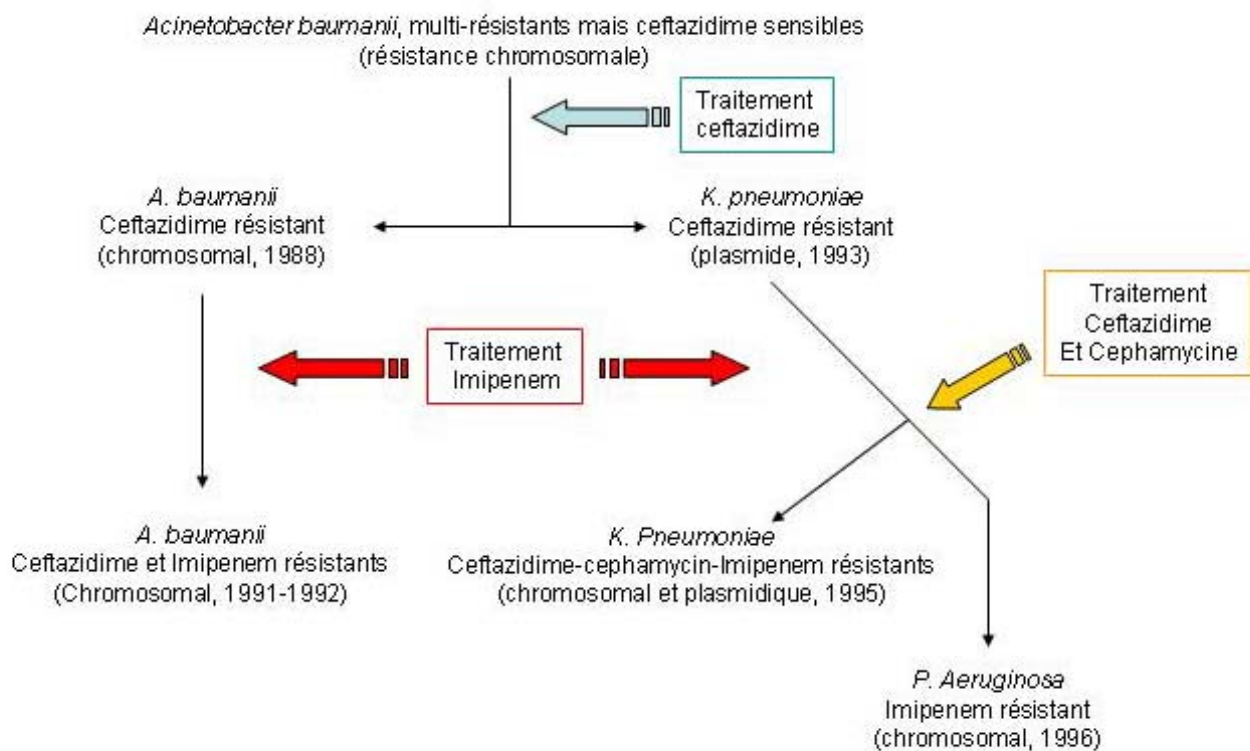


Fig.4 : Evolution des résistances aux antibiotiques parmi les bacilles à Gram négatif de l'unité de soins intensifs de l'hôpital de New York Queens, d'après Rahal *et al*, 2002. Les flèches colorées indiquent les différents traitements antibiotiques employés. Les années d'identification des différentes bactéries résistantes sont précisées ainsi que la localisation chromosomique ou plasmidique des déterminants génétiques de résistance.

Dose journalière pour 1000 habitants  
(unités arbitraires)

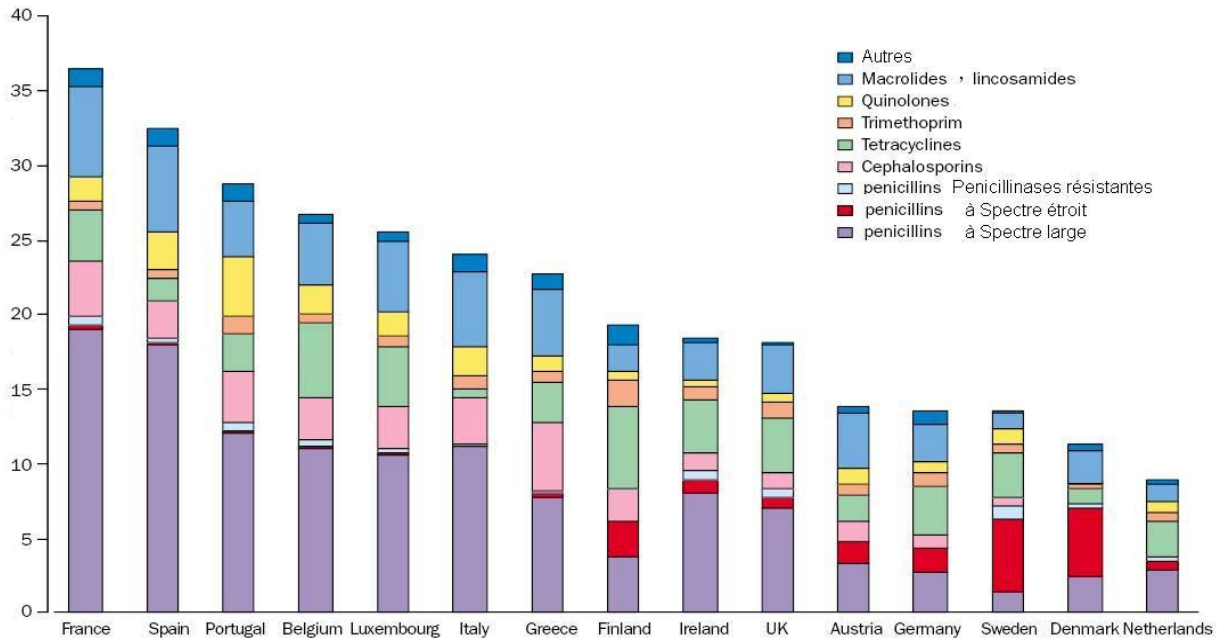


Fig.5 : Utilisation des antibiotiques en Europe en 2001. D'après Cars *et al*, 2001.

% de souches résistantes

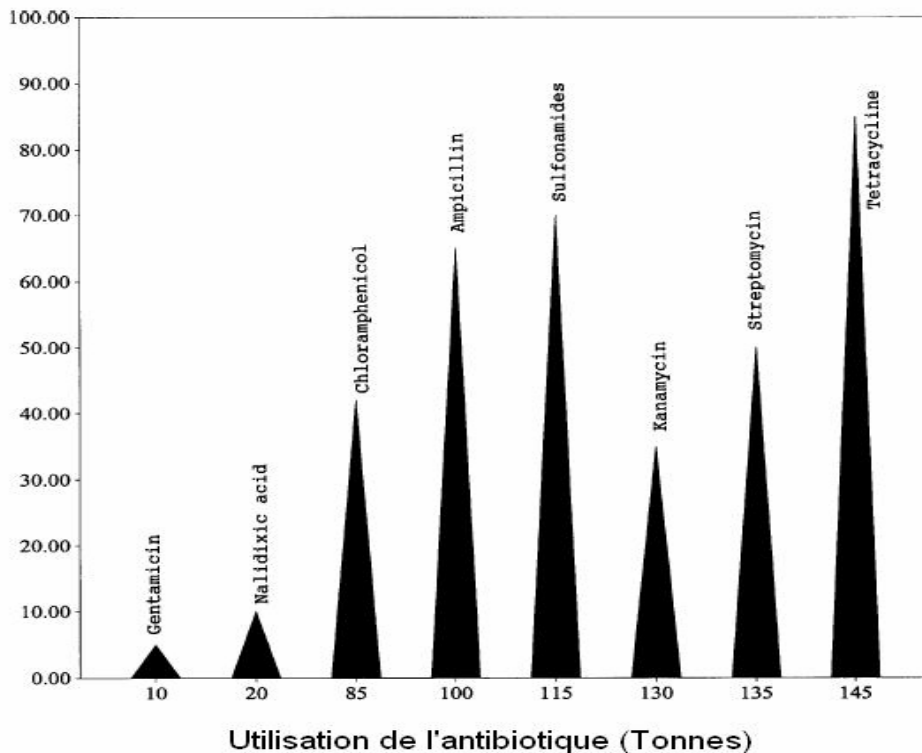


Fig.6 : Corrélation entre utilisation des antibiotiques et fréquence de souches résistantes. D'après un rapport du CDC, 2006 (<http://www.cdc.gov/>).

MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Strain	82	90	100	110	116																														
	<i>S. coelicolor</i>	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
	<i>S. avermitilis</i>	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
64	Ad # 33	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	F	T	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
16	BA # 39	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
32-64	Cu # 20A	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
16	Cu # 22	L	T	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
16	Kar # 17	L	T	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	L	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
16	PS # 22	D	S	S	I	V	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	T	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
64-128	Re # 30	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	D	N	F	G	L	P	G	N	D	P	A
16-32	Re # 58	D	S	S	I	D	A	L	A	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	P	L	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A
16	Re # 70A	D	S	S	I	D	A	L	V	R	L	A	Q	P	W	S	M	R	M	E	H	V	D	S	N	G	N	F	G	S	P	G	N	D	P	A

Fig.7 : Alignements des séquences QRDR (Quinolone Resistance Determinant Region) de *Streptomyces* et résistance à la ciprofloxacine. Les séquences de souches sauvages sensibles sont indiquées en haut. MIC, Minimal Inhibitory Concentration, indiquant le niveau de résistance à la ciprofloxacine correspondant à chaque souche. D'après D'Costa *et al*, 2006.

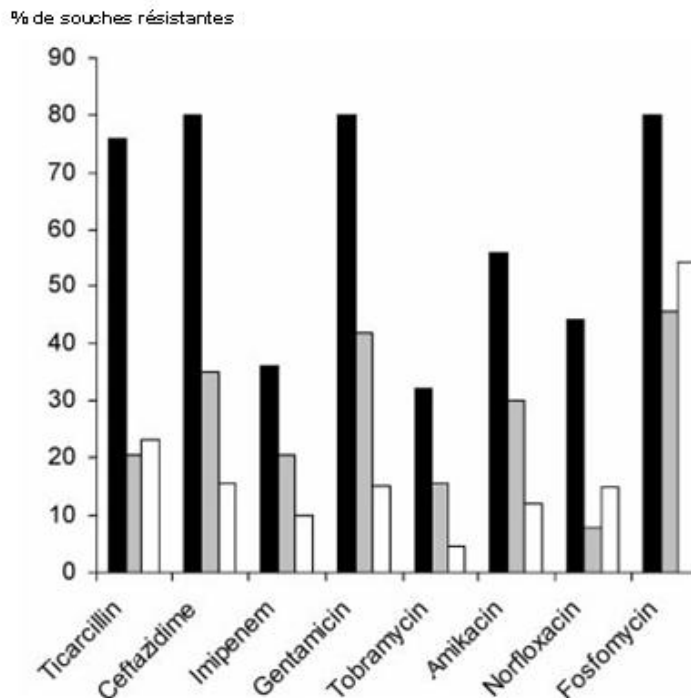


Fig.8 : Fréquence de Résistances aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. Barres noires, souches hypermutables isolées à partir de patients à fibrose cystique ; Barres grises, souches non-hypermutables isolées à partir de patients à fibrose cystique, Barres blanches, souches isolées à partir de patients à infections aiguës. D'après Oliver *et al*, 2000.

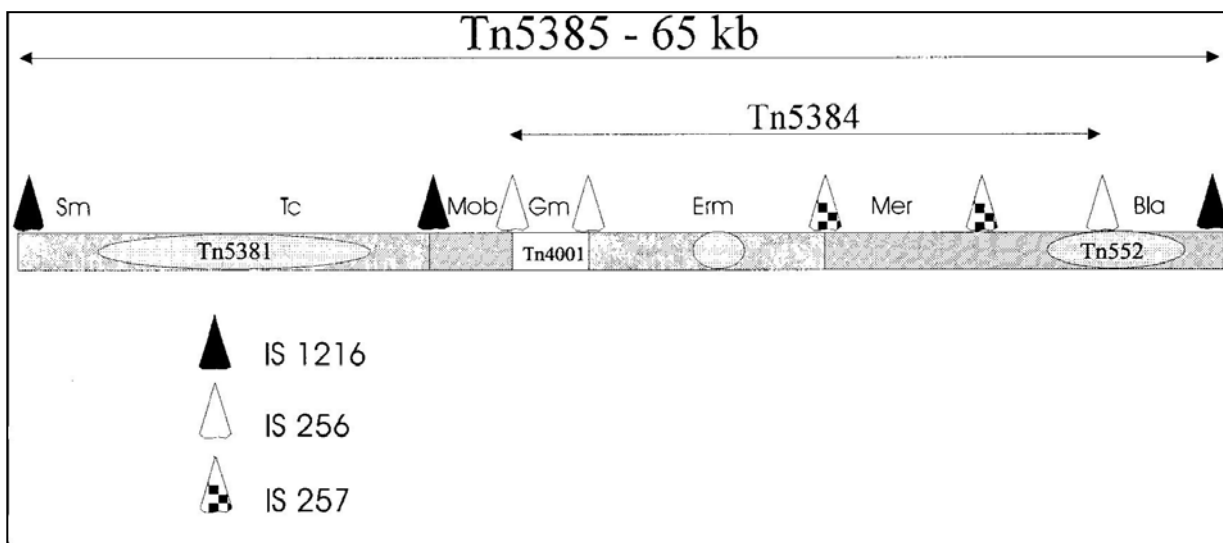


Fig.9 : Déterminants de résistance portés par le transposon Tn5385 d'*E. faecalis*. IS, séquence d'insertion ; Tn, transposon ; Mob, région de mobilisation similaire à celle trouvée dans les plasmides de Staphylocoques ; Sm, résistance à la streptomycine ; Tc, résistance à la tétracycline ; Gm, résistance à la gentamycine ; Erm, résistance à l'érythromycine ; Mer, résistance au mercure chloridrique ; Bla, résistance aux  $\beta$ -lactames. D'après Rice, L.B. 2000.

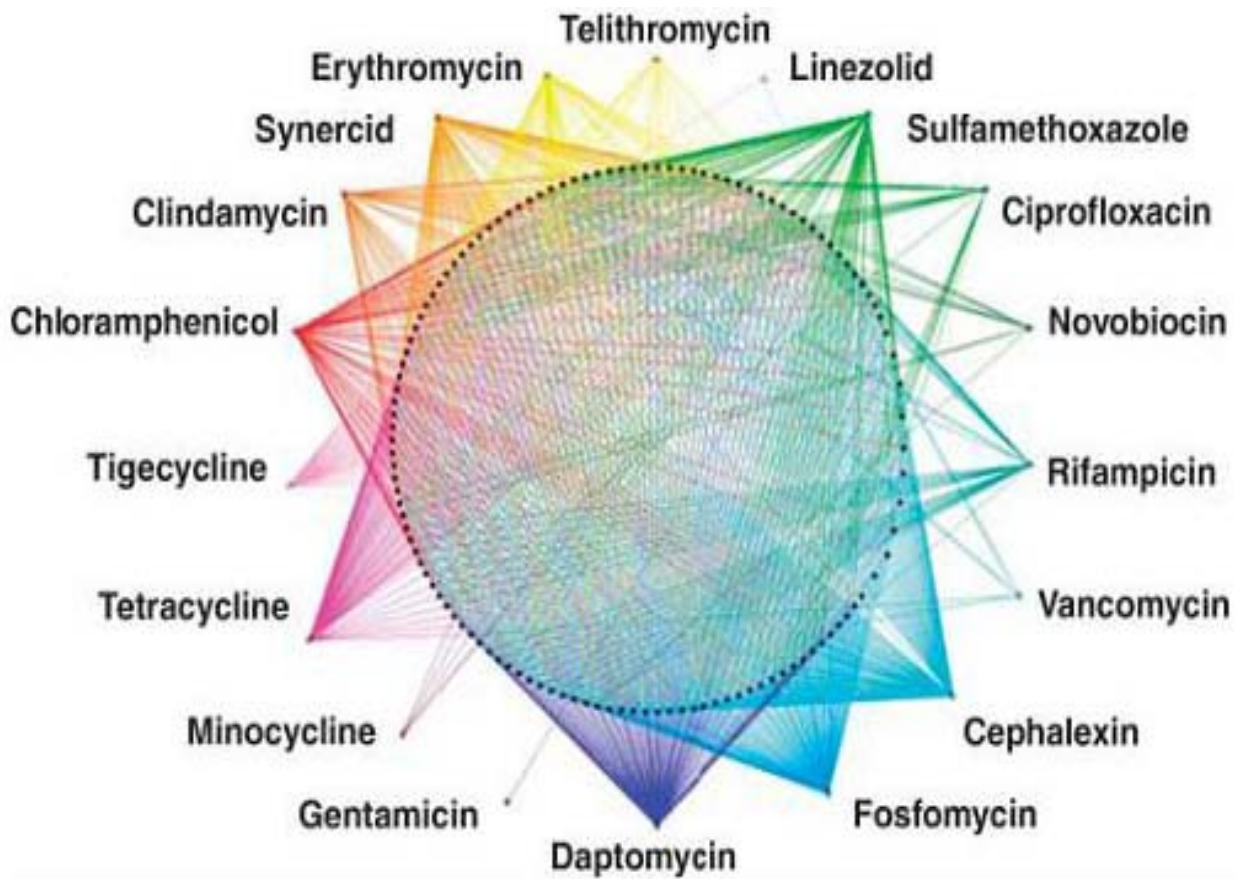


Fig.10 : Exemple de résistome du sol, profils de résistance de 480 souches du genre *Streptomyces* à 21 antibiotiques. Les points du cercle correspondent chacun à un profil différent. Chaque ligne connectant un point à un antibiotique schématise une résistance. D'après D'Costa *et al*, 2006.

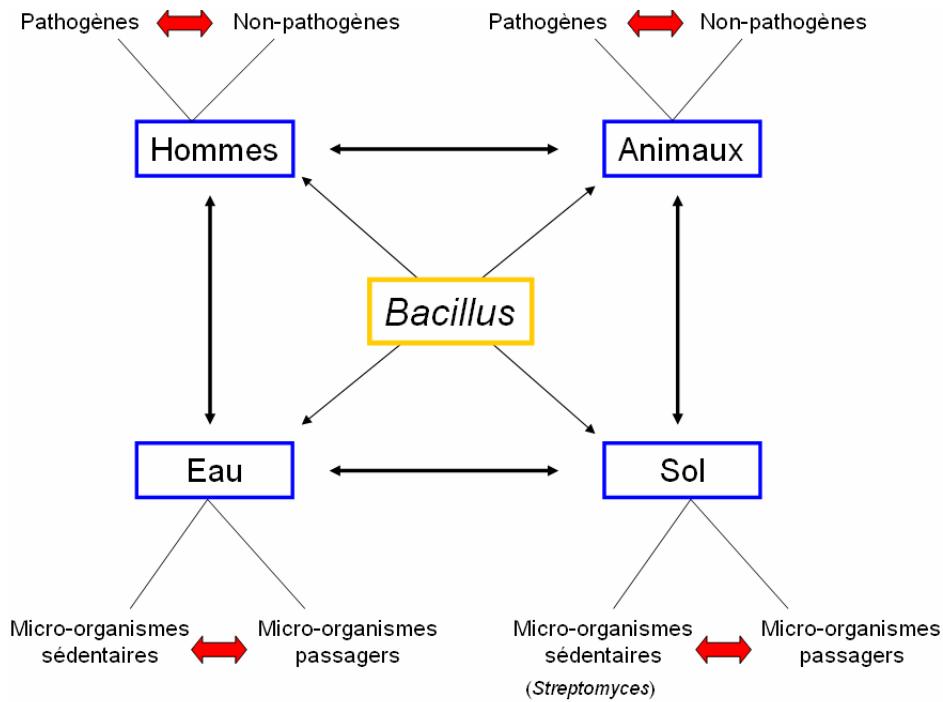


Fig.11: Place des espèces ubiquitaires du genre *Bacillus* dans les interconnexions entre les différents écosystèmes. Du fait de leur répartition ubiquitaire, les espèces du genre *Bacillus* sont supposées servir de pont entre les différents écosystèmes représentés en bleu (Nwuosu, V.C. 2001).

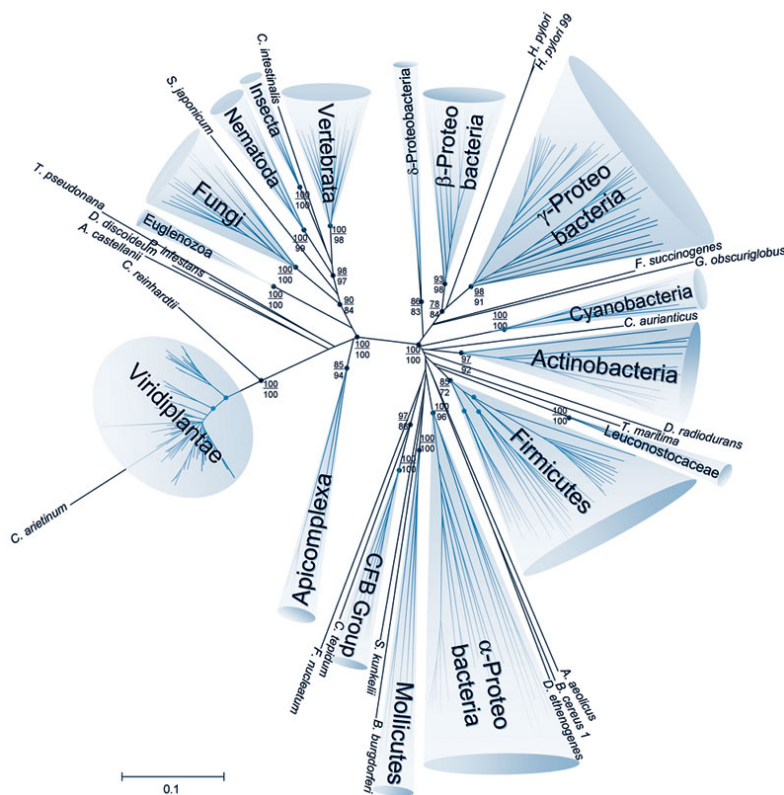


Fig.12 : Arbre phylogénétique global réalisé en comparant les séquences de la Méthionine adénosyl Transférase (MAT) (Sanchez-Perez *et al*, 2004). (<http://www2.iib.uam.es/gfsanchez/MAT/Main.htm>).



Organism	Bacteriocin
<i>S. salivarius</i>	Salivaricin A
<i>S. salivarius</i>	Salivaricin B
<i>S. salivarius</i>	Salivaricin A2
<i>S. pyogenes</i>	Streptococcin A-FF22
<i>S. macedonicus</i>	Macedocin
<i>S. pyogenes</i>	Streptin
<i>S. mutans</i>	Mutacin I Mutacin II (H-29B)
<i>S. mutans</i>	Mutacin N
<i>S. mutans</i>	Mutacin B-Ny266
<i>S. mutans</i>	Mutacin III (Mutacin 1140)
<i>S. bovis</i>	Bovicin HJ50
<i>S. uberis</i>	Nisin U
<i>S. mutans</i>	SmbA SmbB
<i>S. rattus</i>	BHT-A(Smb like) BHT-Aa BHT-Ab
<i>S. mutans</i>	Mutacin IV Petide A Petide B
<i>S. thermophilus</i>	Thermophilin 13 (A) ThmA ThmB
<i>S. bovis</i>	Bovicin 255
<i>S. rattus</i>	BHT-B

### Streptocoques

Organism	Bacteriocin
<i>E. faecalis</i>	Cytolysin Cyl' 'L Cyl' 'S
<i>E. faecium</i>	Enterocin A
<i>E. faecium</i>	Enterocin P
<i>E. faecium</i>	Bac 32
<i>E. faecium</i>	Bacteriocin GM-1
<i>E. faecalis</i>	Bac 31
<i>E. mundtii</i>	Mundtacin ATO6, Mundtacin KS Enterocin CRL35 Mundtacin QU2
<i>E. faecalis</i>	Enterocin SE-K4
<i>E. faecium</i>	Bacteriocin T8
<i>E. faecium</i>	Enterocin B
<i>E. faecalis</i>	Enterocin 1071A Enterocin 1071B
<i>E. faecalis</i>	MR10A MR10B
<i>E. faecium</i>	Enterocin L50 L50A L50B
<i>E. faecium</i>	Enterocin Q
<i>E. faecalis</i>	Enterocin EJ97
<i>E. faecium</i>	Enterocin RJ-11
<i>E. faecalis</i>	AS-48

### Entérocoques

Fig.13 : Répertoire des antibiotiques produits par les espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus*. D'après Nes *et al*, 2006.



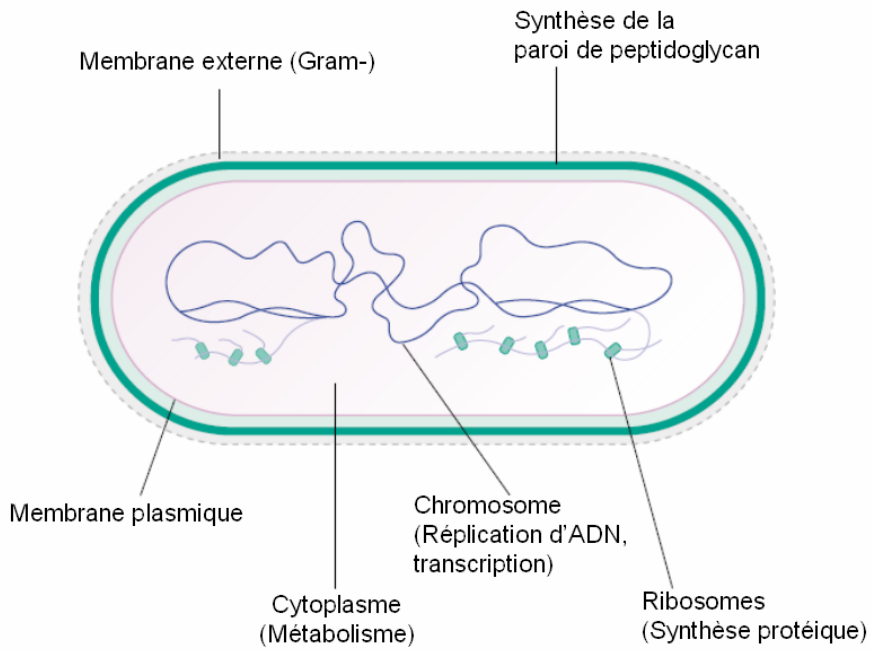


Fig.14 : Vue globale des fonctions bactériennes essentielles.

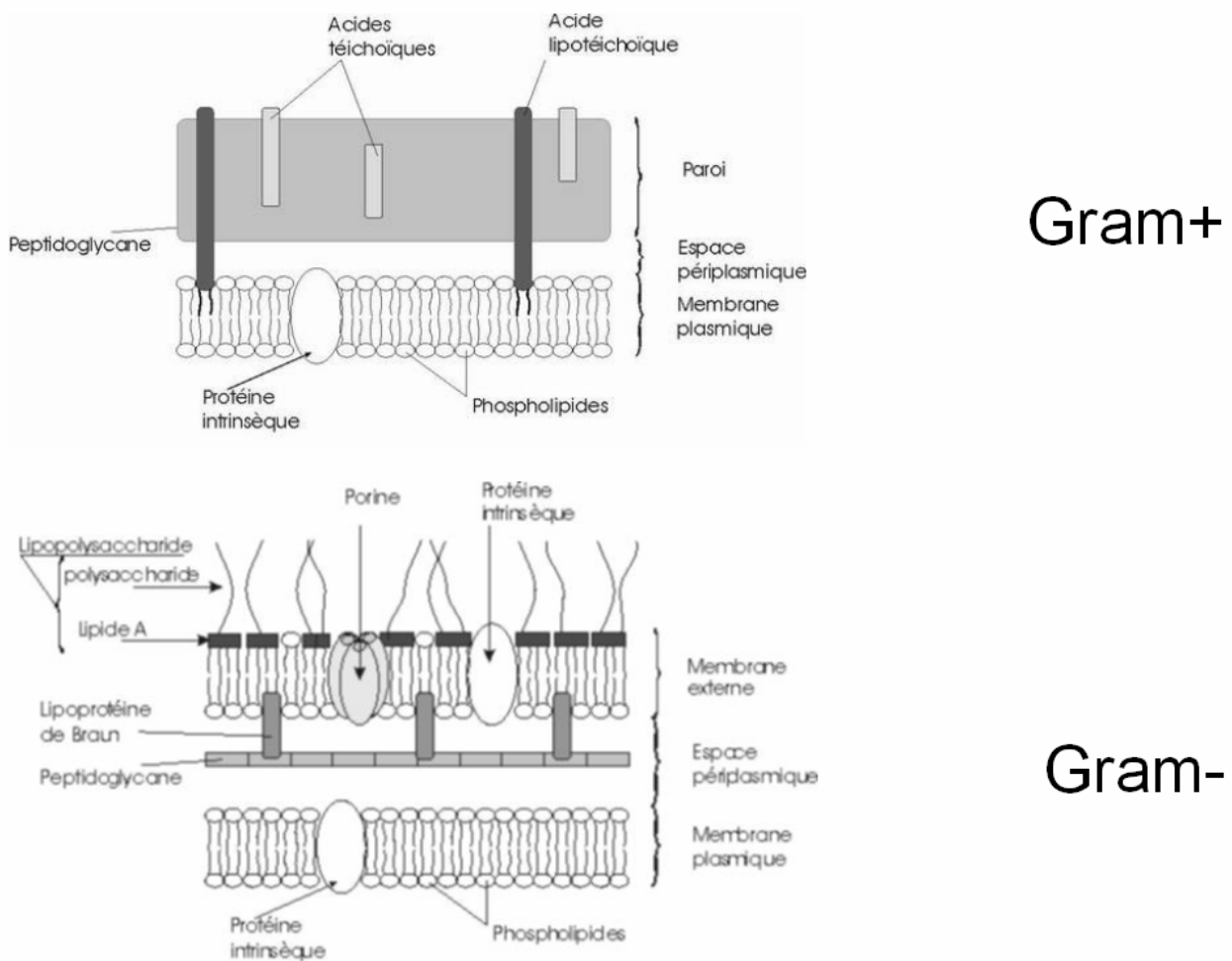


Fig.15 : Enveloppe bactérienne des bactéries à Gram négatif et positif.

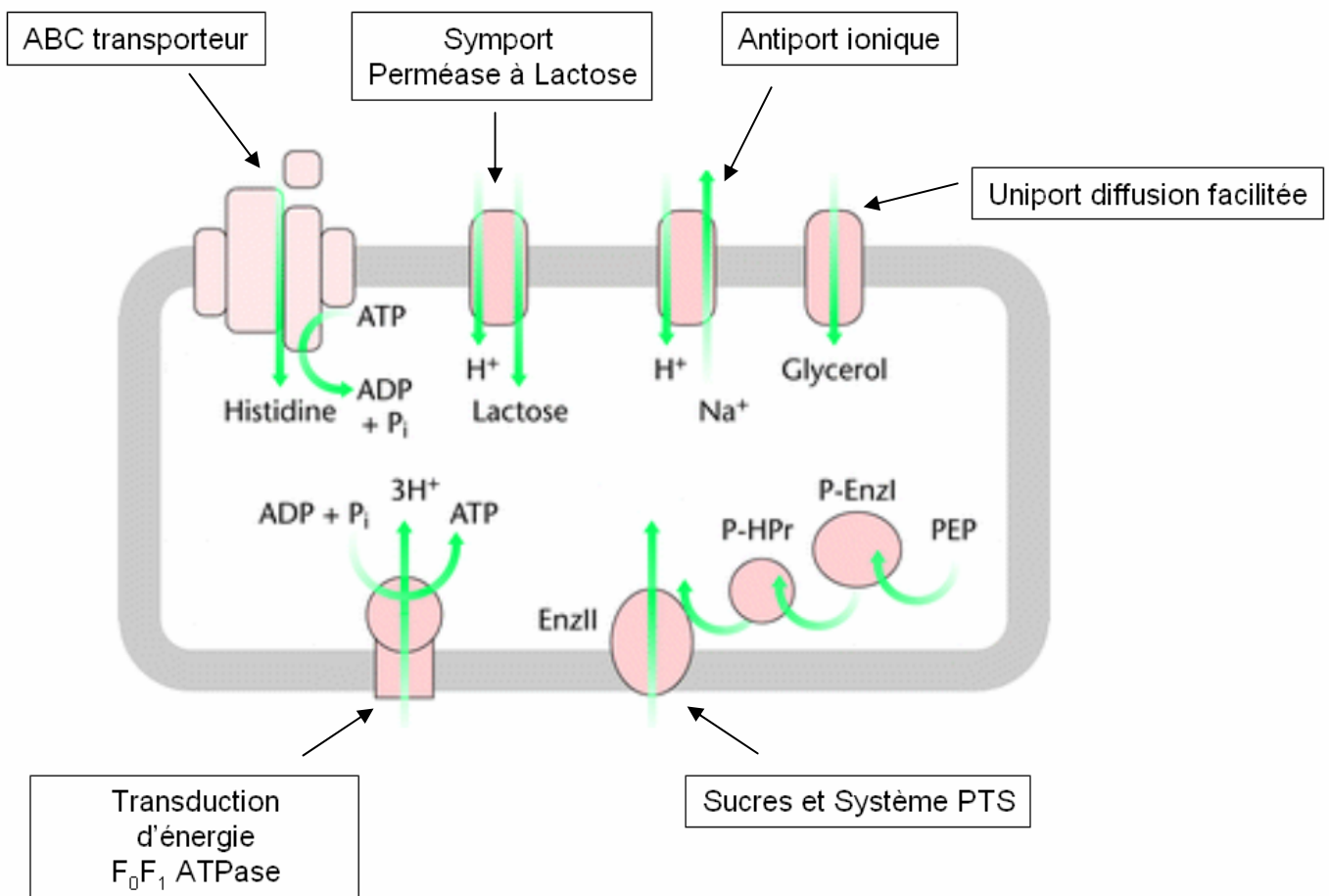


Fig.16 : Membrane plasmique et échanges avec le milieu extérieur.

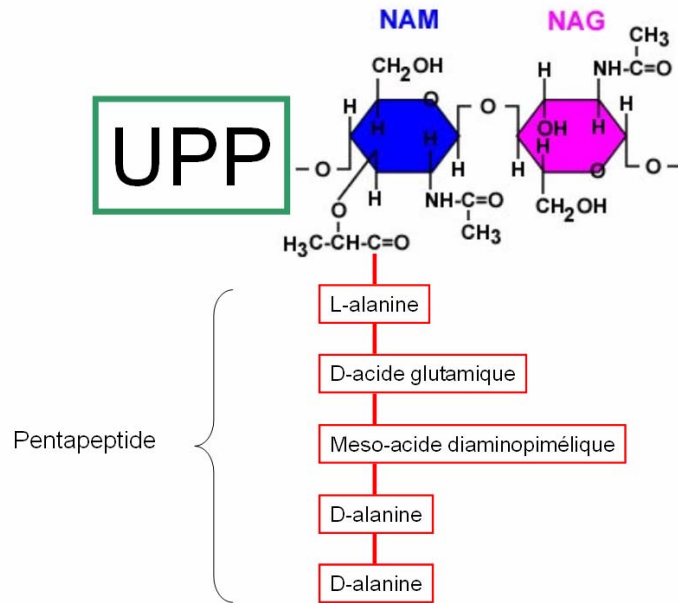


Fig.17 : Le précurseur monomérique de peptidoglycane (ou Lipide II) chez *B. subtilis*. NAM, N-acide-acétylmuramique ; NAG, N-acétylglucosamine, UPP, Undécaprényl pyrophosphate. D'après Archibald *et al*, 1993.

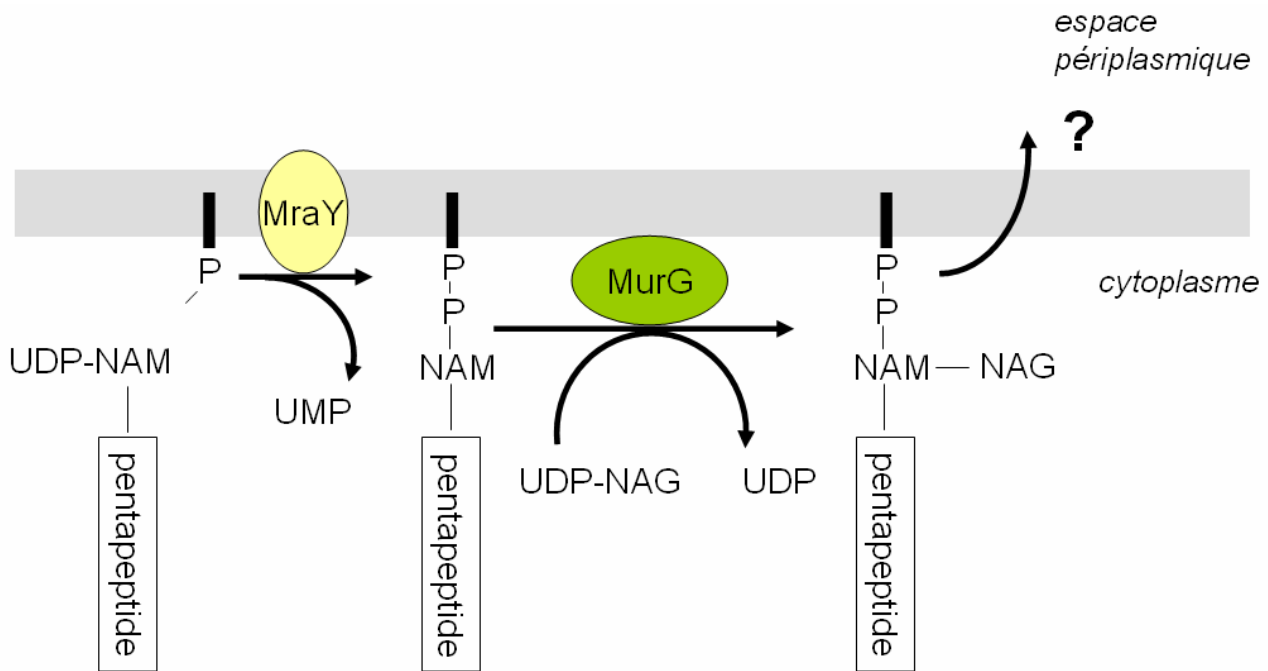


Fig.18 : Etapes cytoplasmiques de biosynthèse du précurseur de peptidoglycane. La translocase MraY catalyse la fixation de l'UDP-NAM-pentapeptide au translocateur lipidique, l'UP, formant le lipide I. Puis, L'enzyme subcellulaire MurG permet la formation du disaccharide NAM-NAG, donnant le lipide II complet. Le mécanisme de translocation du lipide II du cytoplasme vers l'espace périplasmique est inconnu.

—P, undécaprényl phosphate ; —PP, undécaprényl pyrophosphate.

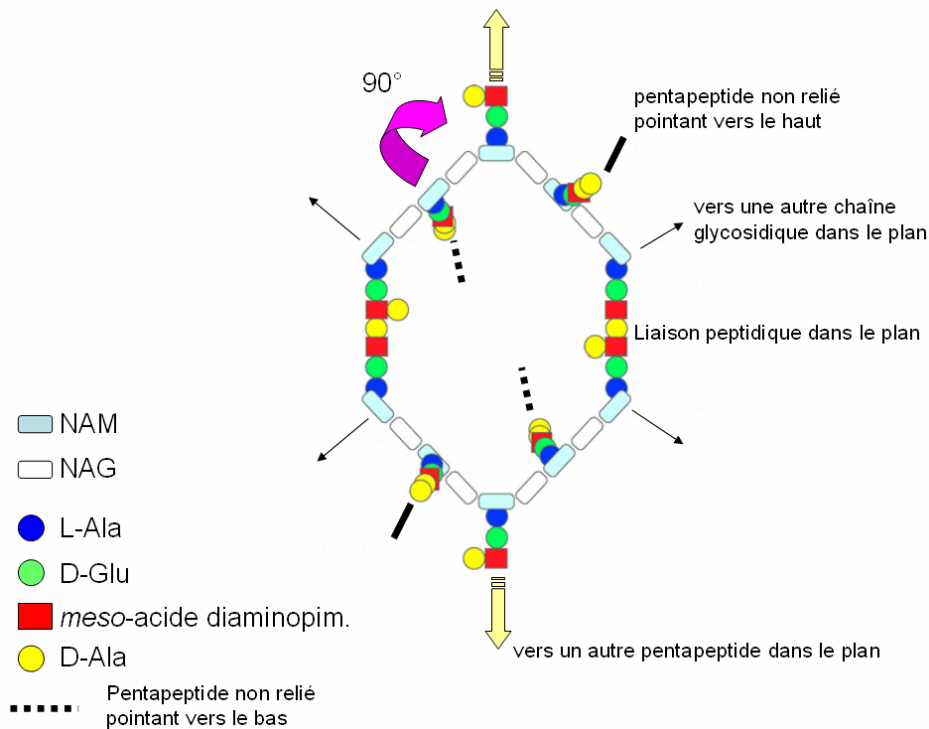


Fig.19: Structuration de la maille de peptidoglycane, le “Tessera”. La chaîne glycosidique (en bleu) forme une hélice tournante dans le sens des aiguilles d’une montre. Les pentapeptides émergent successivement de cette hélice en formant un angle de 90° dans l’espace lorsqu’on les compare l’une avec l’autre (flèche rose). Dans un même plan, les polymères de peptidoglycane forment une structure hexagonale dont 4 côtés sont formés par les chaînes glycosidiques NAM-NAG et 2 par les liaisons peptidiques croisées (Koch, 1998). Le diamètre de l’hexagone est estimé entre 3 et 5 nm.

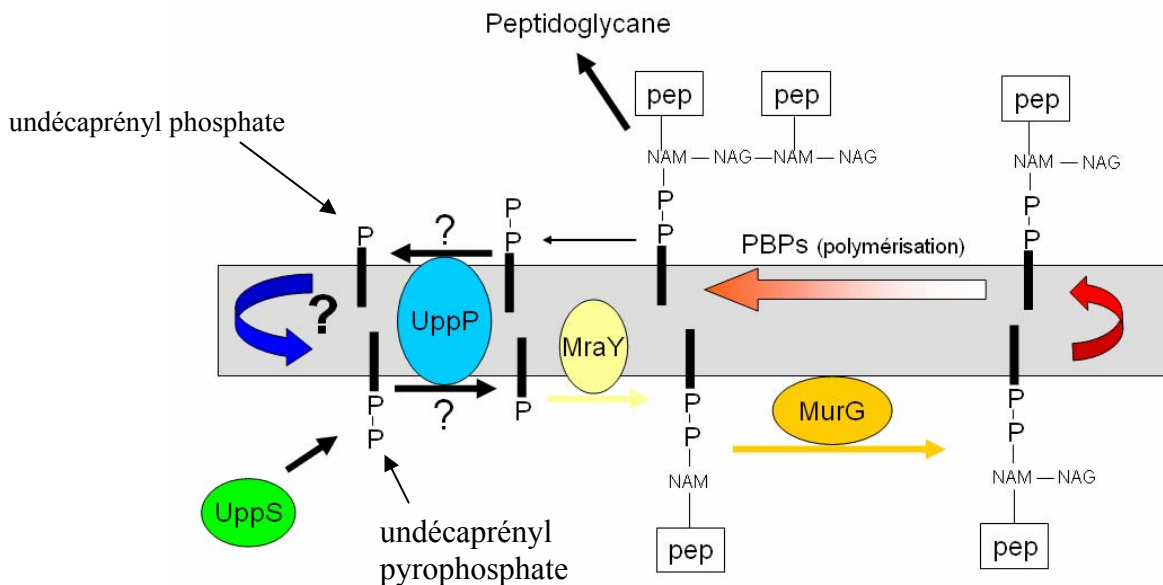


Fig.20 : Dernière étape du cycle de biosynthèse de peptidoglycane, la régénération du translocateur lipidique, l’undécaprényl phosphate. UppP, UPP phosphatase ; UppS, UPP synthase ; pep, pentapeptide ; PBPs, Penicillin Binding Proteins.

Protéine (source, n° accession)	Domaine 1	Dom. 2	Domaine 3
PGP <sup>f</sup> phosphatase ( <i>E. coli</i> , P18201)	96-KDKVQEPRP-54-PSGH-36-SRLLLGMHWPRD-254		
PGP phosphatase ( <i>H. influenzae</i> , P44570)	93-KALFEEPRP-54-PSGH-41-SRVRLGMHYPID-241		
PA <sup>8</sup> phosphatase ( <i>M. musculus</i> , D84376)	119-KYTIGSLRP-39-YSGH-44-SRVSDYKHHWSD-283		
Glucose-6-phosphatase ( <i>H. sapiens</i> , P35575)	75-KWILFGQRP-31-PSGH-49-SRIYLAAHFPHQ-357		
Glucose-6-phosphatase ( <i>R. norvegicus</i> , L37333)	71-KWILFGQRP-31-PSGH-49-SRIYLAAHFPHQ-353		
Glucose-6-phosphatase ( <i>M. musculus</i> , P35576)	75-KWILFGQRP-31-PSGH-49-SRIYLAAHFPHQ-357		
Phosphatase ( <i>T. denticola</i> , L25421)	82-KRILKI PRP-17-PSGH-54-SRVYLG VHYPTD-341		
Apyrase ( <i>S. flexneri</i> , U04539)	123-KEYYKVRP-23-PSGH-31-SRVICGAHWQSD-246		
NS-phosphatase <sup>h</sup> ( <i>S. typhimurium</i> , S14515)	122-KKYMRTRP-23-PSGH-31-SRVICGAHWQSD-232		
NS-phosphatase ( <i>M. morgani</i> , P28581)	132-KEHYMRIRP-23-PSGH-31-SRVICGYHWQSD-249		
NS-phosphatase ( <i>P. stuartii</i> , P26975)	132-KEHYMRIRP-23-PSGH-31-SRVICGYHWQSD-248		
Acid phosphatase ( <i>Z. mobilis</i> , P14924)	131-KNNWNRKRP-23-PSGH-31-SRIVCGAHWFSD-264		
Hypothetical ( <i>S. cerevisiae</i> , U51031) <sup>i</sup>	117-KNWIGRLRP-39-PSGH-46-SRTQDYRHHFVD-289		
Hypothetical ( <i>S. cerevisiae</i> , U33057)	135-KLIIGNLRP-41-PSGH-38-SRVIDHRHHWYD-275		
Hypothetical ( <i>S. cerevisiae</i> , X87371)	127-KDYWCLPRP-20-PSSH-42-GRIYCGMHGILD-409		
Hypothetical ( <i>S. cerevisiae</i> , Z28278)	128-KDYWCLPRP-20-PSSH-42-GRVYCGMHGILD-404		
Hypothetical ( <i>C. elegans</i> , Z68105)	160-KCYVGRLRP-44-PSGH-47-TRVTDNWHFPTD-318		
Hypothetical ( <i>C. elegans</i> , U28738)	143-KHVVGRLRP-41-YSGH-45-SRITDNKHHWSD-341		
Hypothetical ( <i>C. elegans</i> , U39648)	82-KFYFHRERP-17-PSGH-31-SRVALGRHYITD-345		
Hypothetical ( <i>Synechocystis</i> sp., D64003)	133-KPFNRTPRP-12-PSGH-39-ASMYCRVHWATD-240		
Hypothetical ( <i>D. mobilis</i> , S01073)	77-KHLFNTFRP-12-PSGH-33-SRLYLRAHYPID-225		
Hypothetical ( <i>B. megaterium</i> , S32217)	106-KLFFQRRAP-13-PSGH-41-SRIYLG VHYPSD-216		
Chloroperoxidase ( <i>C. inaequalis</i> , X85369)	352-KWEFEFWRP-39-PSGH-84-SRIFLGVHWRFD-609		
YbjG ( <i>E. coli</i> )	74-GHLFPHDRP-16-PSDH-32-SRVYLG VHWPLD-196		

Consensus

(K/G)<sub>6</sub>RP-(X<sub>12-54</sub>)-PSXH-(X<sub>31-54</sub>)-SRX<sub>5</sub>HX<sub>3</sub>D

Fig.21 : Alignements des phosphatases de la famille PAP<sub>2</sub>. Les chiffres indiquent le nombre de résidus précédant ou suivant les motifs conservés. Le dernier chiffre indique le nombre de résidus total de chaque protéine. Le motif consensus défini par Stukey et Carman est indiqué dans le code lettres-aminoacides habituels. D'après Stukey et Carman, 1997.

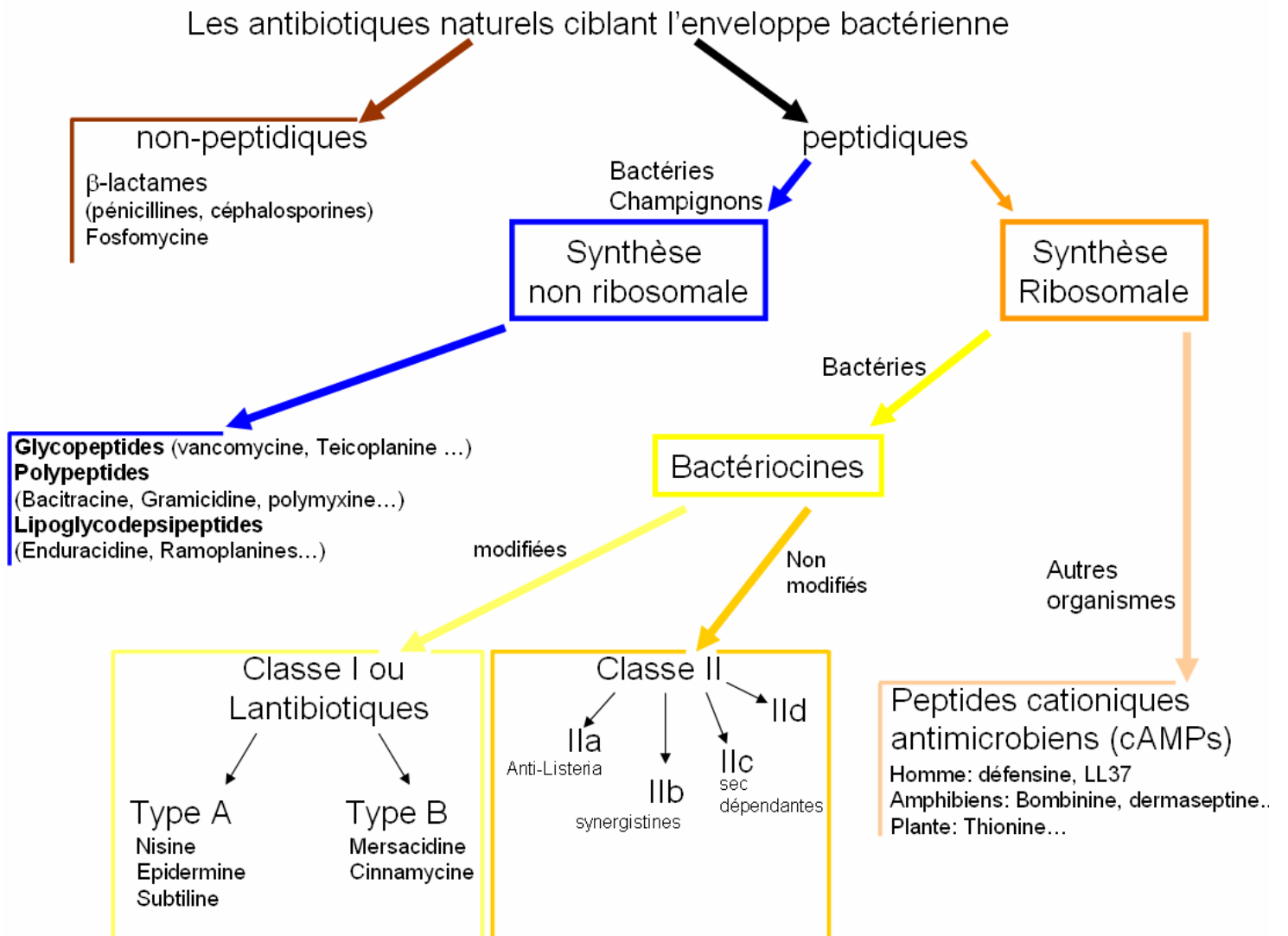


Fig.22 : Classification des antibiotiques naturels ciblant l'enveloppe bactérienne.

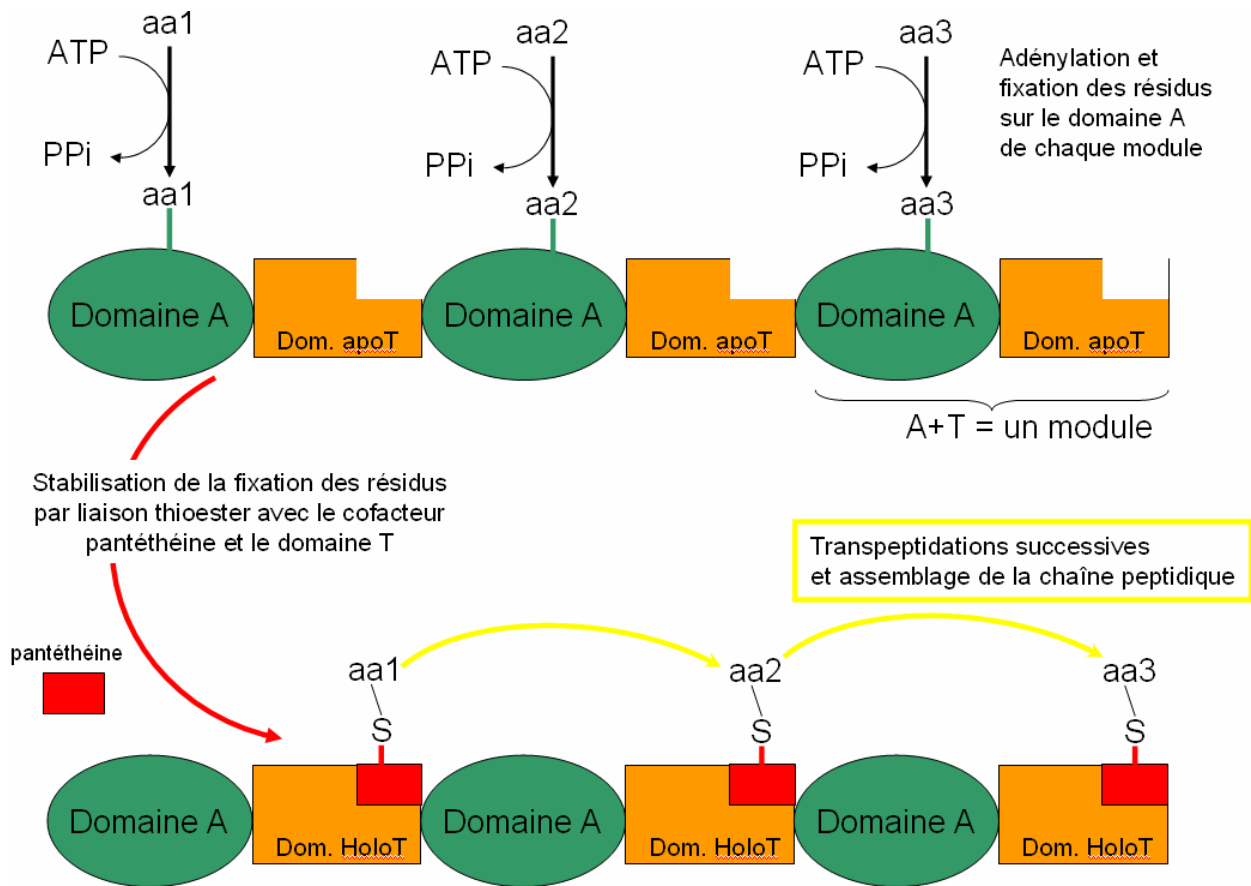
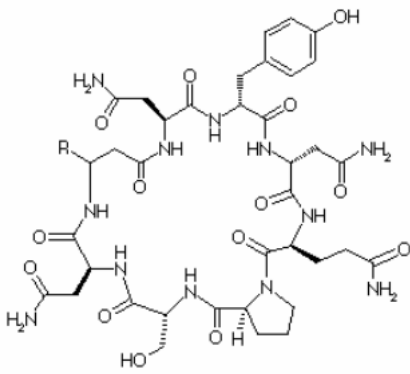
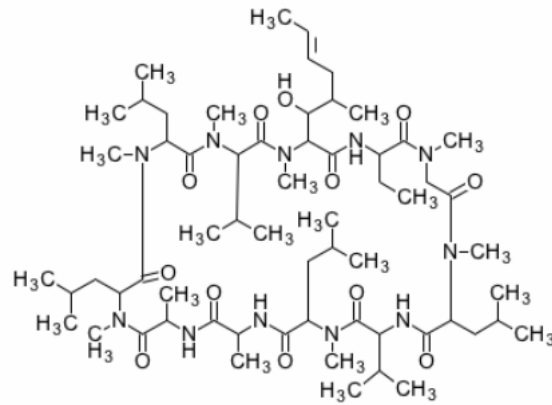


Fig.23 : Biosynthèse non-ribosomale des antibiotiques peptidiques. Chaque résidu aminoacide est activé par adénylation à partir d'une molécule d'ATP puis fixé au domaine A de chacun des modules de la peptide synthétase. La fixation du résidu est ensuite stabilisée par une liaison thioester entre le résidu, le cofacteur pantéthéine et le domaine T de chaque module. Enfin, des réactions de transpeptidations successives permettent l'assemblage séquentiel de la chaîne polypeptidique. D'après Stein *et al*, 1996 ; Konz et Marahiel, 1999.

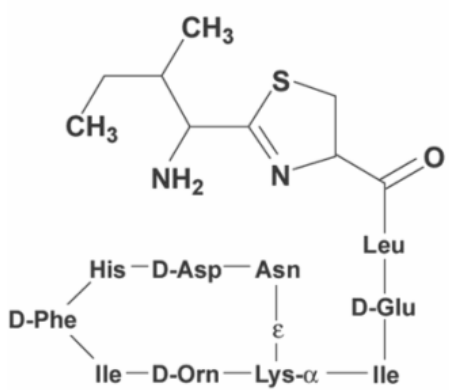


Mycosubtiline, *B. subtilis*

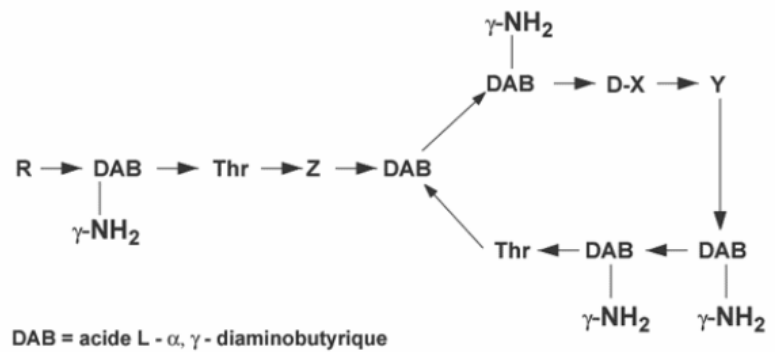


Cyclosporine, *B. nivea*

Fig.24 : Exemples d'antibiotiques cycliques à synthèse non-ribosomale.



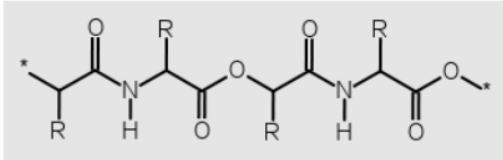
Bacitracine A



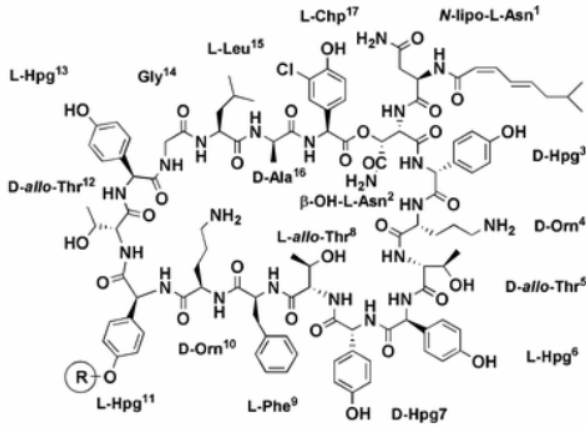
Polymyxine

Fig.25 : Exemples d'antibiotiques à branches cycliques.

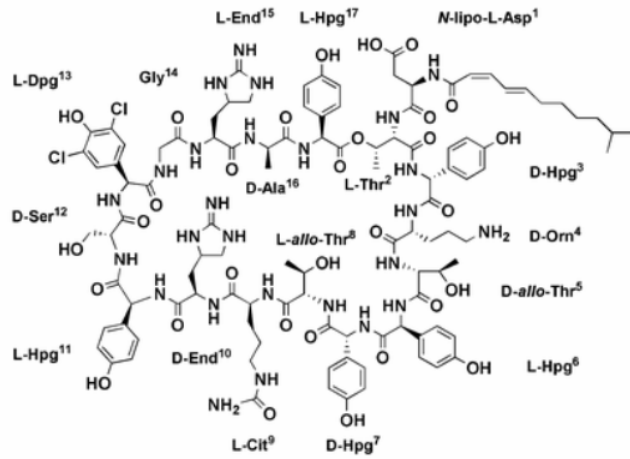




Chaîne depsipeptidique

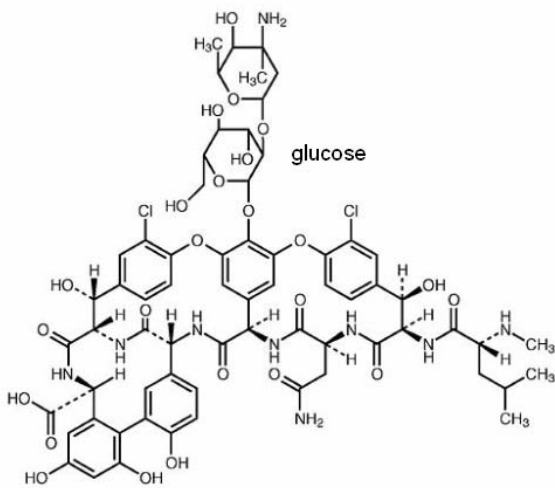


Ramoplanine A2

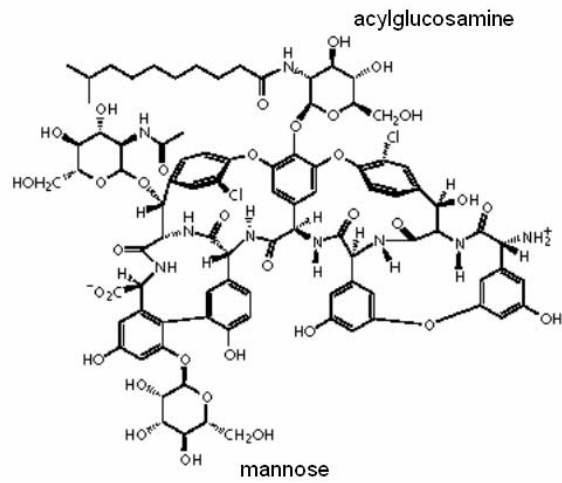


Enduracidine

Fig.26 : Antibiotiques à chaîne depsipeptidique.

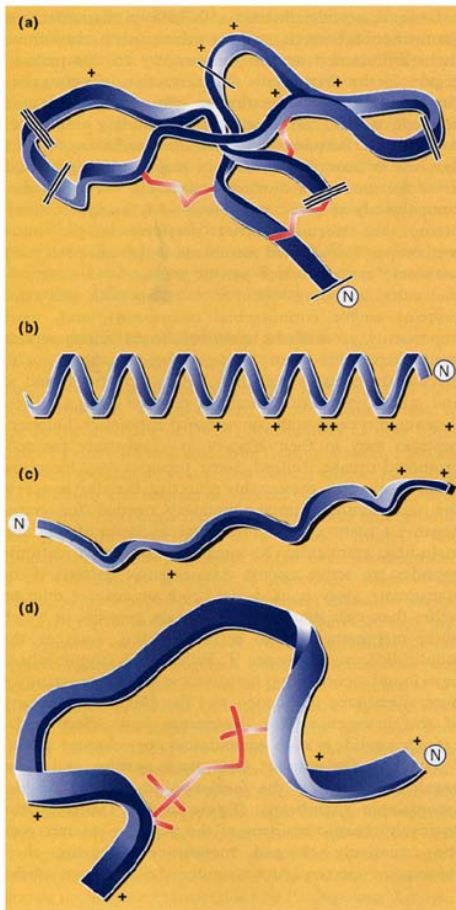


Vancomycine



Téicoplanine

Fig.27 : Antibiotiques de type Glycopeptide.



**a- Structure en feuillet  $\beta$  maintenue par plusieurs ponts dissulfures**  
 exemple:  $\beta$ -defensine produite par les cellules neutrophiles humaines

**b- Structures en Hélices  $\alpha$ , sans ponts dissulfures**  
 ex: Cecropine, insecte

**c- Structures en Hélices élargies, polyprohélices (résidus prolines, tryptophanes ou arginines)**  
 ex: Indolicidine, neutrophiles bovins

**d- Structures loupes, un pont dissulfure**  
 ex: bactenecine, cellules neutrophiles bovines  
 brevenine, cellules épithéliales des amphibiens

Fig.28 : Diversité de structure des antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomale. D'après Hancock, R.E. 1997.

Microcin B17 (*E. coli*)  
Opéron *mcb*



Epidermine  
(*S. epidermidis*)  
Locus *epi*



Nisine (*L. lactis*)  
Locus *nis*



Fig.29 : Exemples de clusters de gènes de synthèse de lantibiotiques. Les flèches indiquent le sens de transcription. Les gènes placés dans une même flèche sont en opéron. La nomenclature de De Vos et coll. propose que le gène *lanA* code le gène de structure du précurseur du lantibiotique ; les gènes *lanB*, *C*, *D* et *M* codent les enzymes de modifications du précurseur ; le gène *lanP* code la protéase de maturation ; *lanI*, *F*, *E* et *G* codent des protéines d'immunités et *lanT* code les protéines impliquées dans la sécrétion du lantibiotique (De Vos *et al*, 1995). Les gènes de sécrétion de la microcine B17 ne sont pas dénommés suivant cette nomenclature.

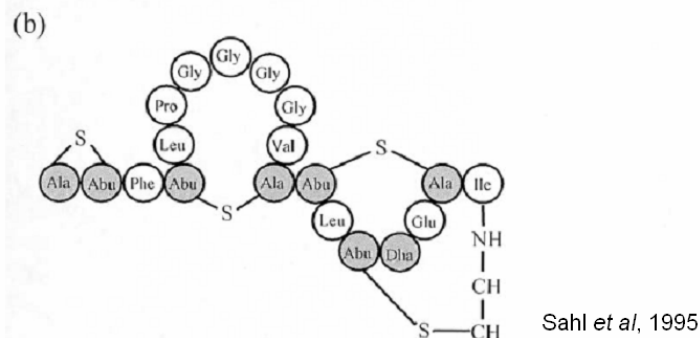
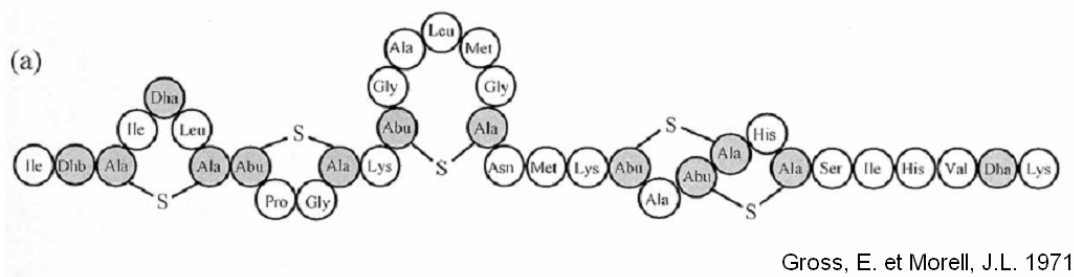
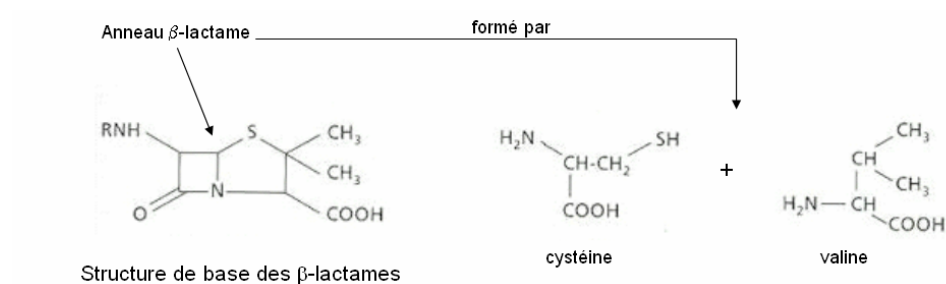


Fig.30 : Comparaison de structure entre un lantibiotique de type A, la nisine (a), et un lantibiotique de type B, la mersacidine (b). Les résidus dérivant de modifications post-traductionnelles sont en gris. Dha, déhydroalanine ; Dhb, déhydrobutyrine ; Abu, acide aminobutyrique ; Ala-S-Ala, lanthionine ; Abu-S-Ala, méthyl-lanthionine.



Quelques exemples:

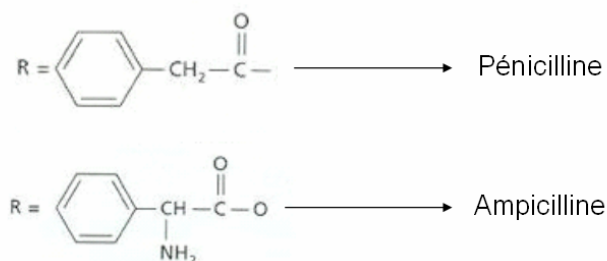


Fig.31 : Structure de l'anneau  $\beta$ -lactame et exemples de  $\beta$ -lactames.

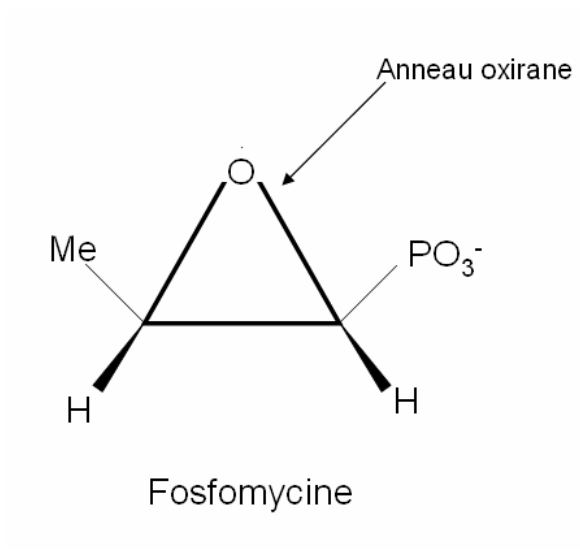
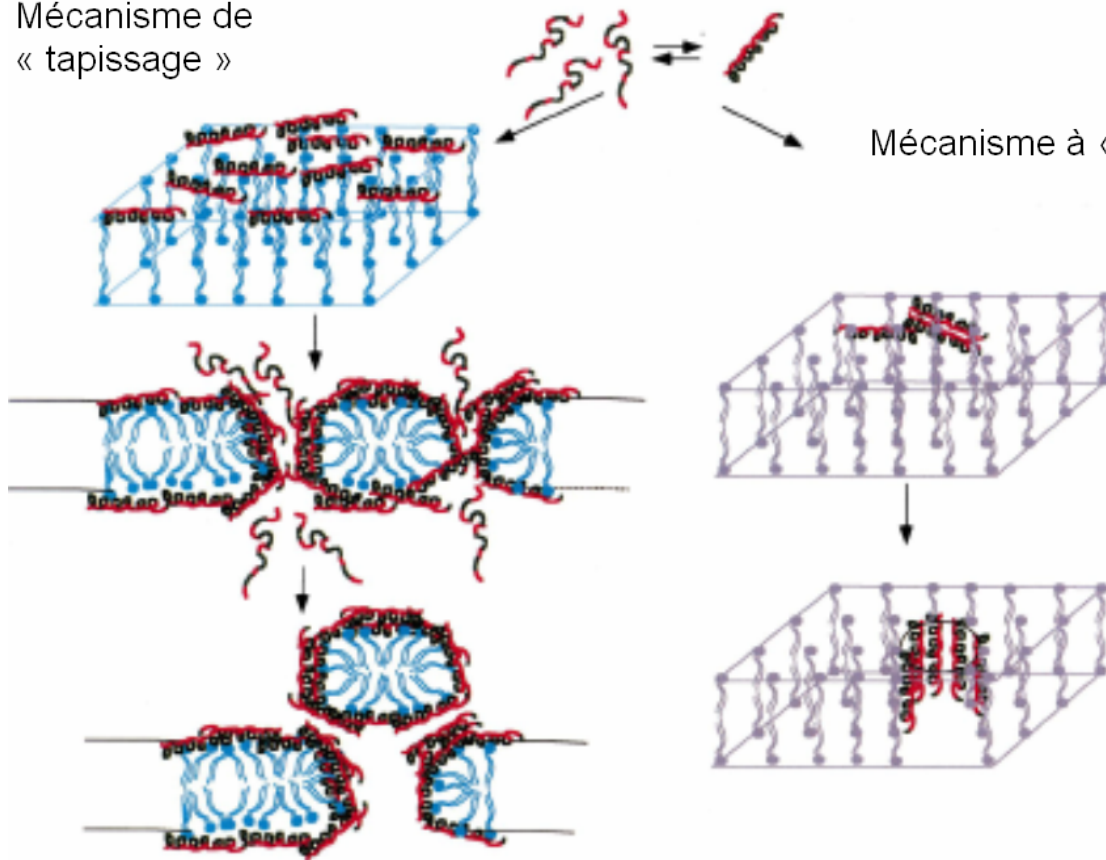


Fig.32 : Structure de la Fosfomycine.

Mécanisme de  
« tapissage »

Mécanisme à « Barres »



Rupture membranaire

Formation de pores

Fig.33 : Mode d'action des antibiotiques peptidiques cationiques. On distingue deux types de mécanismes. Le premier implique un tapissage de la membrane puis une courbure de la bicouche lipidique qui conduit à une rupture membranaire. Le second est uniquement observé avec les antibiotiques à structure hélicoïdale et consiste en la formation de pores membranaires par insertion de plusieurs monomères de l'antibiotique dans la bicouche.

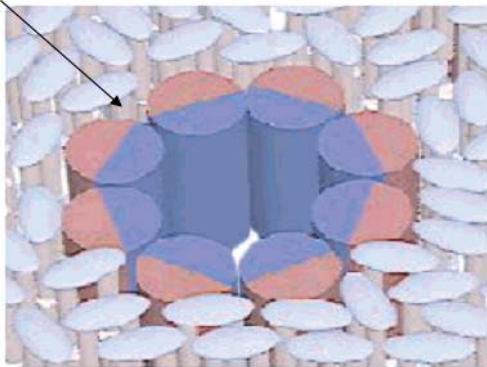
Pores membranaires formés par les antibiotiques à structure amphiphile

pore à barres

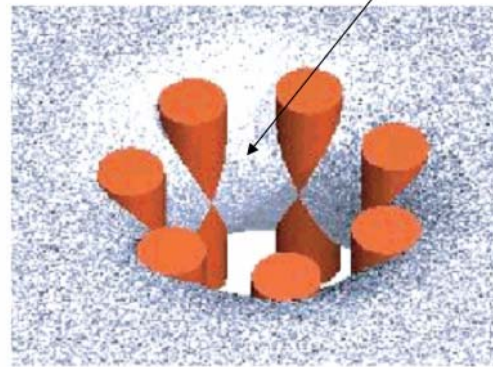
pore toroïdal

Insertion dans  
la partie  
hydrophobe  
de la bicouche  
pas de courbure

Courbure de la bicouche



alaméthicine



magainine

Fig.34 : Modélisation des pores formés par un antibiotique s'insérant dans la membrane (l'alaméthicine) et un antibiotique provoquant une courbure de la bicouche lipidique (la magainine). D'après Huang *et al*, 2000.



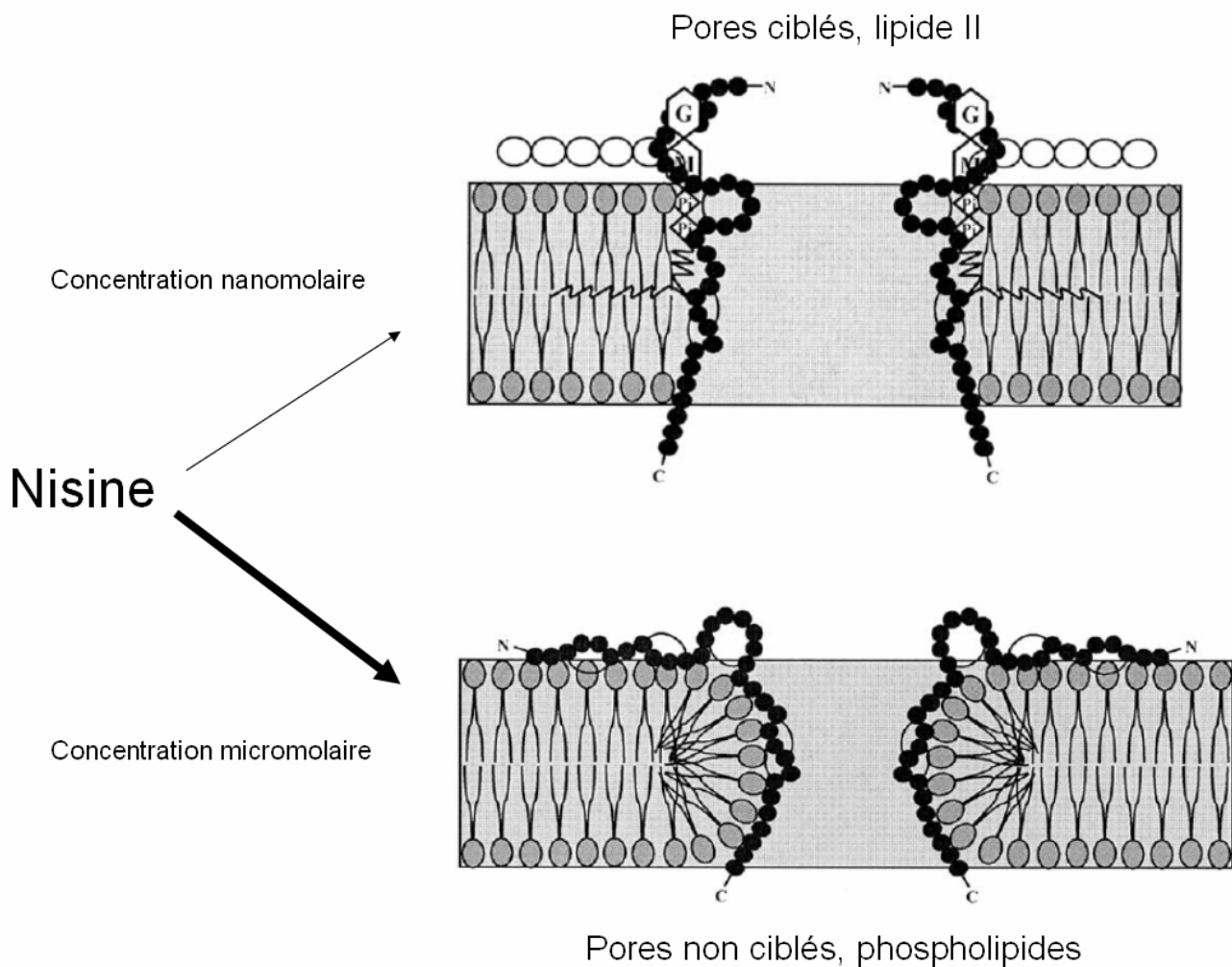


Fig.35 : Pores ciblés ou non-ciblés formés par la nisine dans la membrane plasmique. A forte concentration, les propriétés cationiques de la nisine lui permette d'interagir avec les phospholipides membranaires et de former des pores dits « non-ciblés ». A faible concentration, ce lantibiotique utilise une cible plus spécifique, le lipide II, pour initier la formation de pores dits « ciblés » (Breukink *et al*, 1999).



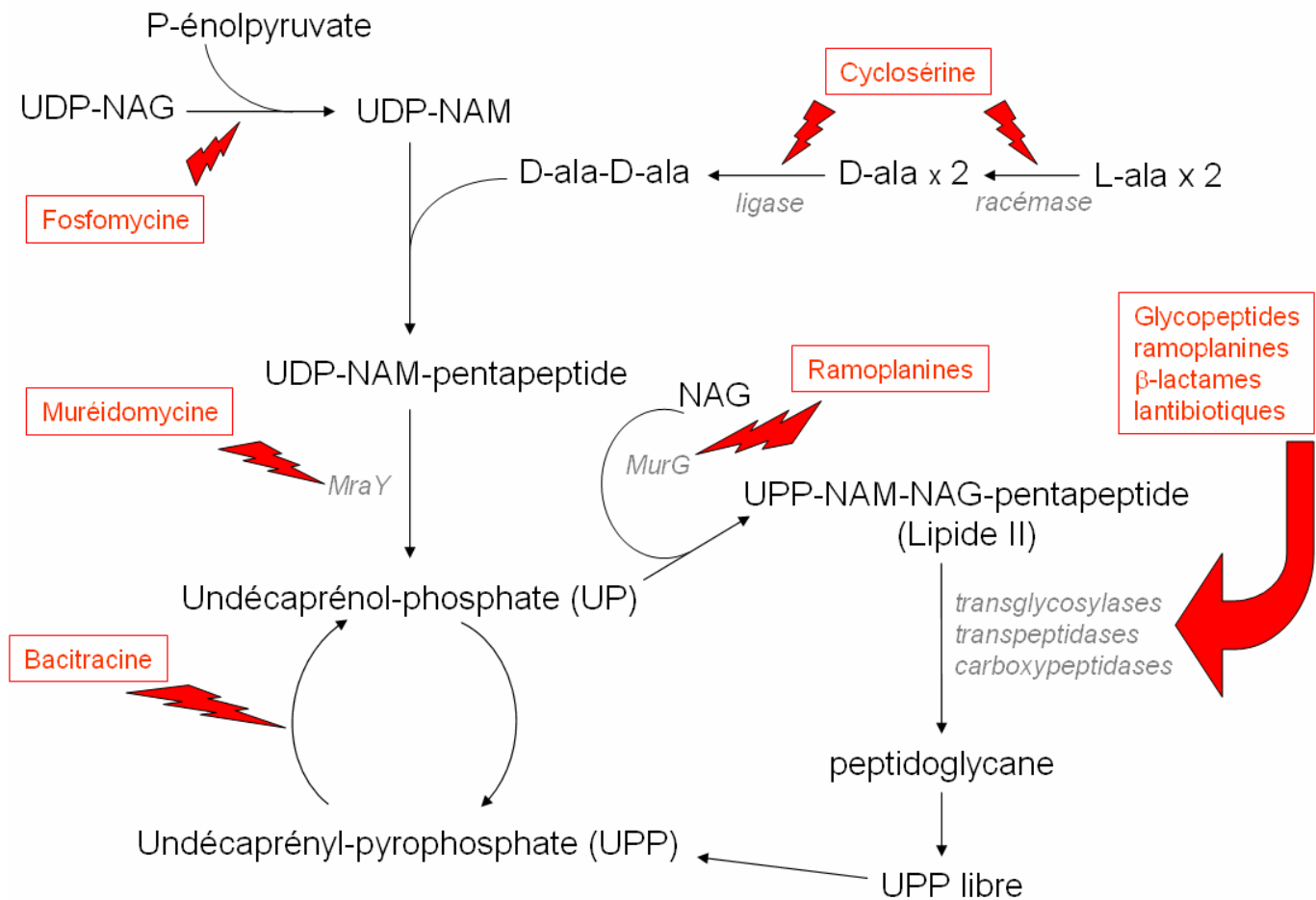


Fig.36 : Voie de biosynthèse du peptidoglycane et inhibition par les antibiotiques. L'ensemble des étapes de cette voie de biosynthèse est la cible d'au moins un antibiotique. On distingue sur ce schéma un exemple de dualité fonctionnelle avec les ramoplanines capables d'interagir avec deux étapes différentes dans la voie de biosynthèse. On remarque également un exemple de synergie moléculaire avec les étapes de polymérisation du peptidoglycane qui sont la cible d'une multitude d'antibiotiques différents.

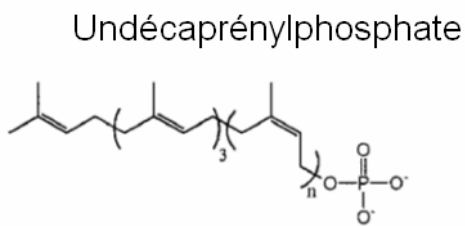
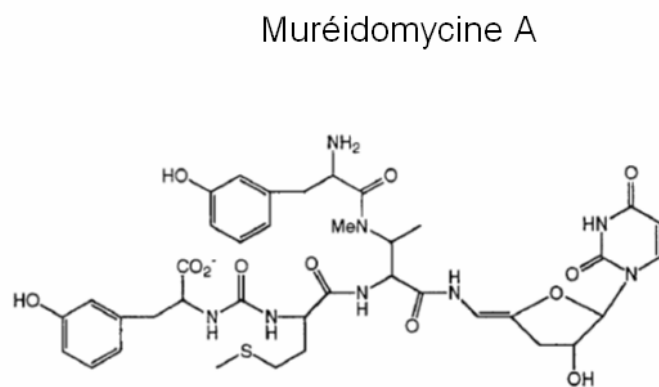
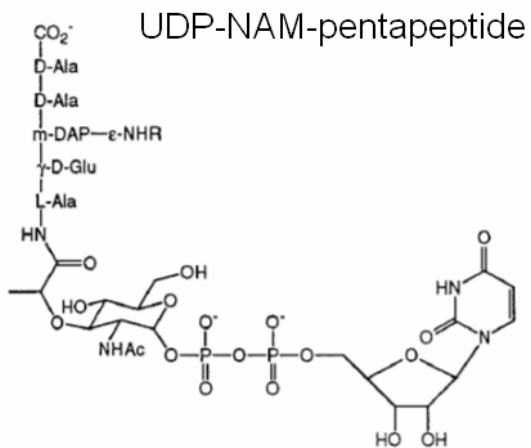
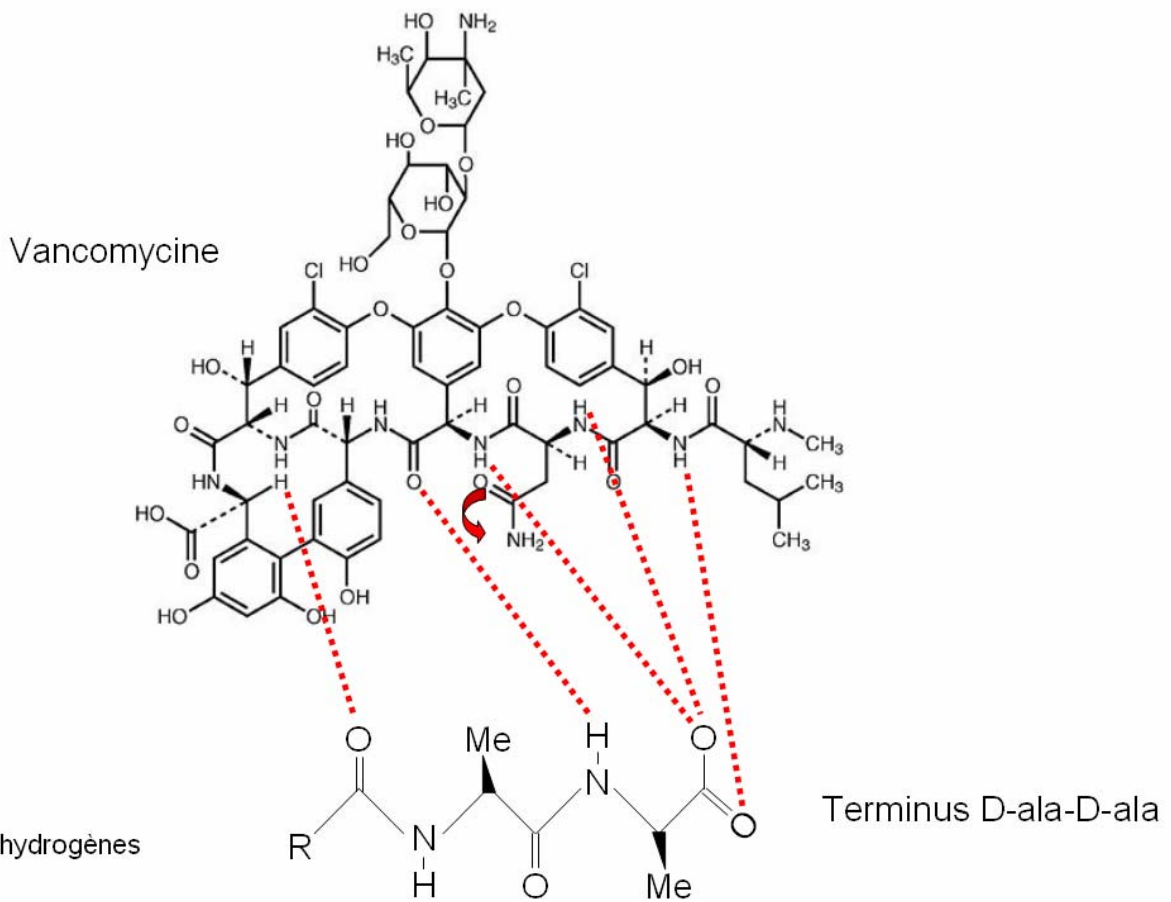


Fig.37 : Similarités de structure entre la muréidomycine A et les substrats de l'enzyme *MraY*. D'après Brandish *et al*, 1996.

A.



B.

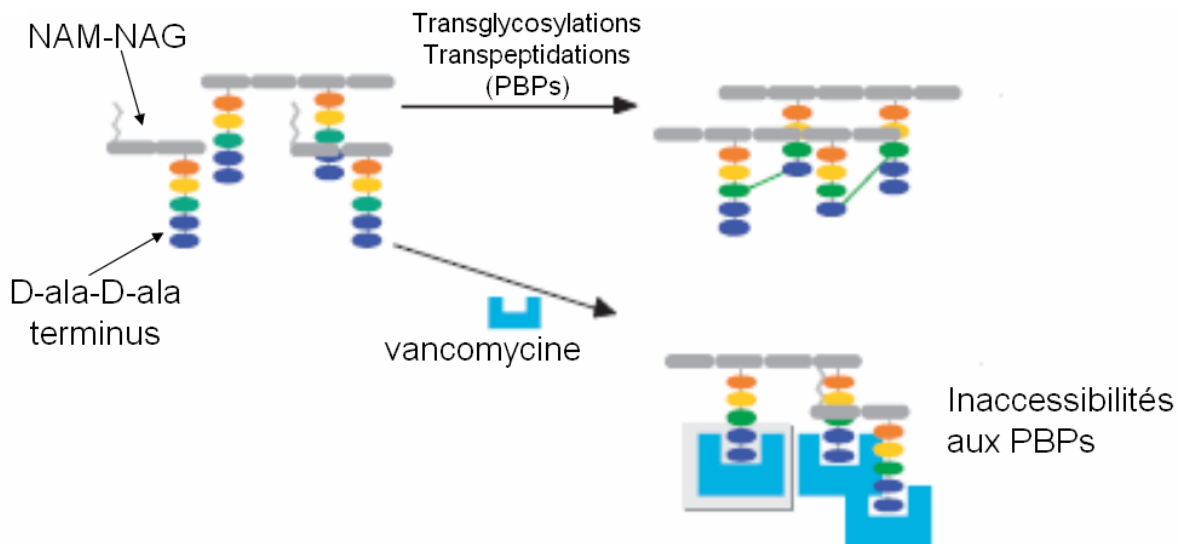


Fig.38 : Mode d'action de la vancomycine. A. Liaisons hydrogènes formées par la vancomycine avec sa cible, le dipeptide D-ala-D-ala terminant le pentapeptide du précurseur de peptidoglycane. B. Modèle du mode d'action de la vancomycine. Sa fixation aux précurseurs de peptidoglycane rend ces précurseurs inaccessibles aux enzymes polymérisant le peptidoglycane, les Penicillin Binding Proteins (PBPs). Adapté de Walsh, C. 2000.

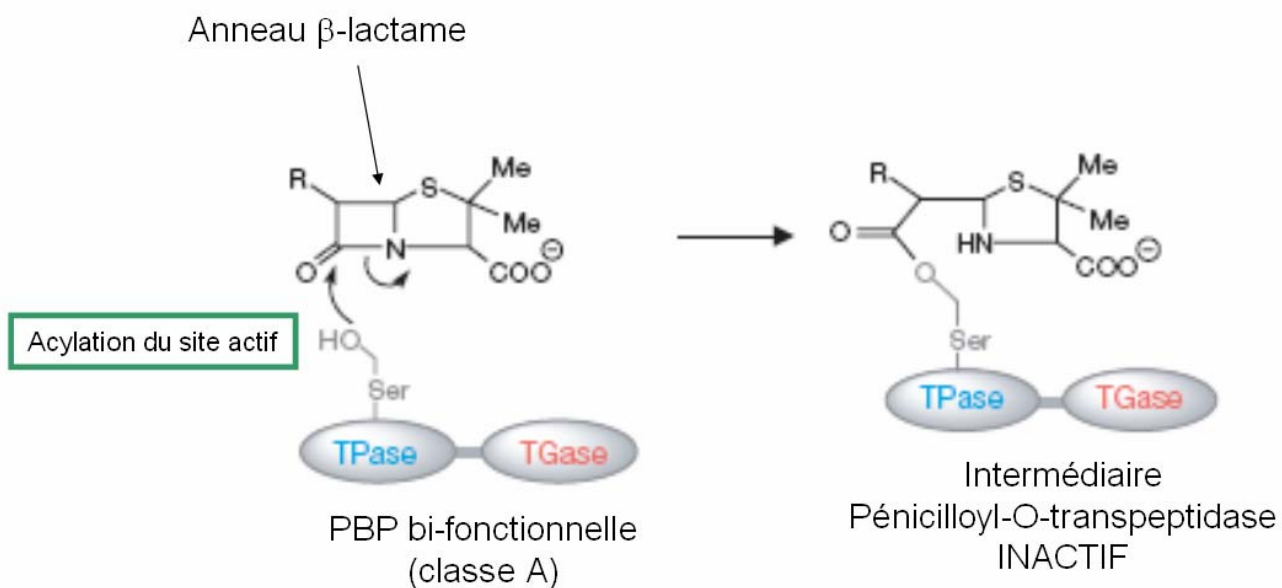


Fig.39 : Mode d'action des  $\beta$ -lactames. L'anneau  $\beta$ -lactame présente des similarités avec le substrat du domaine transpeptidase des PBPs, le dipeptide D-ala-D-ala. La fixation du domaine transpeptidase des PBPs aux  $\beta$ -lactames, par acylation, conduit à un complexe inactif de la PBP nommé Pénicilloyl-O-transpeptidase. (Tipper et Strominger, 1968).

TPase, domaine transpeptidase ; TGase, domaine transglycosylase ; Ser, résidu sérine conservé du site actif du domaine transpeptidase.

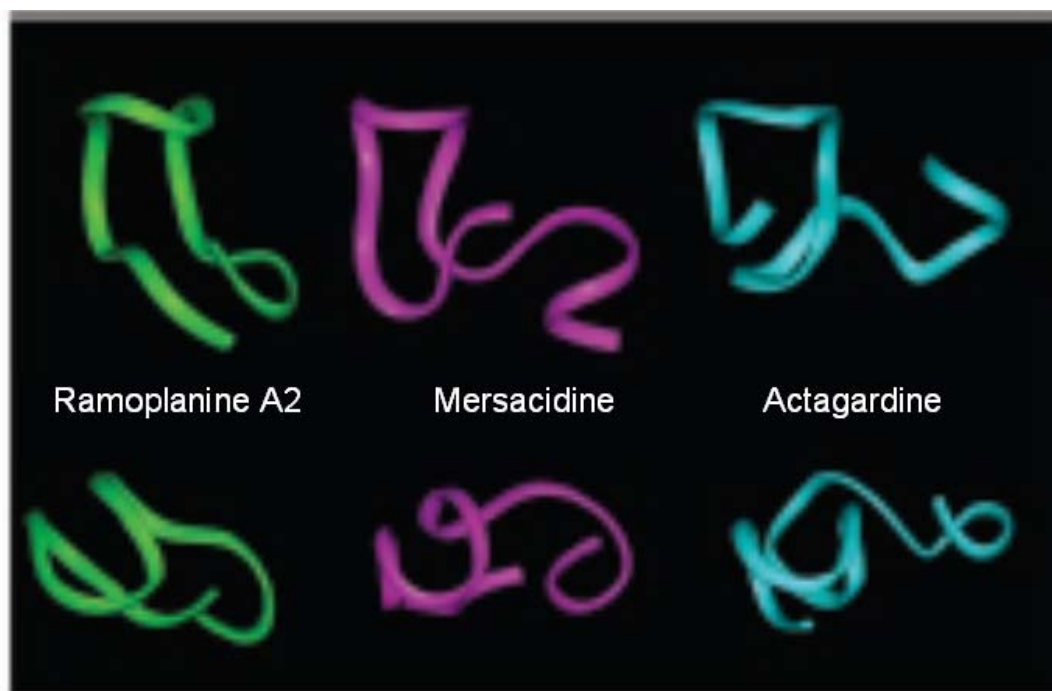
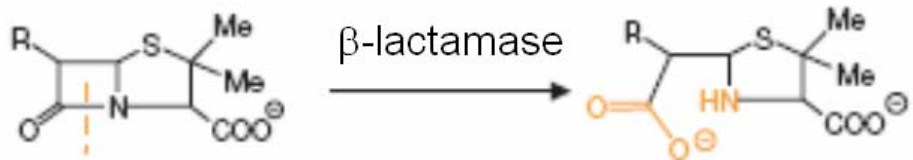


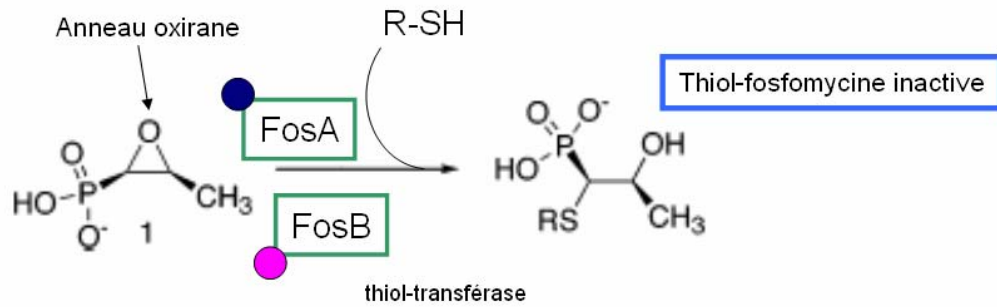
Fig.40 : Similarités de structure squelettique tertiaire entre la ramoplanine A2 et les lantibiotiques de type B. D'après Cudic *et al*, 2002.

Anneau  $\beta$ -lactame intact

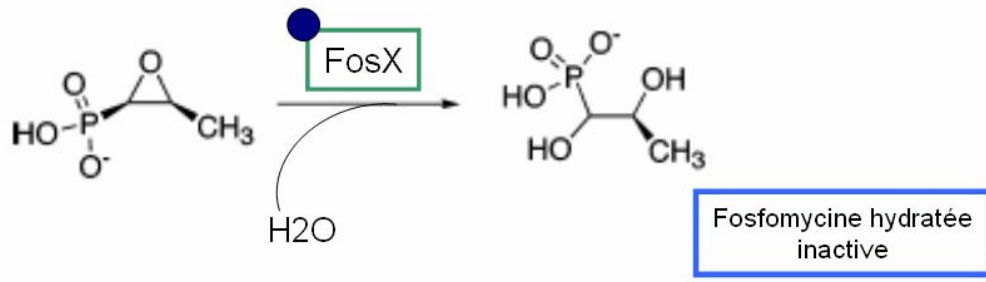


Acide penicilloïque  
(inactif)

Fig.41 : Mécanisme d'inactivation des  $\beta$ -lactames par les  $\beta$ -lactamases. L'hydrolyse de l'anneau  $\beta$ -lactame par les  $\beta$ -lactamases aboutit à l'ouverture de l'anneau, rendant l'antibiotique inactif. Me, groupement méthyl.



Fosfomycine active



Mg<sup>2+</sup>

Mn<sup>2+</sup>

Fig.42 : Diversité des enzymes pouvant inactiver la fosfomycine. Les enzymes de type FosA ou FosB sont des fosfomycine-thiol-transférases, pouvant inactiver la fosfomycine par ajout d'un groupement thiol au niveau de l'anneau oxirane de l'antibiotique. Les enzymes de type FosX inactivent l'antibiotique par hydratation. Les différents cofacteurs métalliques nécessaires à ces enzymes sont indiqués. Adapté de Fillgrove *et al*, 2004.

ANTIBIOTIQUES

BACTERIES

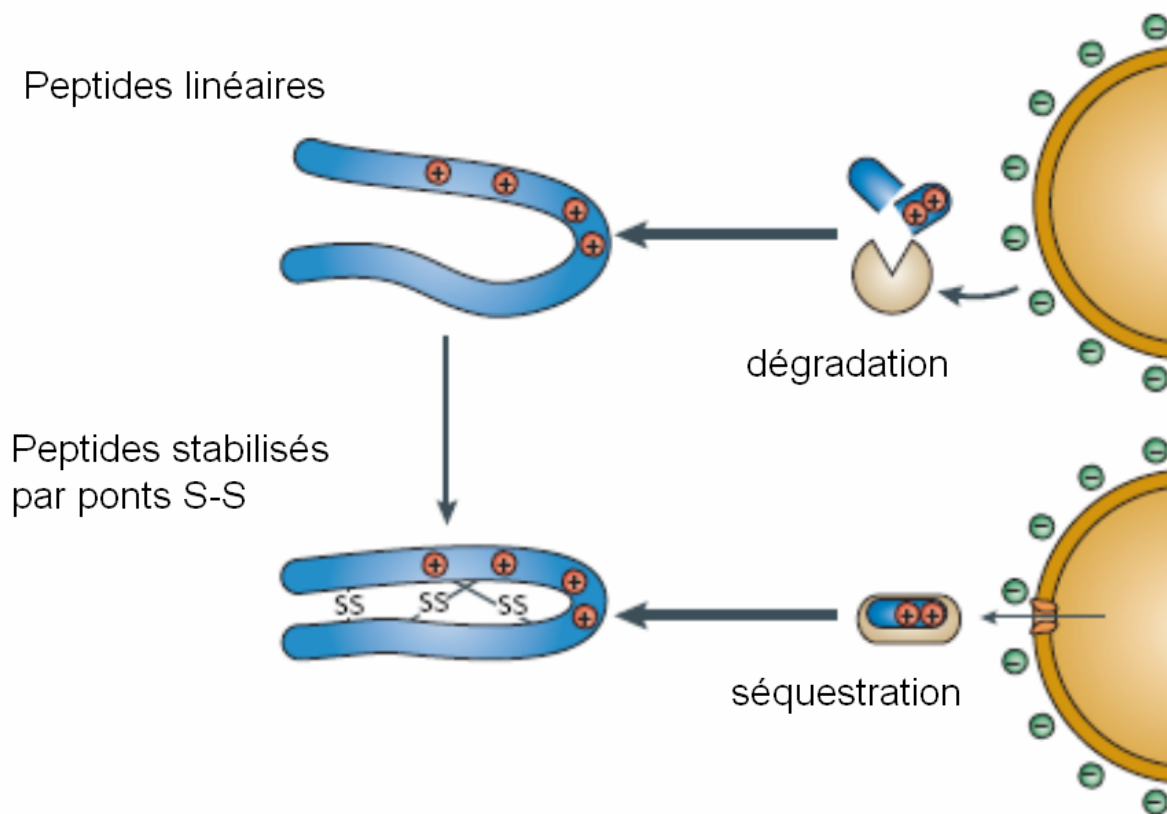


Fig.43 : Mécanismes de dégradation ou de séquestration des antibiotiques peptidiques cationiques. Les antibiotiques cationiques à structure hélicoïdale sont la cible de protéases sécrétées par la bactérie et dégradant l'antibiotique (haut de la figure). Certains antibiotiques, dont la structure est stabilisée par des ponts dissulfures (SS), sont résistants à ces protéases bactériennes. La bactérie peut alors sécréter des protéines qui séquestrent l'antibiotique et l'empêchent d'interagir avec sa cible, la membrane plasmique dans la plupart des cas. Adapté de Peschel et Sahl, 2006.

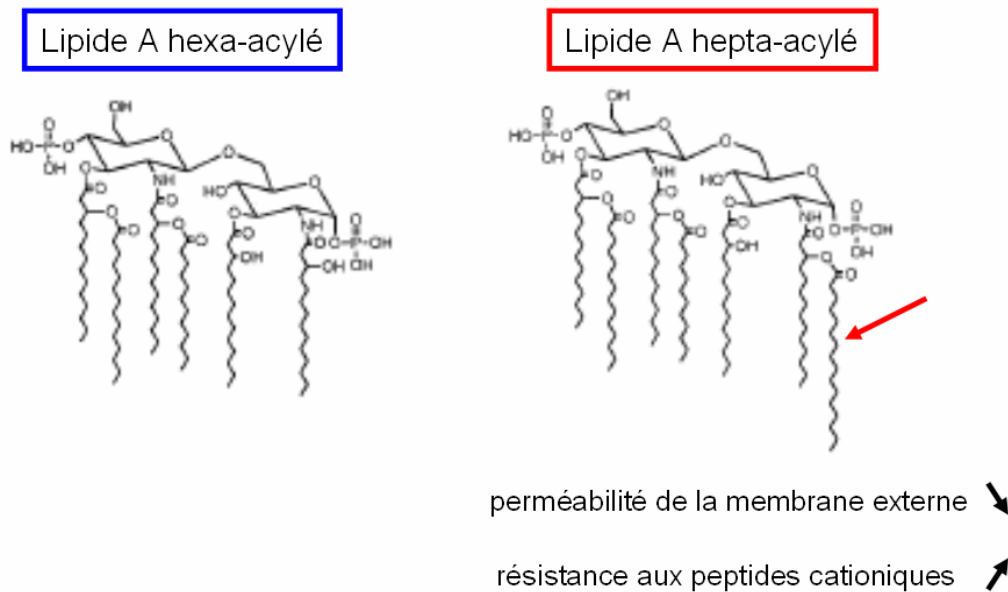


Fig.44 : Modification de la perméabilité membranaire par acylation du lipide A chez les bactéries à Gram négatifs. Adapté de Guo *et al*, 1998.

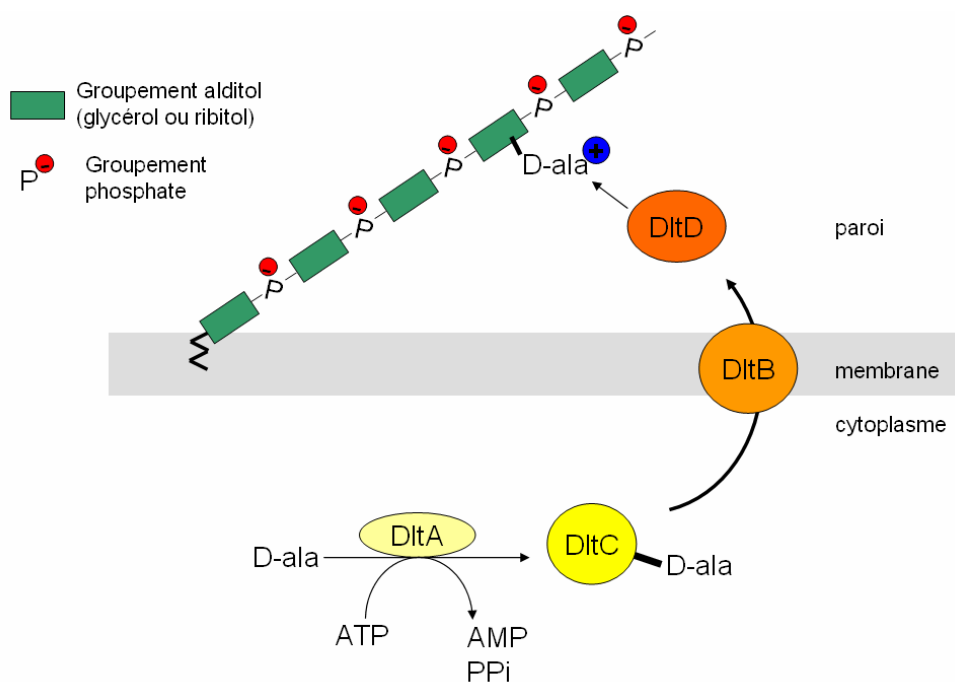


Fig.45 : D-alanylation des acides lipotéichoïques (ou téichoïques) et modification de la perméabilité de la paroi chez les bactéries à Gram positif. La voie de D-alanylation des acides lipotéichoïques fait intervenir 4 protéines codées par l'opéron *dlt* trouvé dans les génomes de toutes les bactéries du groupe des Firmicutes . DltA, D-alanine-DltC ligase ; DltB, protéine de sécrétion du complexe DltC-D-alanine ; DltC, protéine « carrier » du résidu D-alanine ; DltD, D-alanine transférase. Adapté de Peschel *et al*, 1999.



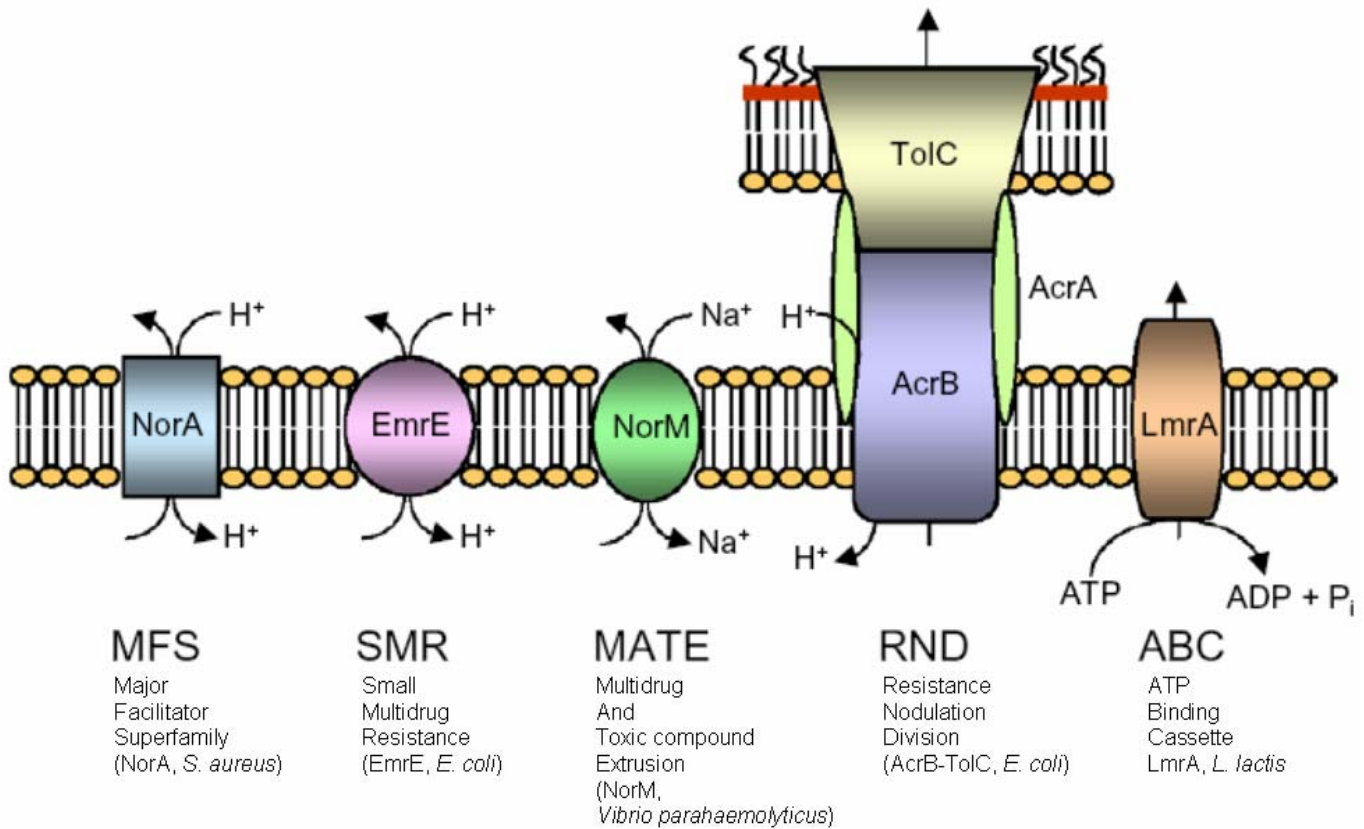


Fig.46 : Diversité des mécanismes d'efflux bactériens impliqués dans des résistances aux drogues et antibiotiques. Adapté de Kumar, A. et Schweizer, H.P. 2005.

Bactéries	Transporteurs ABC	Antibiotiques	Références
<i>Lactococcus lactis</i>	NisT	nisine	Ra <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus ATCC6633</i>	SpaT	subtiline	Klein et Entian, 1994
<i>Bacillus sp. HIL Y-85</i>	MrsT	mersacidine	Altena <i>et al.</i> , 2000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	PlnG	plantaricine	Diep <i>et al.</i> , 1996
<i>Carnobacterium piscicola</i>	CbnT	carnobacteriocine B2	Kleerebezem <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactobacillus sakei</i>	SapT	sakacine A	Axelsson et Holck, 1995
<i>L. sakei</i>	SppT	sakacine	Huhne <i>et al.</i> , 1996
<i>L. lactis</i>	NisFEG	nisine	Ra <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus ATCC6633</i>	SpaFEG	subtiline	Klein et Entian, 1994
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	EpiFEG	épidermine	Peschel et Götz, 1996
<i>Bacillus sp. HIL Y-85</i>	MrsFEG	mersacidine	Altena <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus licheniformis</i>	BcrAB	bacitracine	Neumüller <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus salivarius</i>	SalTX	salivaricine A	Upton <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SalTX	salivaricine A	Upton <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus mutans</i>	MbrAB	bacitracine	Tsuda <i>et al.</i> , 2002
<i>Staphylococcus aureus</i>	VraDE, VraFG	vancomycine	Kuroda <i>et al.</i> , 2000
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	YO1826	protamine	Nogales <i>et al.</i> , 2006

Tableau 1 : Transporteurs de type ABC impliqués dans des résistances aux antibiotiques. Remplissage jaune, transporteurs impliqués dans la sécrétion d'antibiotiques suite à leurs productions ; remplissage bleu, transporteurs impliqués dans des systèmes d'immunités aux antibiotiques ; remplissage vert, autres transporteurs impliqués dans des résistances. Cadre pointillé jaune, transporteurs ABC de la sous-famille 6 ; cadre pointillé bleu, transporteurs de la sous-famille 7 ; cadre pointillé vert, transporteurs de la sous-famille 9. Seul le transporteur YO1826 de *S. meliloti* est un importeur. Tous les autres sont prédits comme étant des exporteurs.

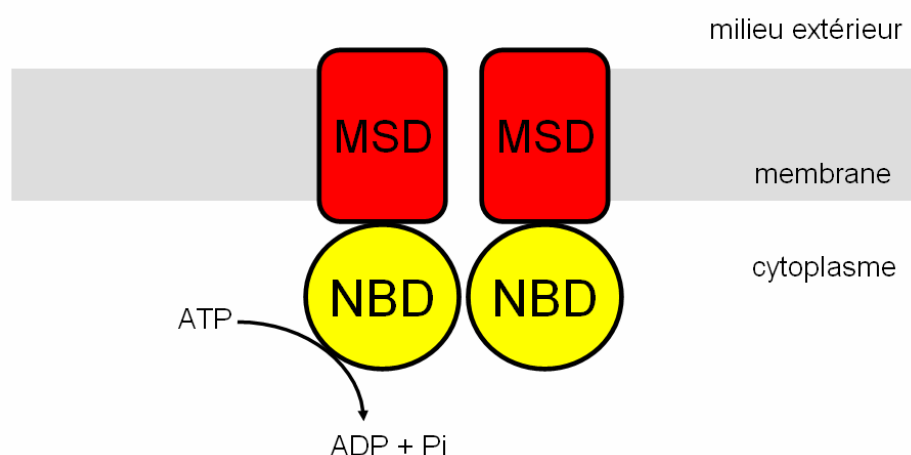


Fig.47 : Prototype d'un transporteur ABC. Le prototype d'un transporteur ABC contient d'une part, deux domaines hydrophobes membranaires nommés MSD pour Membrane Spanning Domain et qui forment la perméase membranaire, et, d'autre part, deux domaines hydrophiles nommés NBD pour Nucleotide Binding Domain et qui hydrolysent l'ATP pour énergiser le transport.

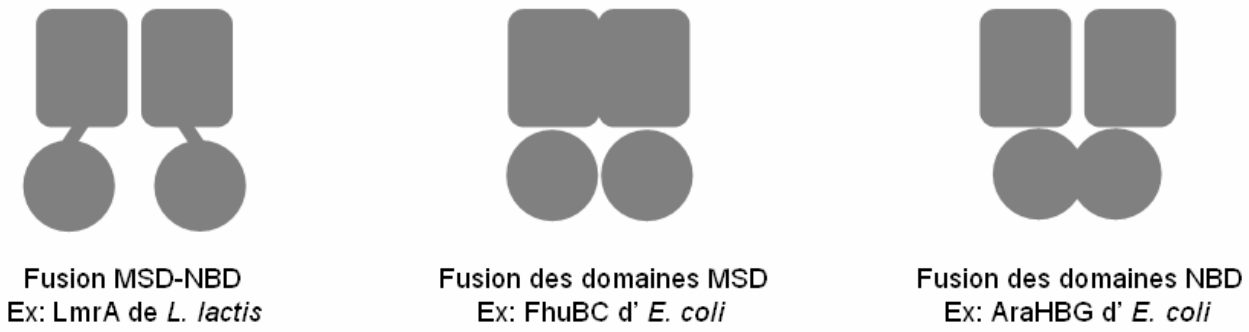


Fig.48 : Diversité des transporteurs ABC bactériens. La plupart des transporteurs ABC sont constitués de 4 domaines séparés (comme présenté dans le prototype). Cependant on trouve chez les bactéries des transporteurs dans lesquels deux domaines sont fusionnés dans une même chaîne peptidique.

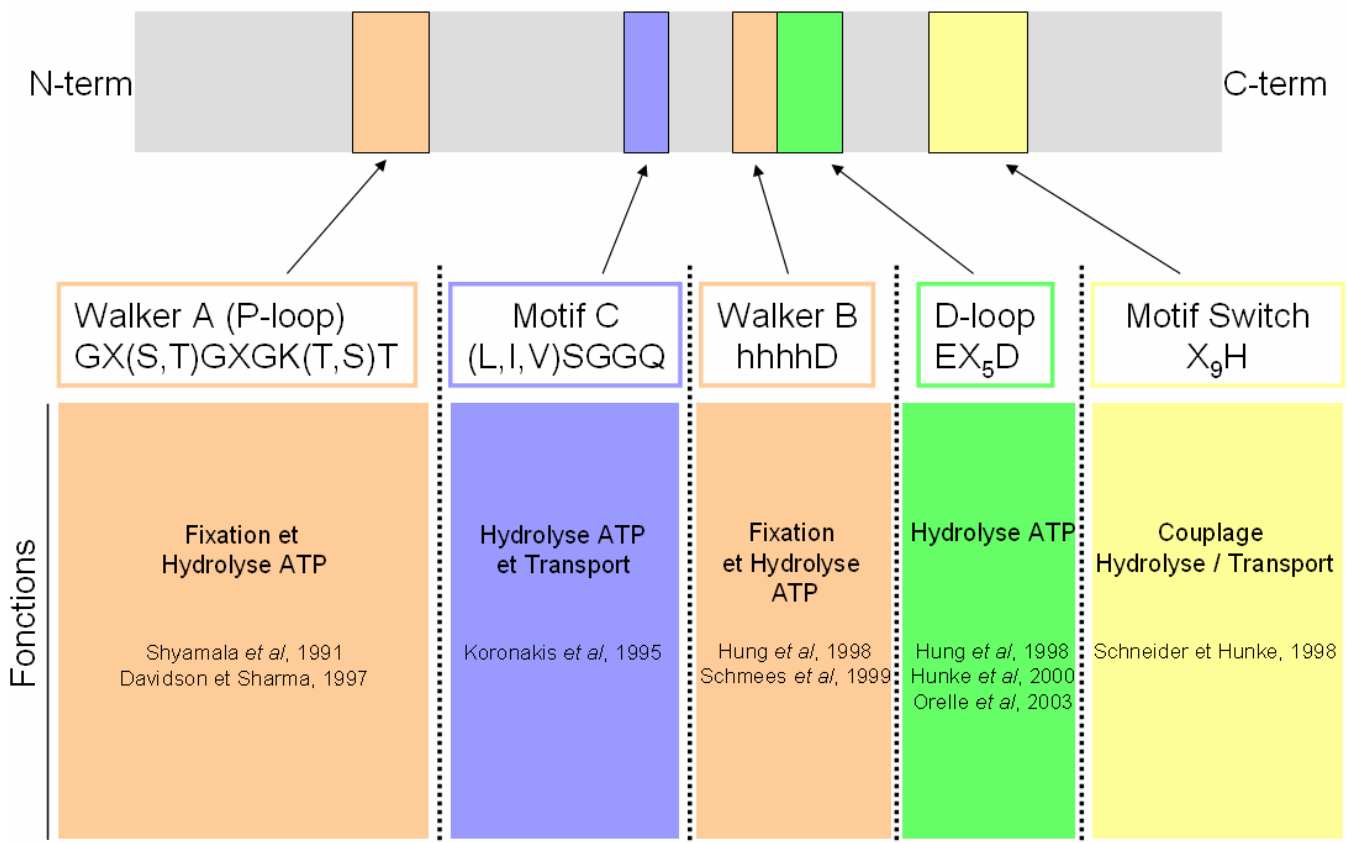


Fig.49 : Motifs conservés dans les séquences protéiques des domaines NBD. Les régions conservées sont représentées par des rectangles et leur fonction respective est indiquée. X, résidu aminoacide quelconque ; h, résidu aminoacide hydrophobe.

```

VraD_Sa      --MPILNVNHLKSVYG--SKQ-KYKALHDINFSVDKGEFVAIMGPSGSGKTTLLNVISSI
BceA_Bs      --MVILEANKIRKSYG--NKLNKQEVVLKGDIDHIEKGEFVSI MGASGSGKTTLLNVLSSI
YvcR_Bs      --MNVLQTTNLSKTYYSNKGITISYQALSADFDSVSKGEFVGI MGPSGSGKTTLLNLLATI
YxdL_Bs      --MANMLEVKHINKTY---KGQVSYQALQKISFSIEEGEFTAVMGPSGSGKTTLLNIISTI
MbrA_B1      ---MFLEINHLEKVFRTFRFSKEETHALQDQVDFKVDKGEFIAIMGESGSGKTTLLNILATL
ZPO0233752_Lm --METNLELQDITYQYD---SGNKAQIVLRNLSYTFSEGTFTYITLGPAGKTTLLSIAAGI
MalK_Ec      ---MASVQLQNVTKAWG---EVV-----VSKDINLDIHEGEFVVVFGPSGCGKSTLLRMIAGL
GlnQ_Sag     MAELKIDVQDLHKSYG---QNE-----VLKGDIAKFFYEGDVVCCIIGPSGSGKSTFLRRTLNL
PsaB_Sp      ---MIRIENLSVSYK-----ETLALKDISLVLHGPTITGIIIGPNGAGKSTLLKGMGLGI
MrsF_Bs      MNDQIVVTHDLTKKYYK-----KHTSVDGLNLRIRRGEIYGFLGPNAGKTTTTIRMLLGL
                :  . :  :  . . . . . : * . * * * :  :

VraD_Sa      DSISGGTVEVSGNEINQLKDKQLAQFRKKELGFIFQDYSVLP LTVKENIMLP--LSVQKV
BceA_Bs      DQVSHGTIHINGNDMTAMKEKQLAEFRKQHLGFIFQDYNLLD LTVKENIILLP--LSITKL
YvcR_Bs      DKPTQGENMINGIQPKTLKQELALFRRELG FVFQDFNLLD LTVKENIILLP--LALDKV
YxdL_Bs      DRPDSGDILINGENPHRLKRTKLAHFRKQLGFVFQDFNLLD LTVKENIILLP--LTLEKE
MbrA_B1      EKPTNGAVILNGQDITKIKENNLAKFRKLNLFVVFQDFNLLD LTVSVKDNIFLP--LVLARK
ZPO0233752_Lm DKPTSGKLIINKVNLN---ETMSLQSYRKSLSIIIFQAYNL IPYMTAVQNVYTA--MGIQHS
MalK_Ec      ETITSGDLFIG----EKRMNDTPPAERG---VGHVVFQSYALYPHLSVAENMSFG--LKPAGA
GlnQ_Sag     ESITSGKVVVDGFELSNPKTDIDKAREN--IGHVVFQHFNLFP HMSVLENITFAPIELGKE
PsaB_Sp      IPHQMQAFLDDKEVKKSLHRIAYVEQKIN----IDYNFP IKVKECVSLGLFSP--IPLFRS
MrsF_Bs      IKPTKGNIEIFG---QNLNKNRLQILQR--IGSLVESPTYYGNL TGYENLEAV----RR
                .  .  :  .  :

VraD_Sa      SKDEMEQNYKEVTEALGIYELSDKY-PSEISGGQQORTAAARAFVHKPAIIFADEPTGAL
BceA_Bs      SKKEANRKFEEVAKELGIYELRDKY-PNEISGGQKRTSAGRAF IHDPSIIFADEPTGAL
YvcR_Bs      KLREHEARLDELADTLQIKHILDHR-TYEVSGGQQRAACARAI IHNPALILADEPTGNL
YxdL_Bs      APSVMEKHLHGIAAKLGIENLLNKR-TFEVSGGQRQRAAIARAVI HKPSSLILADEPTGNL
MbrA_B1      DYKEMEKLHLYRLAPKLRIQNLLEKR-PFELSGGQKQRVAIARSLITNPQILLADEPTAAL
ZPO0233752_Lm QHKDKRKRAIELLKEVGLTDKQINSPVLKLSGGQQQRVTIARALSGNAPFIFADEPTGNL
MalK_Ec      KKEVINQRVNVQAEVLQLAHLDDRK-PKALSGGQRQRVAIGR TLVAEPSVFLLEEPLSNL
GlnQ_Sag     SKEAAAEKHGMELLEKVGADKANAK-PDLSGGQKQRVAIARSLAMNPDILLFDEPTSAL
PsaB_Sp      LKAKHWKVKQEALEIVGLADYAERQ-ISQLSGGQFQRVLIARCLVQEA DYILLDEPFAGI
MrsF_Bs      LRGLPEQQVNEVLETVRLSKVANRL-TKEYSLGHKQRLGIAVALLSSPDLLILDEPTNGL
                .  .  :  .  : * * * * . . . . : : * * * :

VraD_Sa      DSKSAQDLLNRLLEDMNERFNSTIIMVTHDPSAASFQRV IHLKDGNIHSEIHQE-----
BceA_Bs      DSKSASDLLNKLSQLNQKRNATIIMVTHDPVAASYCGRVIF IKDGQMYTQLNKG-----
YvcR_Bs      DSKSAKQVMNTLAQLNEEKATILLVTHDATAASFCKRIVF IKDGRFFSEIHR-----
YxdL_Bs      DSKATKDVMTLQSLNRDDHVTALMVTHDPVSAASYCRRVIF IKDVVLFNEIYR-----
MbrA_B1      DYRNSEDLNLFEAINND-DQITILMVTHSANAASHAKRVLF IKDGRIFHQLYRG-----
ZPO0233752_Lm DHETSEHIIDLFRDLAHHKNKCVVMVTHDNHVASRSDV ILLNKGKTLI-----
MalK_Ec      DAALRVQMRIEISRLHKRLGRTMIYVTHDQVEANTLADK IIVVLDAGRVAQVGKPLAVPLS
GlnQ_Sag     DPEH-VGDVNLNVHKDLAEQGMTHLIVTHEMGFARQVANRV IFTDGGRFLEDGT-----
PsaB_Sp      DSVSEEIIMNTLRDLKKA-GKTVLIVHHDLSKIPHYFDQV LLVNREVIAGFPT-----
MrsF_Bs      DPSGQIEIRELIKELPKS-GMSVIVSSHLLSEIDQMATQVGI INNGKMFQDSIAS----
                .  .  :  .  :

```

Fig.50 : Exemples d'alignements de séquences primaires de quelques domaines NBD de transporteur ABC avec le logiciel ClustalW. Sa, *S. aureus* ; Bs, *B. subtilis* ; Bl, *B. licheniformis* ; Lm, *L. monocytogenes* ; Ec, *E. coli* ; Sag, *Streptococcus agalactiae* ; Sp, *S. pneumoniae*.

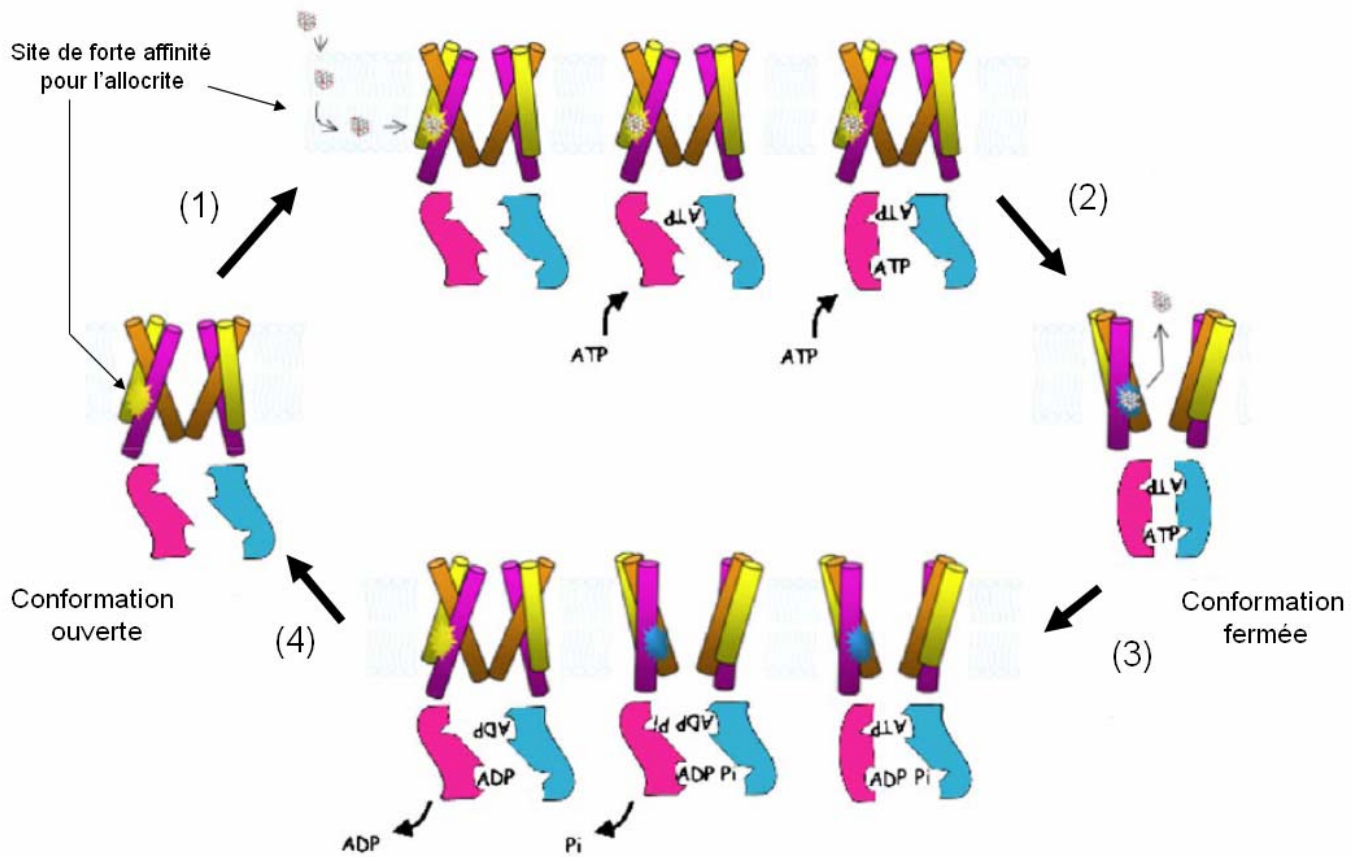


Fig.51 : Modèle « Switch-ATP » de fonctionnement d'une pompe d'efflux. Les domaines MSD sont représentés par des cylindres, les domaines NBD sont en bleu et rose. Le transporteur dans sa conformation initiale est représenté à gauche : les domaines NBD forment un dimère ouvert et ne sont pas liés à l'ATP. (1) le mécanisme est activé par la liaison de l'allocrite sur le site de forte affinité du domaine MSD (étoile jaune). Cela envoie un signal aux domaines NBD (communication aller) qui fixent l'ATP et forment un dimère fermé. (2) Les changements conformationnels impliqués dans la formation de ce dimère fermé sont transmis aux domaines MSD (communication retour) qui subissent à leur tour un changement de conformation. Le site de liaison de l'allocrite perd son affinité et l'allocrite est relâché dans le milieu extérieur. (3) Hydrolyse de l'ATP et état intermédiaire du transporteur, puis (4) relâchement de l'ADP et du Pi qui permettent au transporteur de retrouver son état initial. Le site de liaison de l'allocrite retrouve sa forte affinité. D'après Linton et Higgins, 2006.

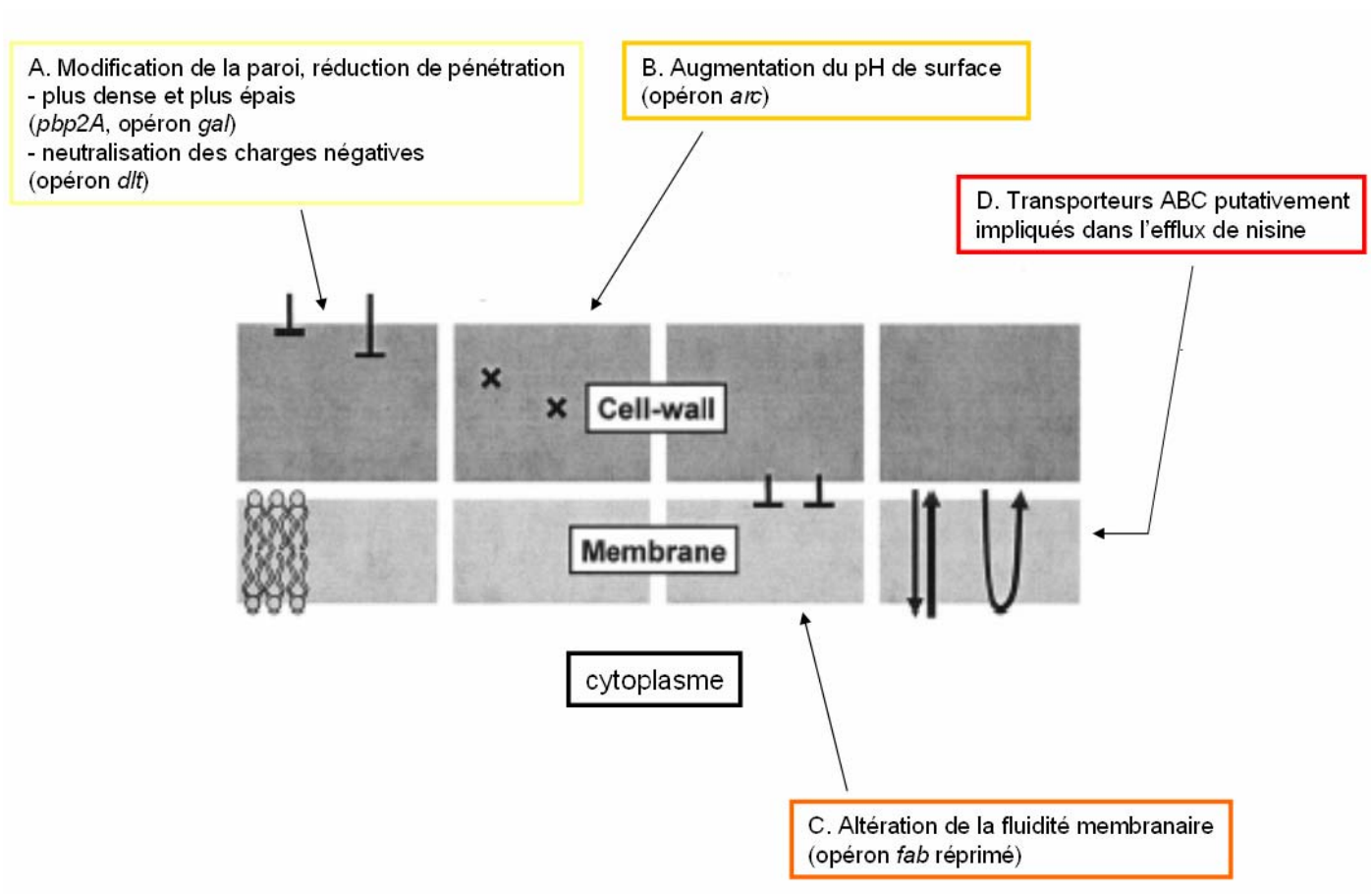
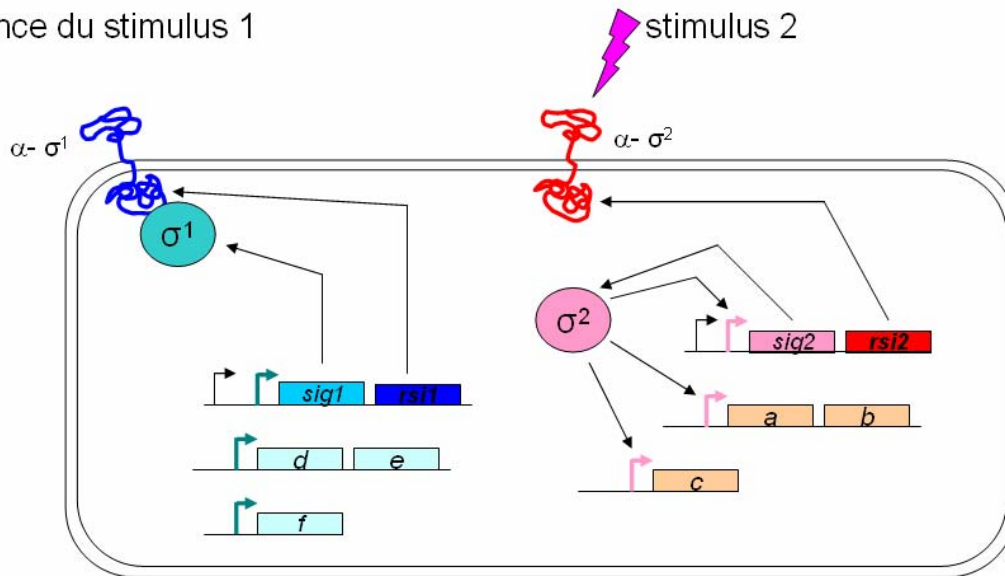


Fig.52 : Bilan des mécanismes mis en place par *L. lactis* en réponse à la nisine.  
 D'après Kramer *et al*, 2006.

absence du stimulus 1



↗ Promoteurs cibles de  $\sigma^1$  ( $p_{\sigma^1}$ )

↗ Promoteurs cibles de  $\sigma^2$  ( $p_{\sigma^2}$ )

Fig.53 : Mode d'action des facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ECF).

En absence de stimulus l'ECF  $\sigma^1$  est recruté à la membrane en interagissant avec son anti-sigma et est inactif. En présence d'un stimulus ressenti par l'anti-sigma, l'ECF  $\sigma^2$  est relâché et permet de recruter l'ARN polymérase au niveau de ses promoteurs cibles.

*sig*, gène de structure du facteur sigma ; *rsi*, gène de structure de l'anti-sigma. a, b et c, gènes cibles du facteur  $\sigma^2$  ; d, e et f, gènes cibles du facteur  $\sigma^1$ .

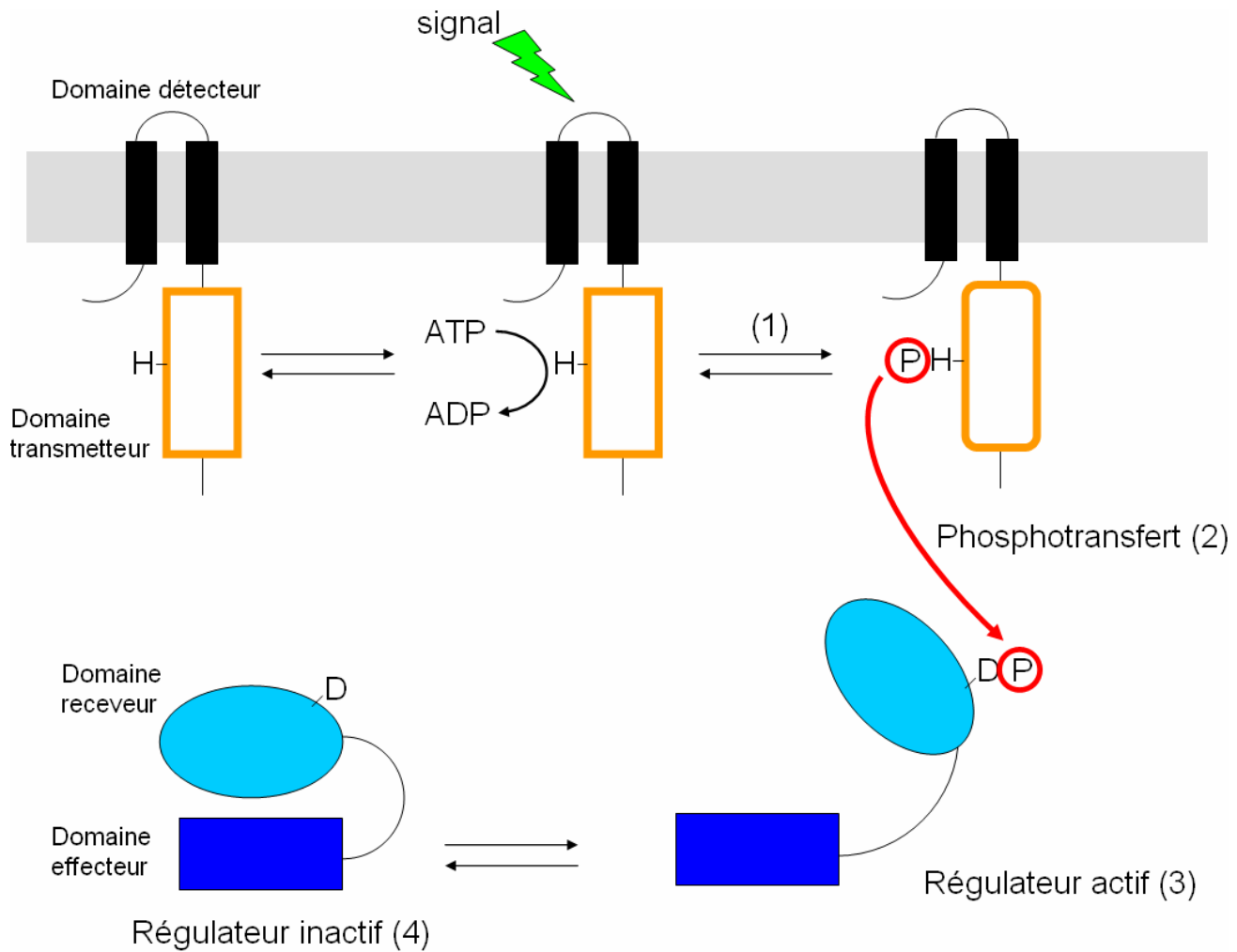


Fig.54 : Représentation Schématique de la transmission du signal par les phosphorelais classiques. H, résidu histidine conservé du senseur ; D, résidu aspartate conservé du régulateur de réponse ; (1) autophosphorylation du domaine transmetteur du senseur sur le résidu histidine en réponse à un stimulus ; (2) transfert du phosphate sur le résidu aspartate du domaine receveur du régulateur ; (3) régulateur de réponse dans sa conformation active, pouvant contrôler l'expression de gènes cibles ; (4) régulateur dans sa conformation inactive, pouvant être obtenue par déphosphorylation du domaine receveur.



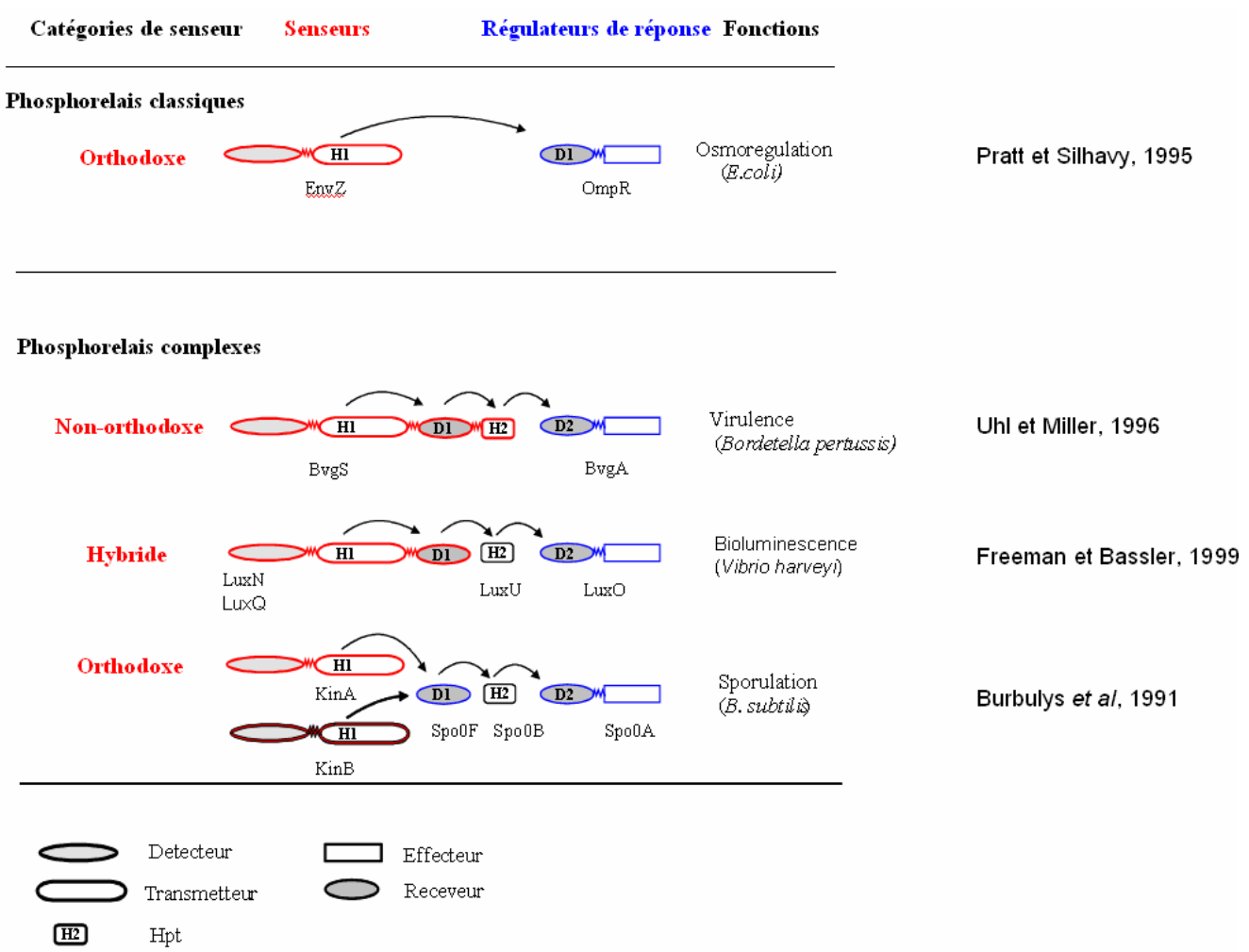



Fig.55 : Organisation des modules au sein des phosphorelais classiques et complexes.

Organismes	Senseurs (HK)	Régulateurs (RR)	Références
<i>E. coli</i>	29	32	Mizuno <i>et al</i> , 1997
<i>Helicobacter pylori</i>	4	7	Koretke <i>et al</i> , 2000
<i>P. aeruginosa</i>	63	64	Rodrigue <i>et al</i> , 2000
<i>B. subtilis</i>	37	34	Fabret <i>et al</i> , 1999
<i>L. lactis</i>	8	8	Bolotin <i>et al</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i>	13	13	Throup <i>et al</i> , 2000
<i>M. tuberculosis</i>	13	12	Koretke <i>et al</i> , 2000
<i>Archaeoglobus fujidus</i>	14	11	Koretke <i>et al</i> , 2000
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1	2	Koretke <i>et al</i> , 2000
<i>S. cerevisiae</i>	1	2	Cherry <i>et al</i> , 1998
<i>Candida albicans</i>	3	1	Thomason et Kay, 2000

 Gram négatif

 Archaeobactéries

 Gram positif, Firmicutes

 Eucaryotes

Tableau 2 : Nombre de senseurs et de régulateurs de réponse dans différents organismes.

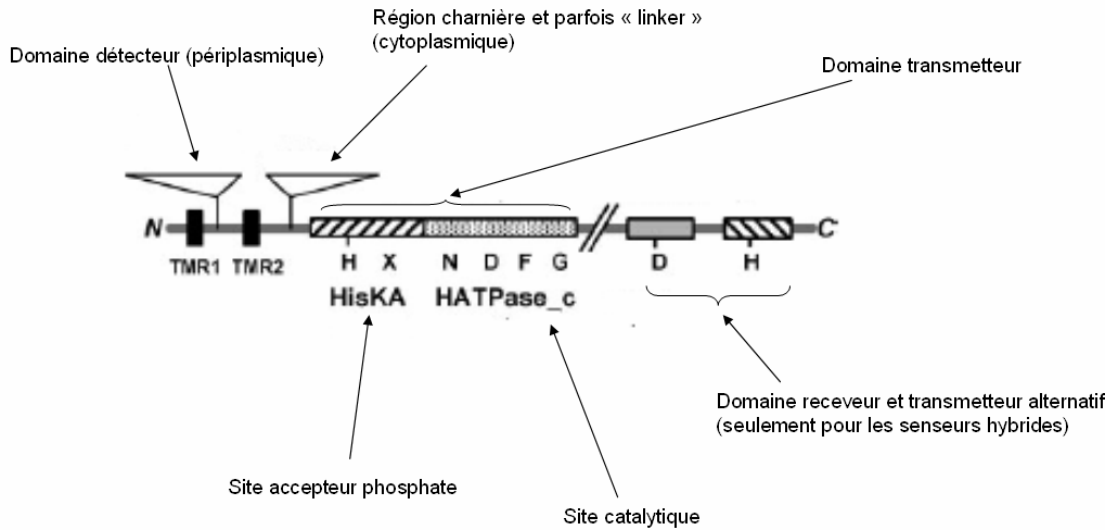


Fig.56 : Domaines et motifs conservés des senseurs. TMR, « Transmembrane Region »; H, résidu histidine conservé site de l'autophosphorylation; X, domaine de dimérisation du senseur; N, D, F et G, boîtes conservées du domaine catalytique du senseur; HisKA, site Histidine Kinase accepteur de phosphate; HATPase\_c, domaine catalytique hydrolysant l'ATP pour l'autophosphorylation. Adapté de Mascher *et al*, 2006.

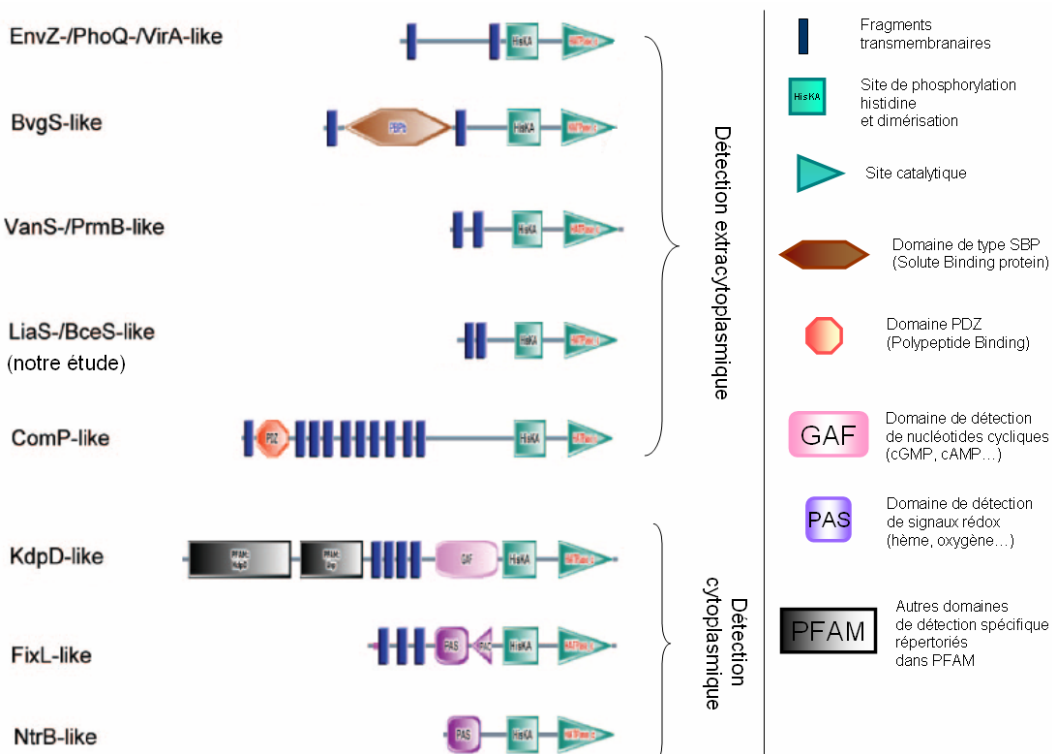


Fig.57 : Diversité des senseurs bactériens et des modes de détection. Adapté de Mascher *et al*, 2006. Le nombre de fragments transmembranaires est très divers, généralement entre deux et dix, ainsi que l'espacement de ces fragments transmembranaires, grand pour les senseurs de type EnvZ, très court pour les senseurs de type LiaS ou BceS. Divers domaines additionnels peuvent être présents et impliqués dans la détection du signal, ils sont représentés à droite de la figure.

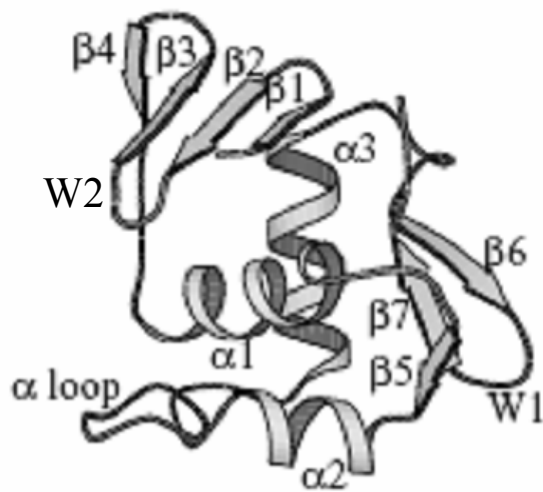


Fig.58 : Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN de OmpR.  
D'après Martinez-Hackert et Stock, 1997.

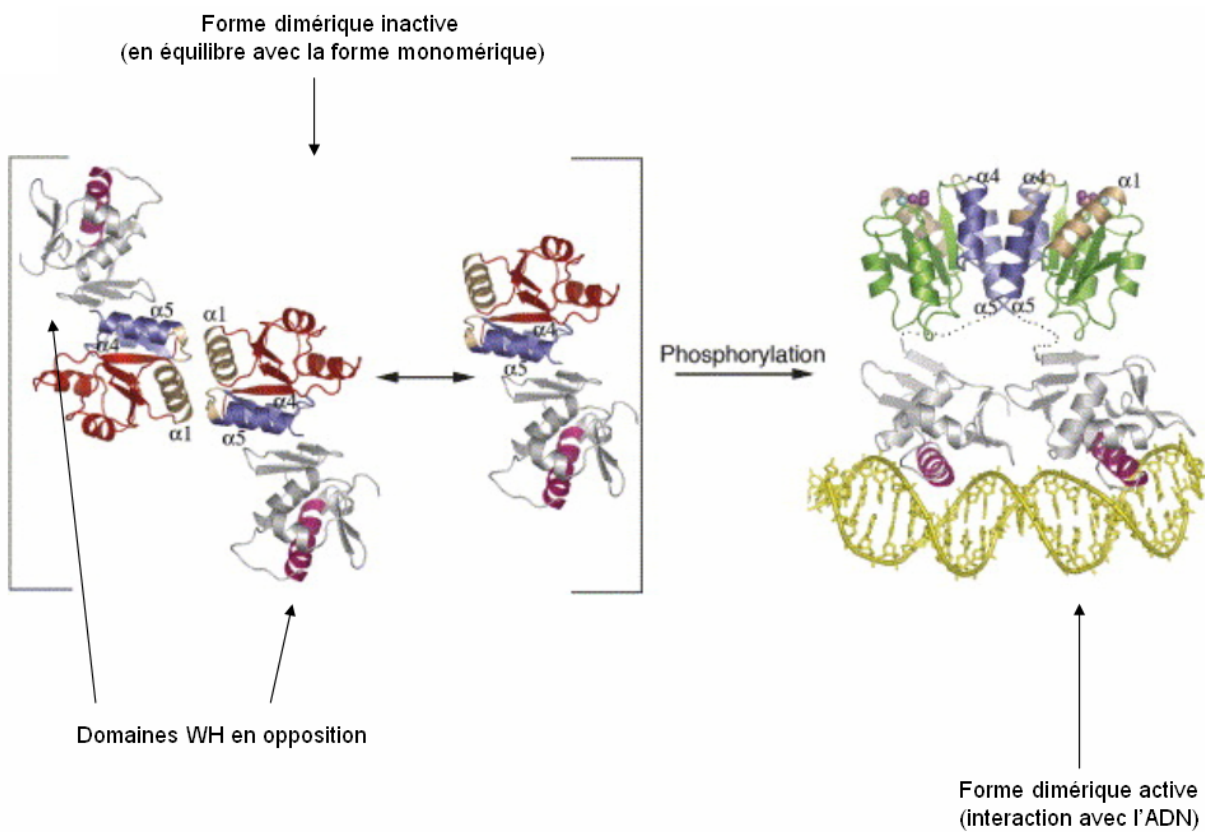


Fig.59 : Modèle structural d'activation des régulateurs de la famille OmpR.  
D'après Bachhawat *et al*, 2005.

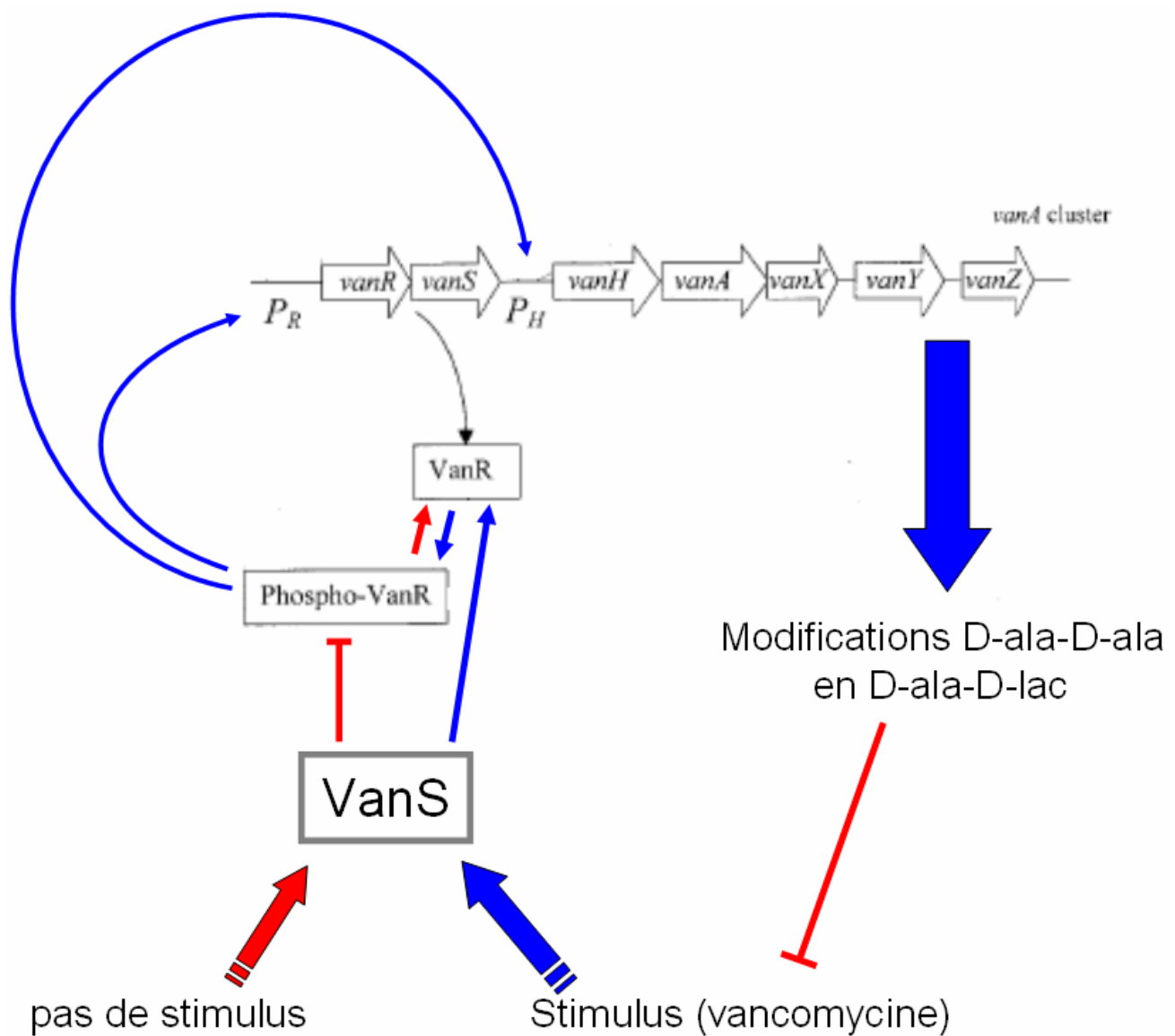


Fig.60 : Régulation des gènes de résistance aux glycopeptides chez les Entérocoques par le phosphorelais VanRS. *vanHAXYZ*, cluster de gènes de résistance ;  $P_R$ ,  $P_H$ , promoteurs cibles du phosphorelais. Adapté de Arthur et Quintiliani, 2001.

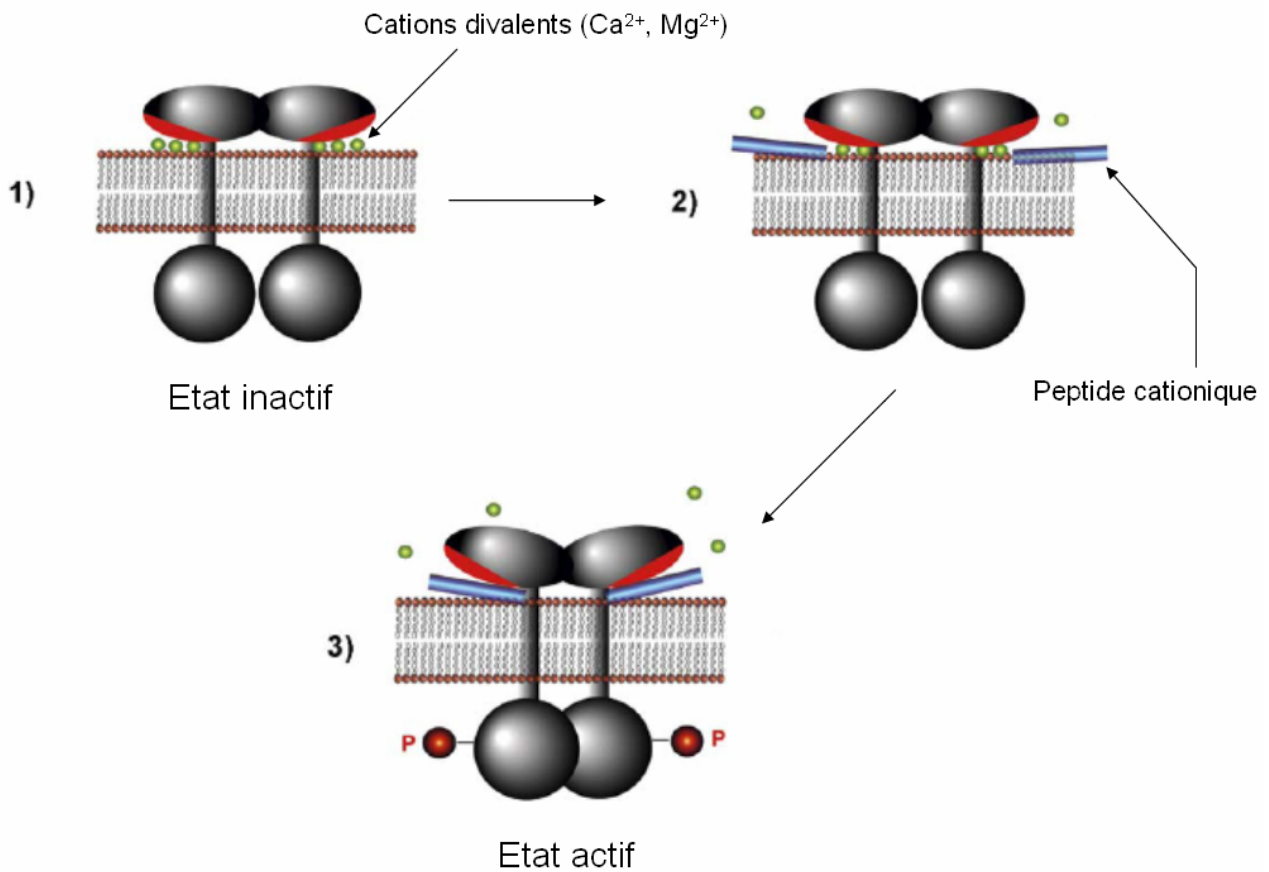


Fig.61 : Modèle d'activation du senseur PhoQ par les peptides cationiques antimicrobiens. 1) Etat inactif du senseur, les cations divalents interagissent avec la face acide (rouge) du senseur. 2) Déplacement des cations par un peptide cationique. 3) Etat activé du senseur en interaction avec les peptides cationiques. D'après Bader *et al*, 2005.

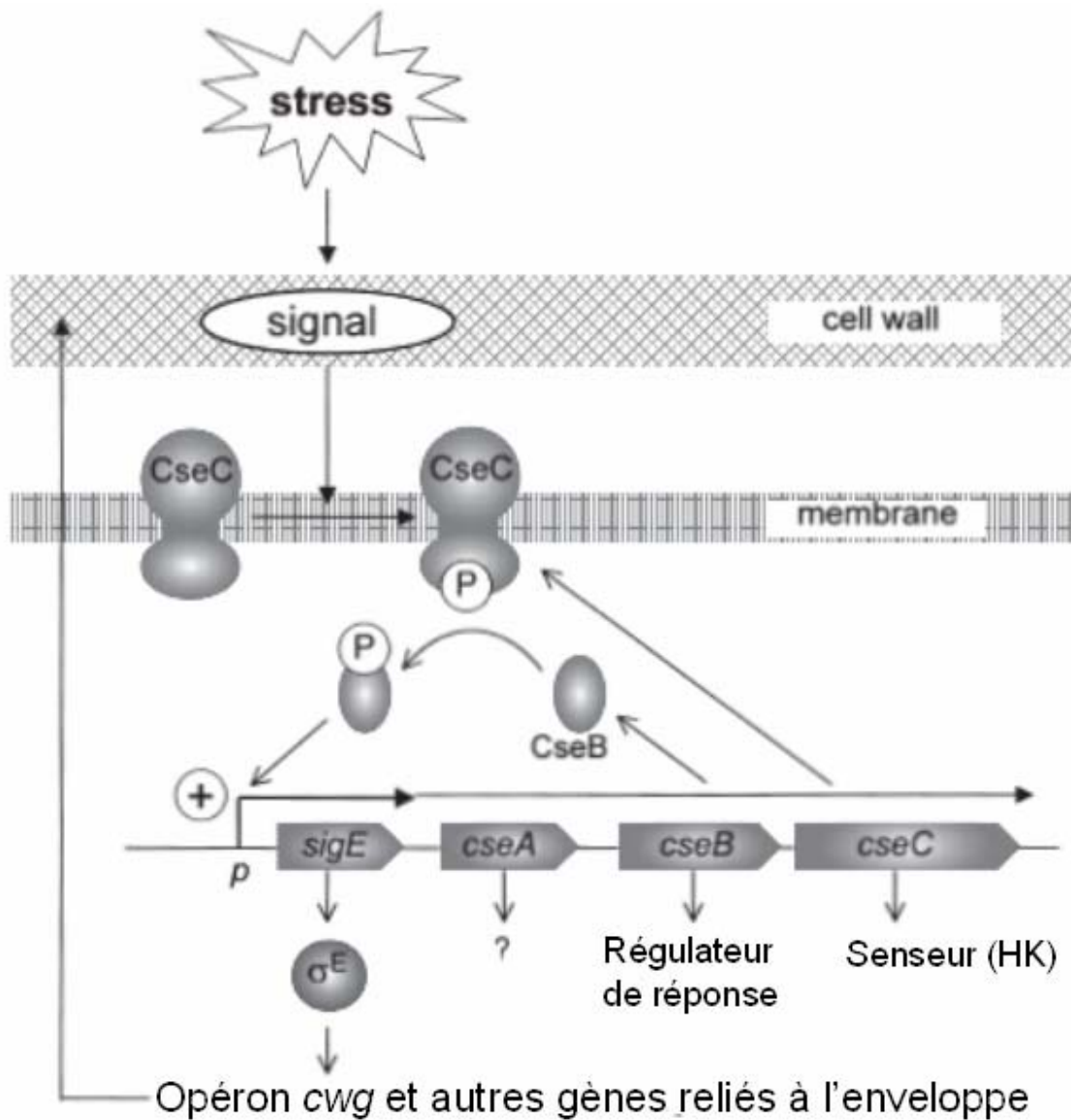


Fig.62 : Le système CseBC- $\sigma^E$  de *S. coelicolor*, un exemple de couplage entre un phosphorelais et un facteur sigma. Opéron *cwg*, Cell Wall Glycan. Adapté de Hong *et al*, 2002.

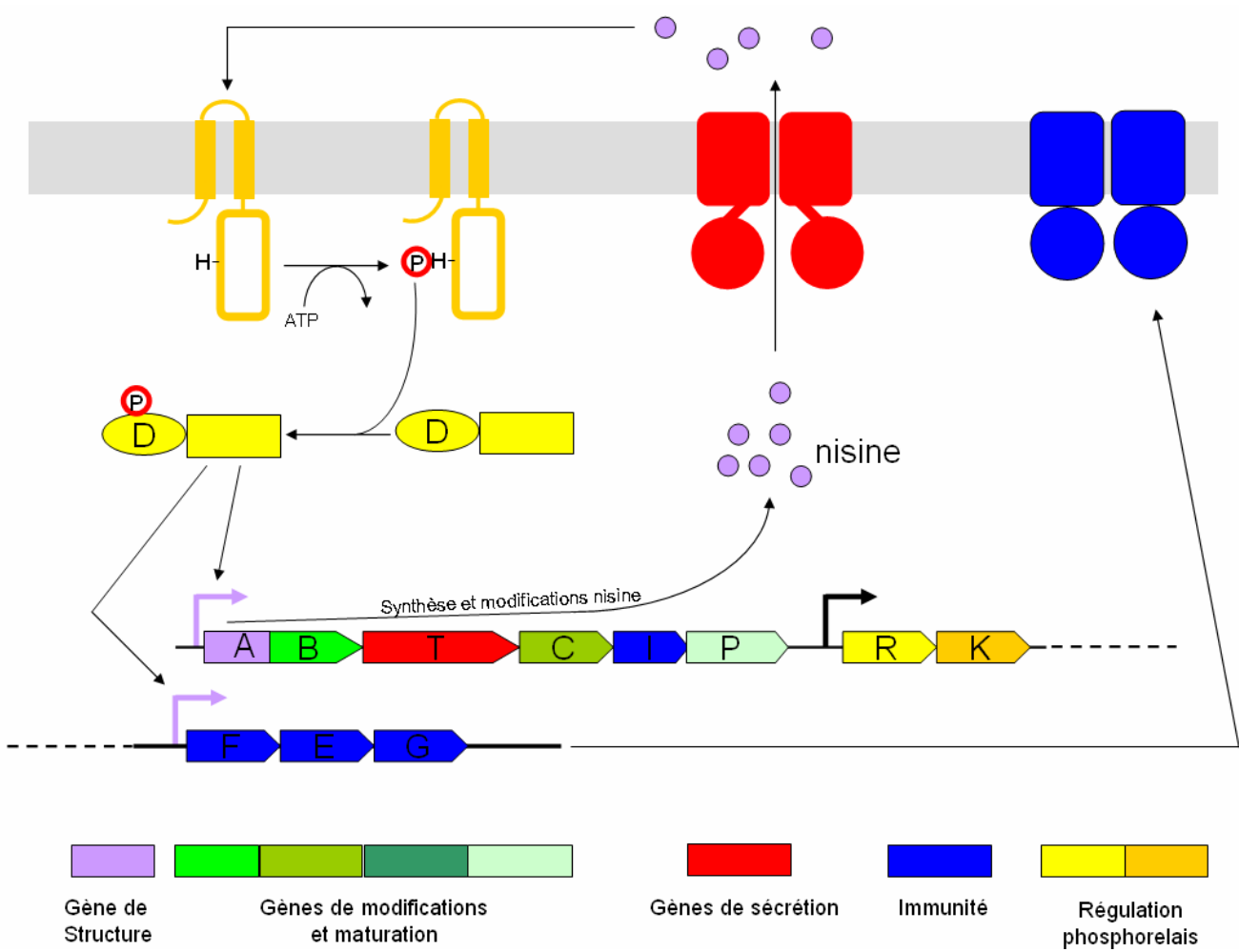


Fig.63 : Phosphorelais NisRK et Quorum-sensing régulant la synthèse de nisine et l'immunité à la nisine chez *L. lactis*. Adapté de Kleerebezem *et al*, 1997.



Promoteurs cibles du régulateur de réponse NisR.



Promoteur constitutif.



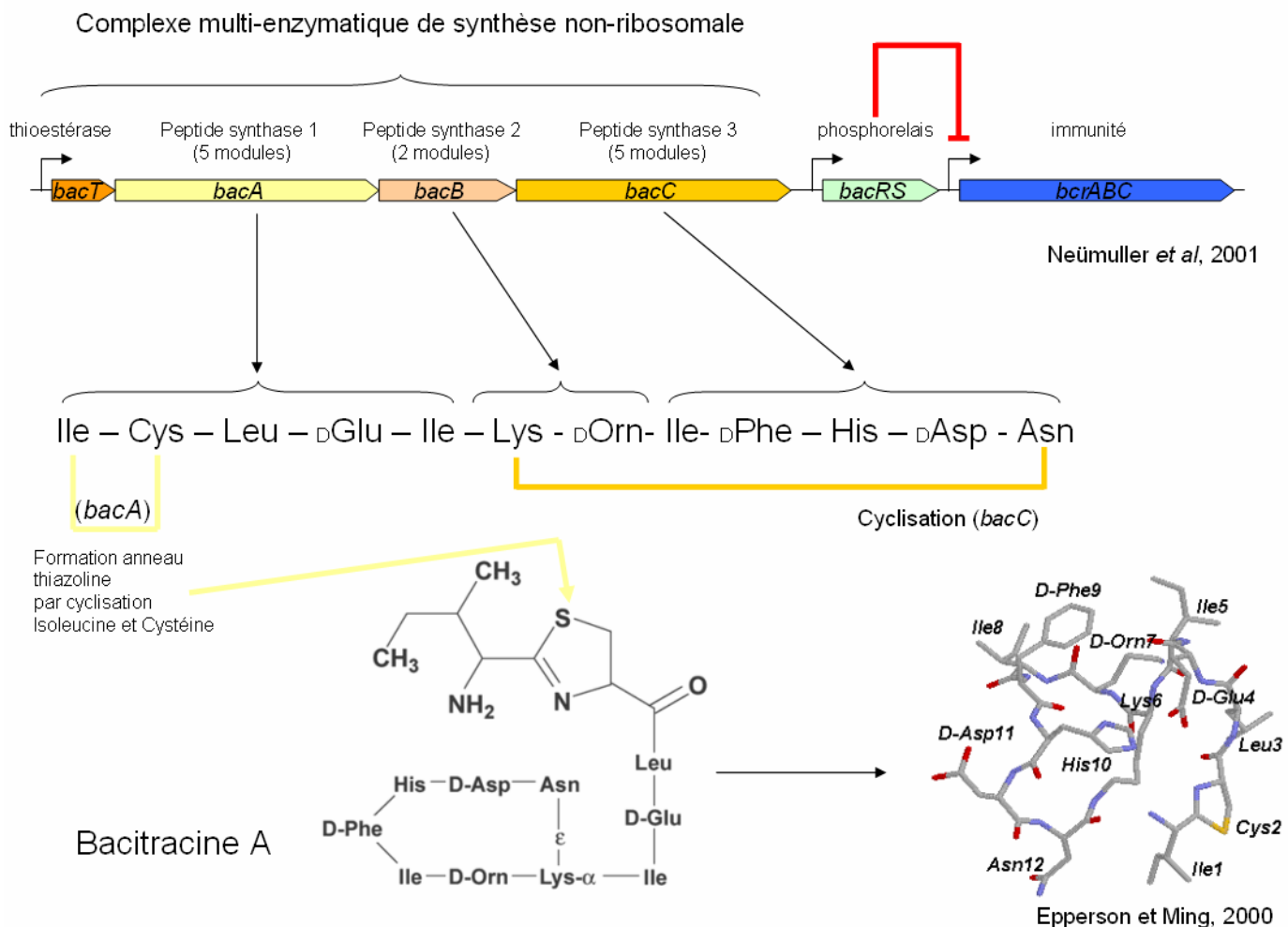
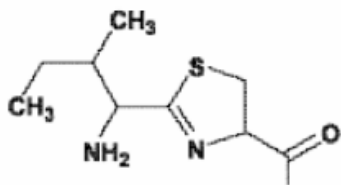
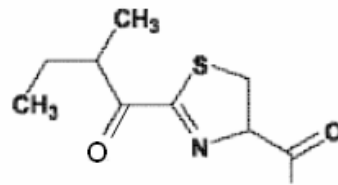


Fig.64 : Biosynthèse de la bacitracine chez *B. licheniformis*.

Les gènes de l'opéron de biosynthèse de la bacitracine sont nommés *bacT*, *bacA*, *bacB* et *bacC* et codent respectivement pour la thioestérase, qui permet les liaisons thioesters des résidus aminoacides à chaque module des peptides synthases, et 3 peptides synthases permettant l'assemblage de la chaîne polypeptidique (Neümuller *et al*, 2001 ; Eppelmann *et al*, 2001). La structure à branche cyclique de la forme active de la bacitracine est obtenue après formation de l'anneau thiazoline et cyclisation entre les résidus Lys6 et Asn12. La structure tridimensionnelle de la bacitracine A a été obtenue en RMN (Epperson et Ming, 2000). Les gènes impliqués dans l'immunité à la bacitracine sont représentés en bleu et sont régulés par un système phosphorelais (en vert) codé par les gènes *bacR* et *bacS* (Neümuller *et al*, 2001).



Anneau thiazoline aminé  
(bacitracine A)



Anneau kéto-thiazole  
(bacitracine F)

Fig.65 : Bacitracine A et bacitracine F. L'oxydation de l'anneau thiazoline de la bacitracine A conduit à la formation d'un anneau kéto-thiazole et à une forme inactive de l'antibiotique, la bacitracine F.

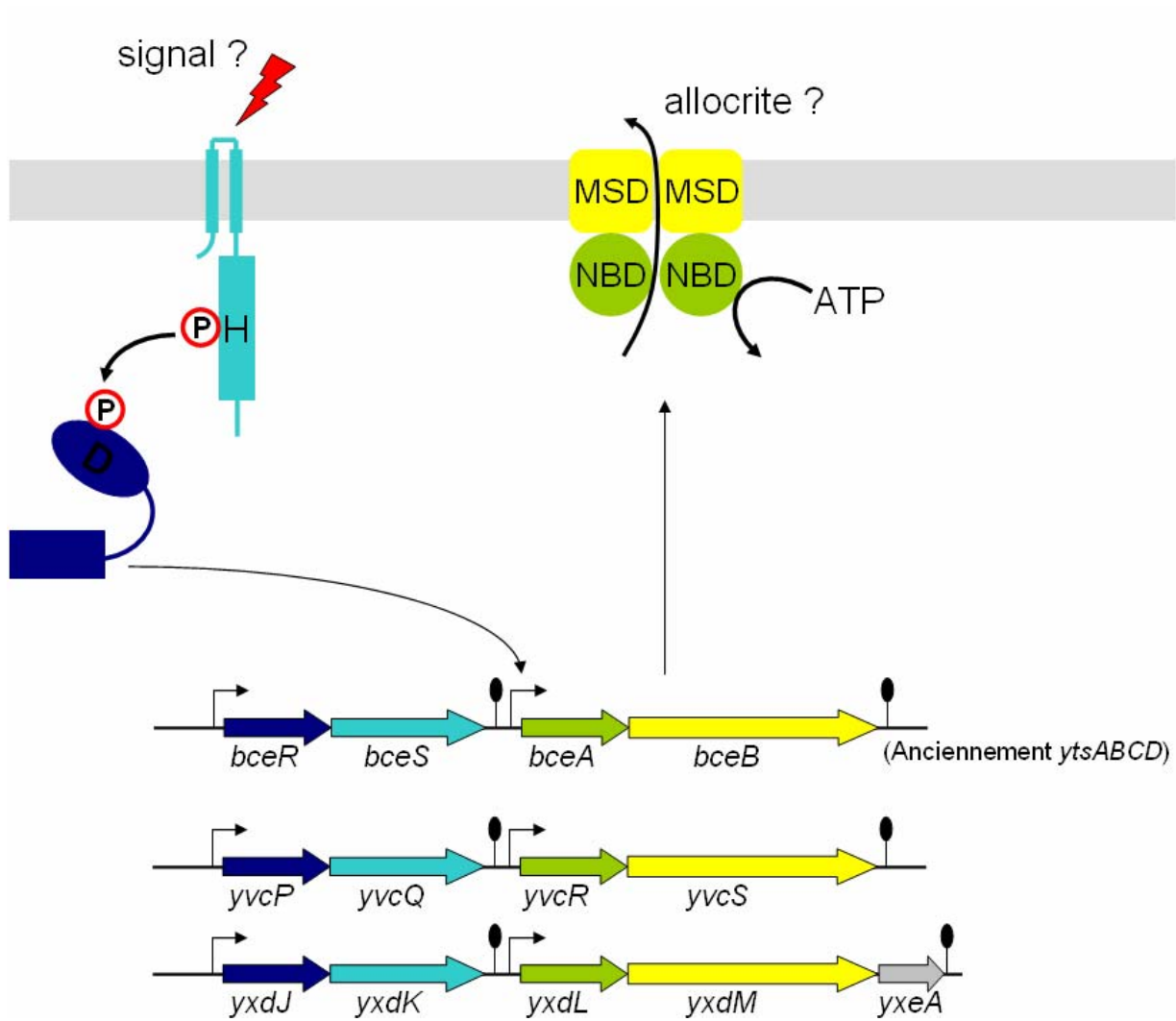


Fig.66 : Organisation des gènes des loci *bce*, *yvc* et *yxd*. Les flèches colorées indiquent le sens de transcription. ▸ promoteur putatif ; ● terminateurs p-indépendant putatifs.

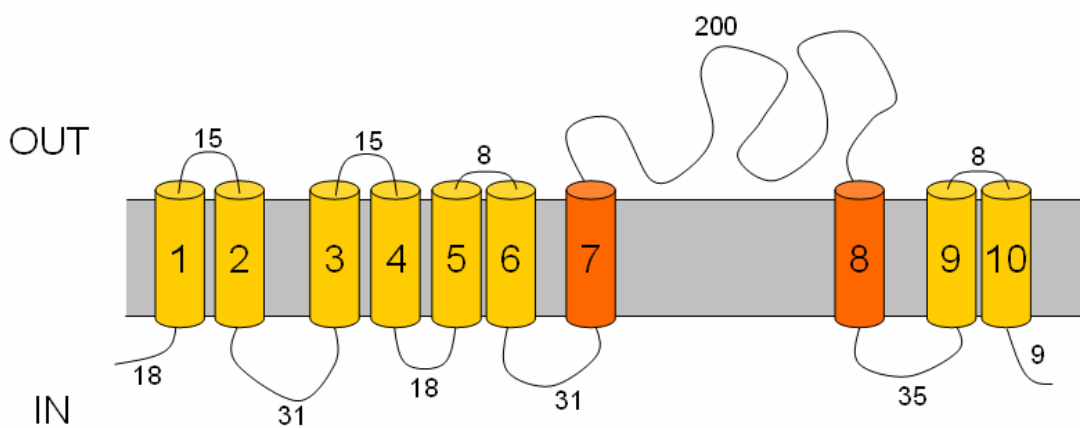


Fig.67 : Topologie prédite par le logiciel TMHMM des trois domaines MSD YvcS, YxdM et BceB ([www.cds.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cds.dtu.dk/services/TMHMM)). Les hélices transmembranaires sont numérotées et le nombre moyen de résidus trouvés dans les différentes boucles de la structure est indiqué.

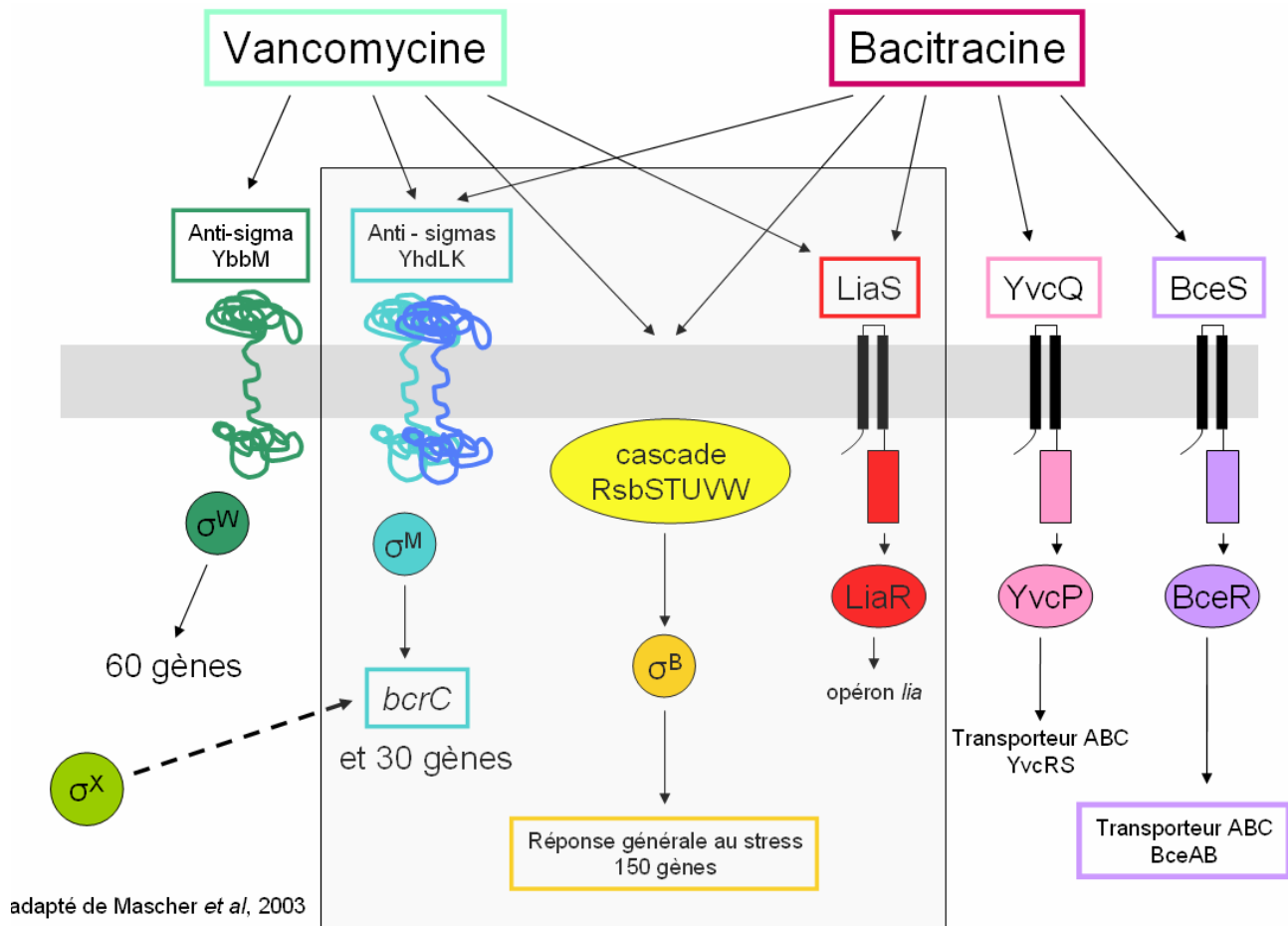


Fig.68 : Réponse cellulaire de *B. subtilis* à la vancomycine et la bacitracine (adapté de Mascher *et al*, 2003). Le cadre grisé représente les mécanismes activés par les deux antibiotiques. On retrouve dans le régulon bacitracine les deux systèmes de résistance que nous avons identifié à savoir la protéine BcrC, dont le gène est régulé par trois facteurs sigma, et le système BceRSAB. La régulation de *bcrC* par le facteur sigmaW n'étant que prédite, elle n'est pas précisée sur le schéma. On trouve également deux autres systèmes phosphorelais, et des gènes de réponse générale au stress, régulés par  $\sigma^B$ .

```

BcrC_B1      MSFSELNIDAFRFINDLGKEYSMLNPVVYFLAEYMMYFLALGLVVYWLTRTTKNRLMVIY
BcrC_Bs      -----MNYEIFKAIHGLSHHNSVLDSIMVFITEYAIVAYALILLAIWLFGNTQSRKHVLY
BcrC_Ec      -MLENLNLSLFLINATPDSAPWMISLAIFIAKDLITVPLLAVVLWLWGLTAQRQLVIK
              :* . * *: . . : .: *::: : . * :. ** * . * *:

BcrC_B1      AVIAFVVAEILGKIMGSLHSNYQPFATLPNVNKLIEHEIDNSFPSDHTILFFSIGFLIFL
BcrC_Bs      AGITGIAGLVINYLI TLVYFEPRPFVAHT-VHTLIPHAADASFPSDHTTGALAI SIAMLF
BcrC_Ec      IAIALAVSLFVSWTMGHLFPHDRPFVENI-GYNFLHHAADDSFPSDHGTVIFTFALAFLC
              *: . . : . : : ** . . : : * * ***** : : : : :

BcrC_B1      FHKK-TGWLWLVLAFAVGISRIWSGVHYPLDVAAGALLGVLSALFVFWTAPKLS-FIHQM
BcrC_Bs      RNRK-IGWPLVIFGLLTGFSRIWVGHHPVDVLGSLVVAIIIGFLFFRFSDLLRPFVDLV
BcrC_Ec      WHRLWSGSLLMVLAVVIAWSRVYLGVHUPLDMLGGLLAGMIGCLSAQIIWQAMGHKLYQR
              : : * : : : . : : : * * : : : : : : : : : : : :

BcrC_B1      LSLYEKVEQRIVPSKNKSNDKSKNF
BcrC_Bs      VRIYEAIINKLTKKP-----TDQNF
BcrC_Ec      LQSWYRVCFALPIRKG----WVRD-
              : : : : : : : :

```

Fig.69 : Alignements des séquences primaires de BcrC avec 2 de ses orthologues. Bl, *B. licheniformis*; Bs, *B. subtilis*, Ec, *E. coli*. Les boîtes colorées correspondent au motif consensus identifié par Stukey et Carman pour les phosphatases de la famille PAP<sub>2</sub>.

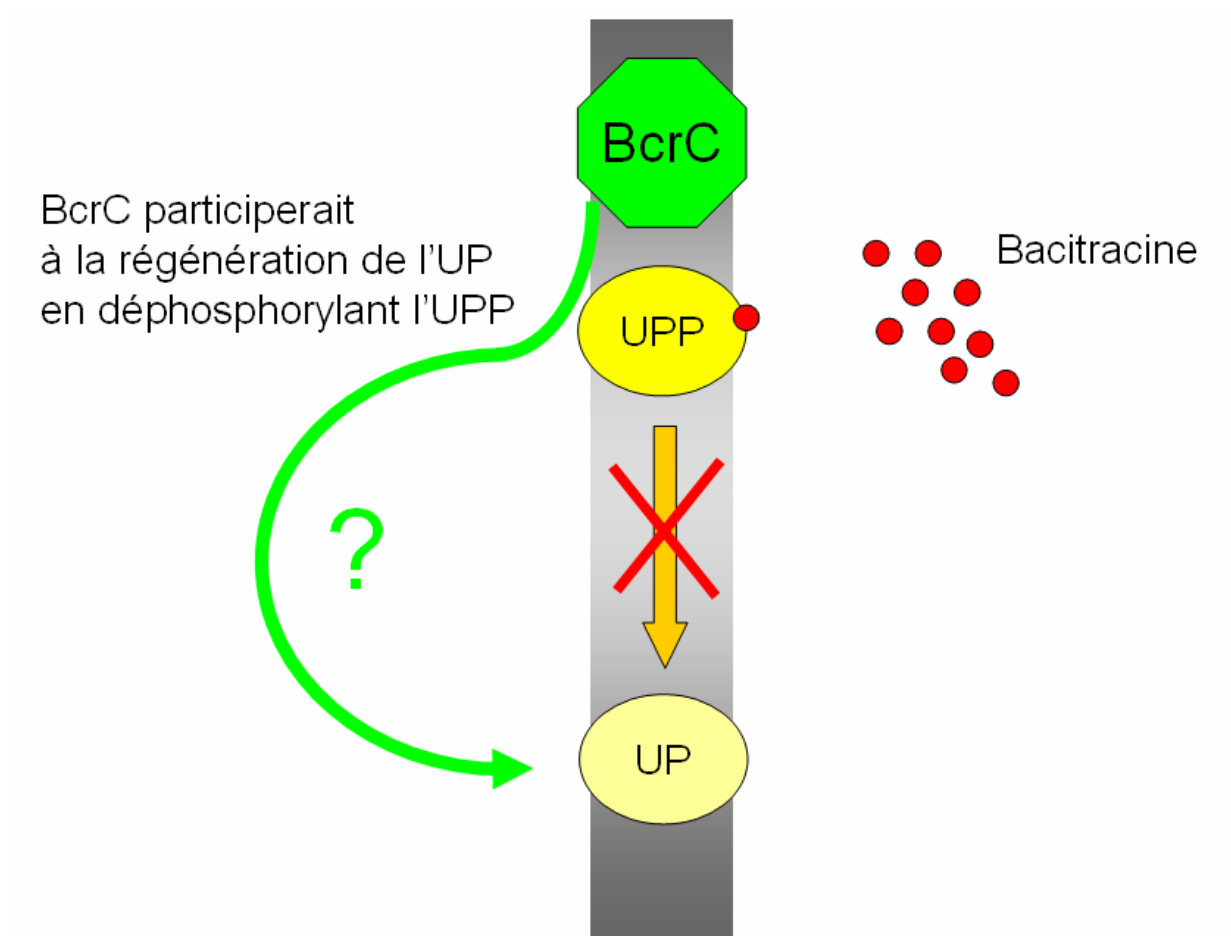


Fig.70 : Modèle d'étude de la protéine BcrC de *B. subtilis*. L'hypothèse est que BcrC est une phosphatase membranaire de type PAP<sub>2</sub> qui peut déphosphoryler la cible de la bacitracine, l'UPP, et participer à la régénération de l'UP, le translocateur lipidique des monomères de peptidoglycane.

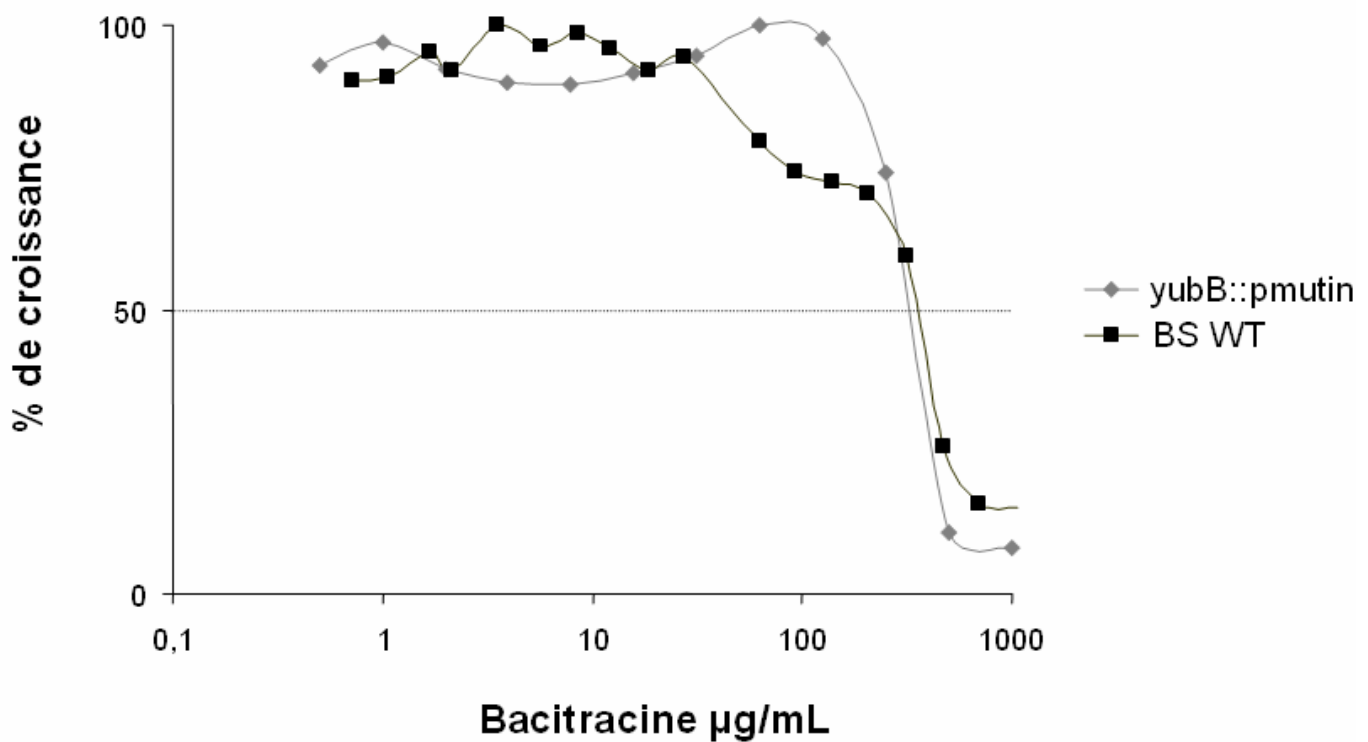
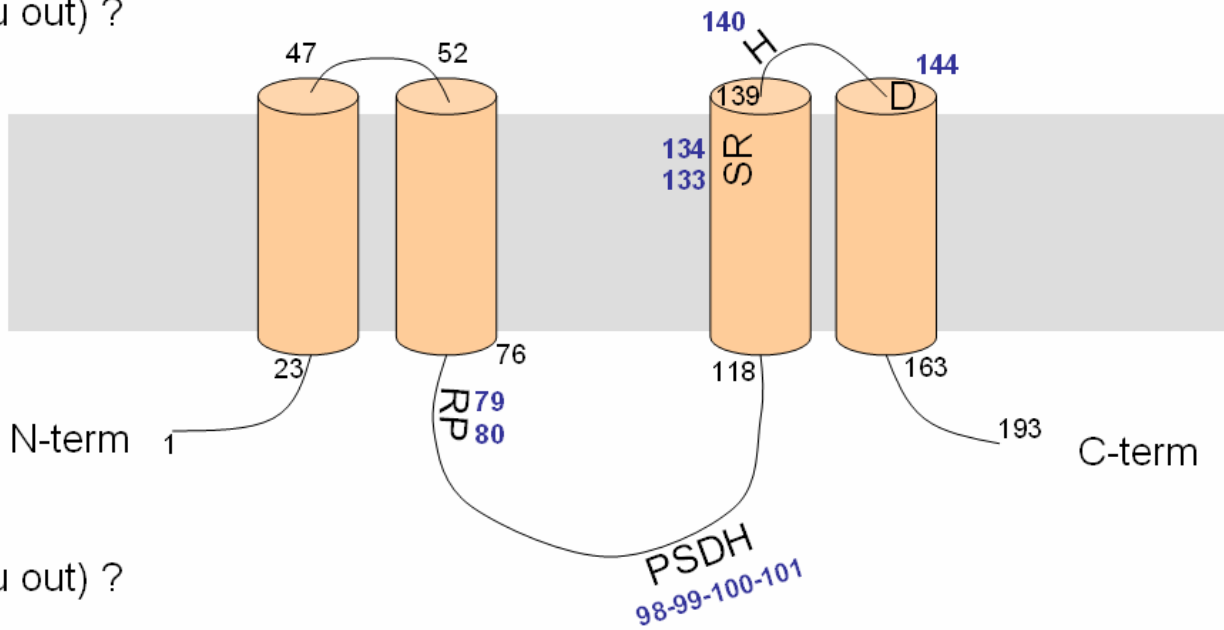


Fig.71 : Test de résistance à la bacitracine du mutant *yubB* ::pMutin. Les cellules sont mises en culture en microplaques 96 puits en présence de concentrations croissantes de bacitracine et incubées 5h à 37°C comme décrit précédemment (Ohki *et al*, 2003). Puis, la DO à 620 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque de marque TECAN. L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration de bacitracine inhibant 50% de la croissance. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.



in (ou out) ?



in (ou out) ?

Fig.72 : Topologie prédite de la protéine BcrC par le logiciel TMHMM. Les chiffres noirs indiquent les résidus positionnés à l'extrémité des hélices transmembranaires. Les résidus identifiés comme conservés dans le motif PAP<sub>2</sub> de Stukey et Carman sont indiqués. Les chiffres bleus indiquent leur position respective.

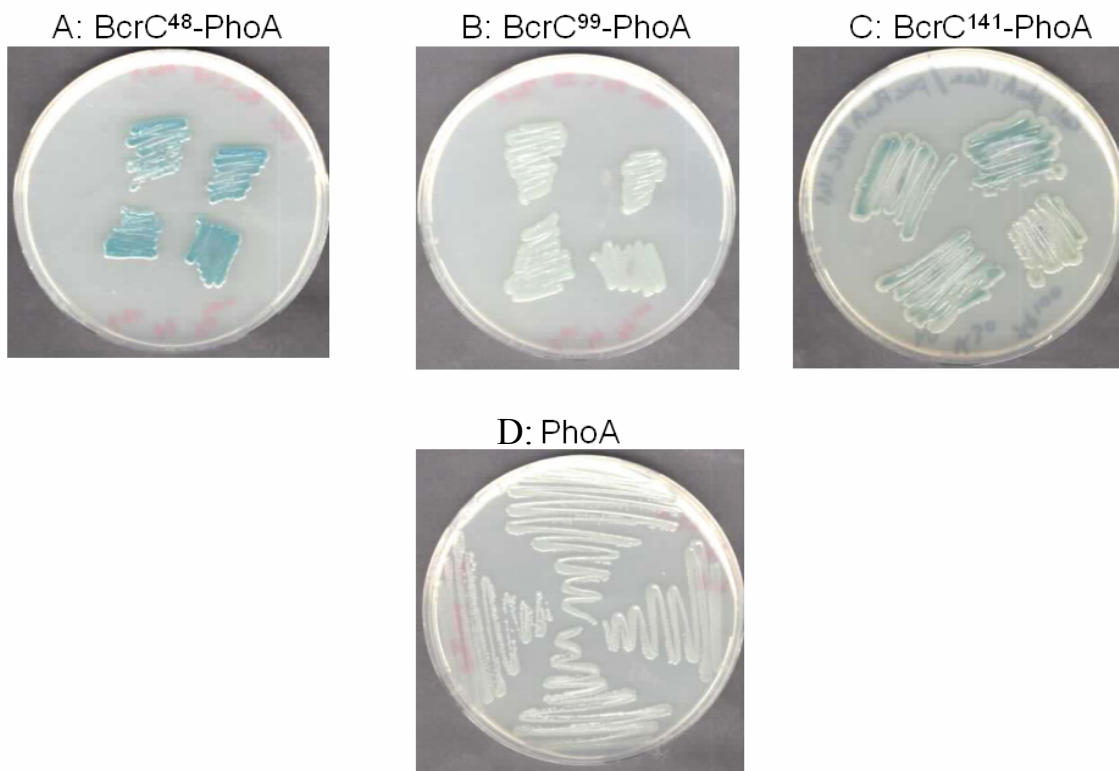


Fig.73 : Expression des protéines chimériques BcrC-PhoA chez *E. coli*.

Une souche d'*E. coli* délétée du gène *phoA* a été transformée par les plasmides pUC-*bcrC*<sup>48</sup>-*phoA* (A), pUC-*bcrC*<sup>99</sup>-*phoA* (B), pUC-*bcrC*<sup>141</sup>-*phoA* (C) ou pUC-*phoA* (D) puis disposée sur des boîtes LB agar contenant 100µg/mL d'Xp. L'expérience a été répétée pour 4 clones différents provenant de chacune des transformations.

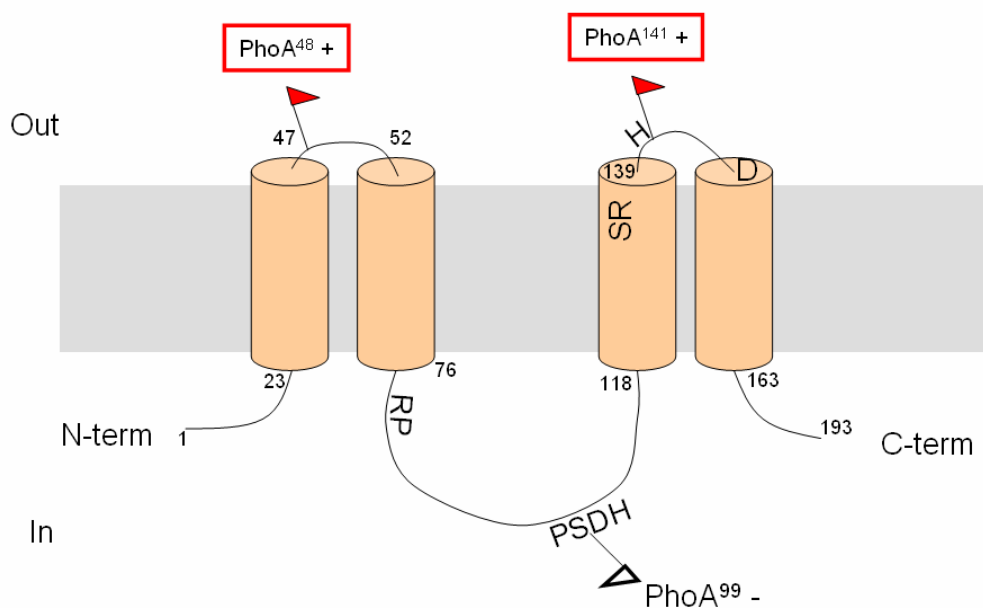


Fig.74 : Schématisation des résultats obtenus avec les fusions BcrC-PhoA.

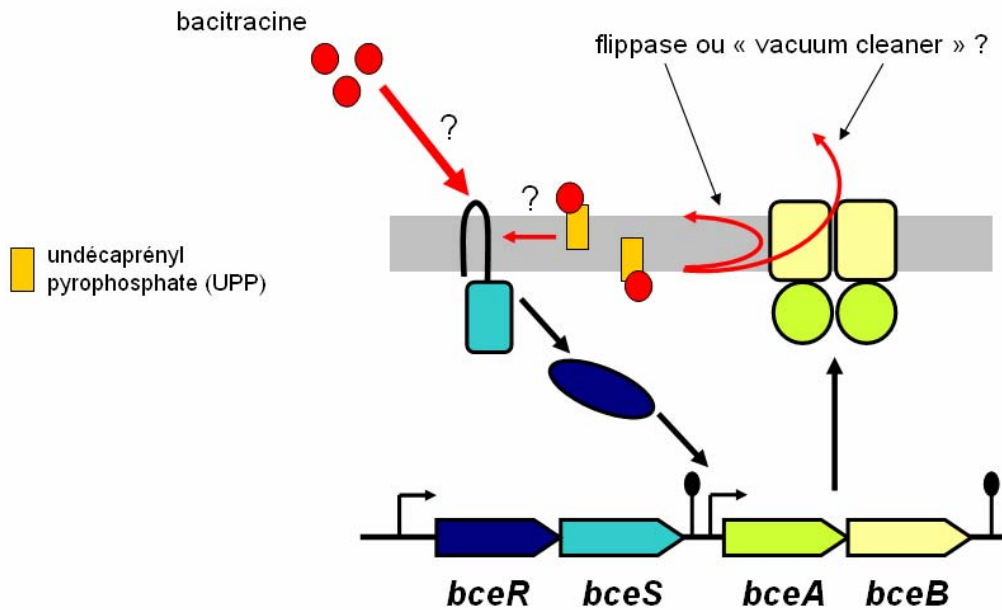


Fig.75 : Modèle d'étude du système BceRSAB. Le modèle le plus simple serait que la bacitracine soit le stimulus direct du senseur BceS, qui active alors le phosphorelais, induisant la synthèse du transporteur ABC BceAB. Ce dernier, étant prédit comme un exporteur, pourrait agir comme une flippase ou un « vacuum cleaner » afin de détoxifier la membrane de la bacitracine. Cependant, le senseur BceS est atypique et susceptible de détecter un stimulus membranaire. Ce stimulus pourrait être le complexe membranaire UPP-bacitracine (en orange et rouge).

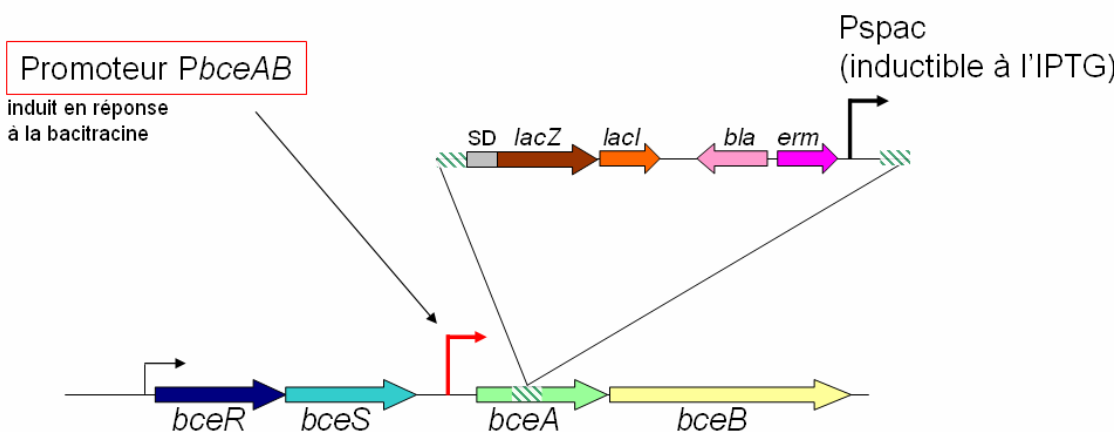


Fig.76 : Interruption génique par intégration du vecteur pMutin dans le gène *bceA*. Le plasmide pMutin s'intègre par simple événement de recombinaison homologue en faisant intervenir la zone hachurée (Vagner *et al*, 1998). *bla*, gène codant la  $\beta$ -lactamase pour la sélection chez *E. coli* (résistance à l'ampicilline); *erm*, gène de résistance à l'érythromycine pour la sélection chez *B. subtilis*; *lacZ*, gène rapporteur codant la  $\beta$ -galactosidase; *lacI*, gène codant le répresseur LacI; SD, Shine-Dalgarno.

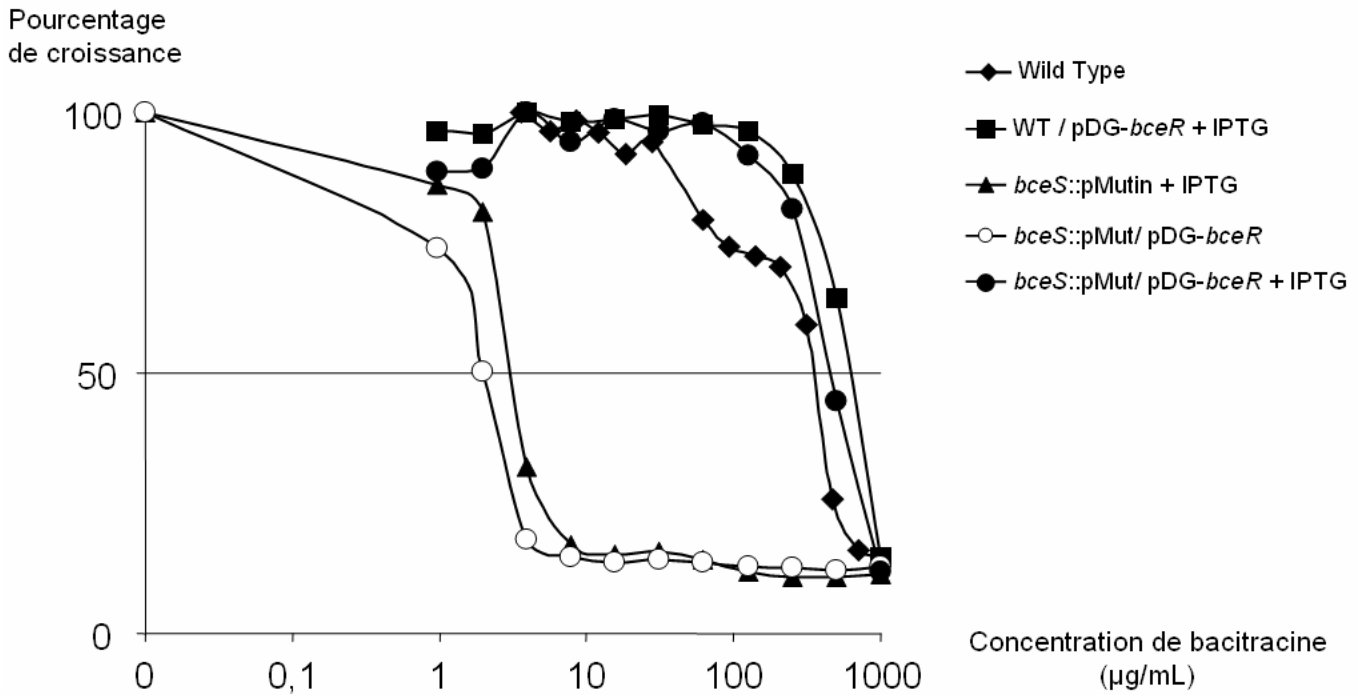


Fig.77 : Test de l'implication du senseur BceS dans la résistance à la bacitracine. Les cellules sont incubées en microplaques 96 puits pendant 5h à 37°C en présence de concentrations croissantes de bacitracine. La surproduction de BceR à partir du plasmide pDG-*bceR* est activée par ajout d'IPTG 1mM. Puis, la DO 620nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque de marque TECAN. L'IC<sub>50</sub> correspond à la concentration de bacitracine inhibant 50% de la croissance, comparativement à la croissance maximale obtenue en absence de bacitracine. Les résultats présentés ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

Souches	Quantité relative de transcrits de <i>yvcR</i> (unités arbitraires $\pm$ SD)
WT non induite	1 $\pm$ 0,08
WT + enduracidine 50 $\mu$ g/mL	74 $\pm$ 10
WT + enduracidine 200 $\mu$ g/mL	88 $\pm$ 15

Tableau 3 : Analyse par QT-PCR du taux de transcrits de *yvcR* en présence ou en absence d'enduracidine. Une culture d'une souche sauvage de *B. subtilis* est incubée en milieu riche Luria-Bertani à 37°C sous agitation. En milieu de phase exponentielle (DO 0,5), la culture est séparée dans 3 erlenmeyers contenant 50 $\mu$ g/mL d'enduracidine, 200  $\mu$ g/mL d'enduracidine ou ne contenant pas d'enduracidine (WT non induite). Au bout de 15 min, des prélèvements sont effectués et les ARN totaux préparés avec le kit « RNA Purification Kit » de ROCHE en suivant les indications du fournisseur. Puis, la transcription inverse synthétisant les ADN complémentaires est réalisée sur 1 $\mu$ g d'ARN totaux pour chaque échantillon avec 100ng d'amorces aléatoires (Invitrogen) et 200 U de reverse transcriptase superscript II, Invitrogen. Les tests QT-PCR sont réalisés avec l'appareil « Light Cycler », le kit « Fast start master SYBR-Green I » de ROCHE et une paire d'amorces spécifiques du gène *yvcR*. Les résultats correspondent à la valeur moyenne obtenue après 3 expériences indépendantes et les écarts types sont précisés.

	Activités $\beta$ -galactosidase en U/DO $\pm$ SD	
	- enduracidine	+ enduracidine 50 $\mu$ g/mL
<i>yvcR</i> ::pMutin	2,5 $\pm$ 2,5	4,5 $\pm$ 0,8

Tableau 4 : Test de l'expression de la fusion transcriptionnelle *yvcR* :: *lacZ* en réponse à l'enduracidine. La souche *yvcR* :: pMutin est mise en culture dans un milieu riche Luria-Bertani à 37°C sous agitation puis séparée en milieu de phase exponentielle dans 2 erlenmeyers dont un contient 50  $\mu$ g/mL d'enduracidine. Après 15 min à 37°C, un prélèvement est effectuée et les activités  $\beta$ -galactosidases mesurées comme décrit précédemment dans le matériel et méthode de l'article 3. Les valeurs correspondent à la moyenne des activités obtenues dans 3 expériences indépendantes et les écarts types sont indiqués.

	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. mutans</i>
UPP Phosphatase sous-famille BacA	YubB <sub>Bl</sub> UppP <sub>Bl</sub>	YubB	(BcrD) ou UppP <sub>Ef</sub>	UppP <sub>Sm</sub>
UPP phosphatase sous-famille PAP <sub>2</sub>	BcrC <sub>Bl</sub> , YwoA Bli03193 Bli02427 Bli02820	BcrC YodM	EF0796	NP_722031 SMU_890
Transporteur ABC (9) / Régulation	YtsCD / 2C YtsAB BceAB / 2C BceRS	BceAB / 2C BceRS		MbrAB / MbrCD
Transporteur ABC (7) / Régulation	BcrAB <sub>Bl</sub> / 2C BacRS		BcrAB <sub>Ef</sub> / régulateur famille Cro/Ci	

Tableau 5 : Bilan des mécanismes de résistance (caractérisés ou putatifs) à la bacitracine chez 4 bactéries du groupe des Firmicutes. Les séquences des protéines YubB et BcrC de *B. subtilis* ont été utilisées pour rechercher par BLAST les protéines similaires chez les 4 bactéries. Seule BcrC a été montrée comme étant une UPP phosphatase. Les systèmes de résistance impliquant des transporteurs ABC sont séparés suivant que le transporteur appartient à la sous-famille 9 (9) ou 7 (7) et leur partenaire participant à leur régulation est indiqué. Les systèmes de régulation comportant un activateur sont en rouge et ceux comportant un répresseur sont en bleu. 2C, système phosphorelais à deux composants.

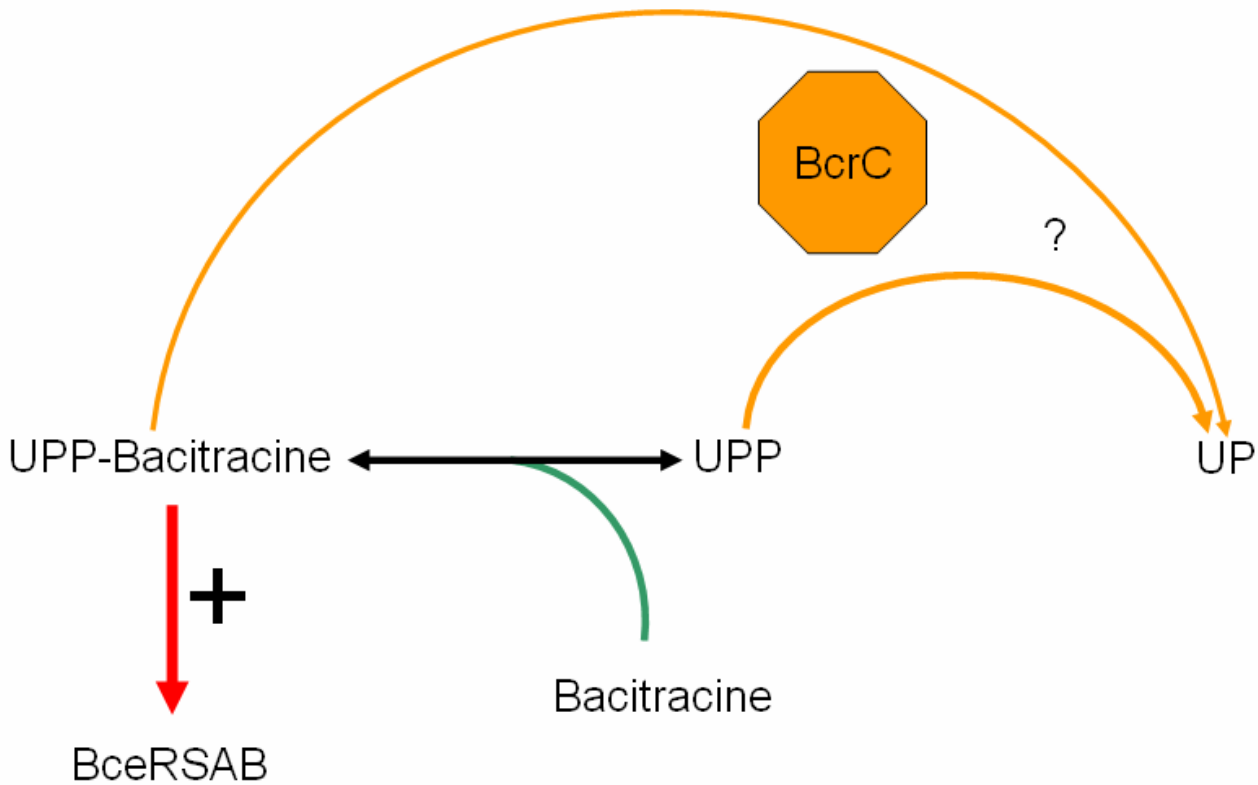


Fig.78 : Modèle de coordination entre les deux systèmes de résistance à la bacitracine de *B. subtilis*. La bacitracine complexe l'UPP avec une constante de dissociation de  $10^{-6}$  (flèche verte et noire). La présence de ce complexe dans la membrane est à la base de l'activation du système majeur de résistance, BceRSAB (flèche rouge). BcrC, en déphosphorylant l'UPP, ou éventuellement le complexe UPP-bacitracine, déplace l'équilibre en augmentant le rendement de régénération de l'UP (flèches oranges). Ceci conduit à une diminution de l'activation du système BceRSAB. On peut supposer ainsi qu'à faible dose de bacitracine seule BcrC suffise à la résistance, tandis qu'à forte dose, l'équilibre est fortement déplacé vers le complexe membranaire UPP-bacitracine et le système BceRSAB prend le relais.

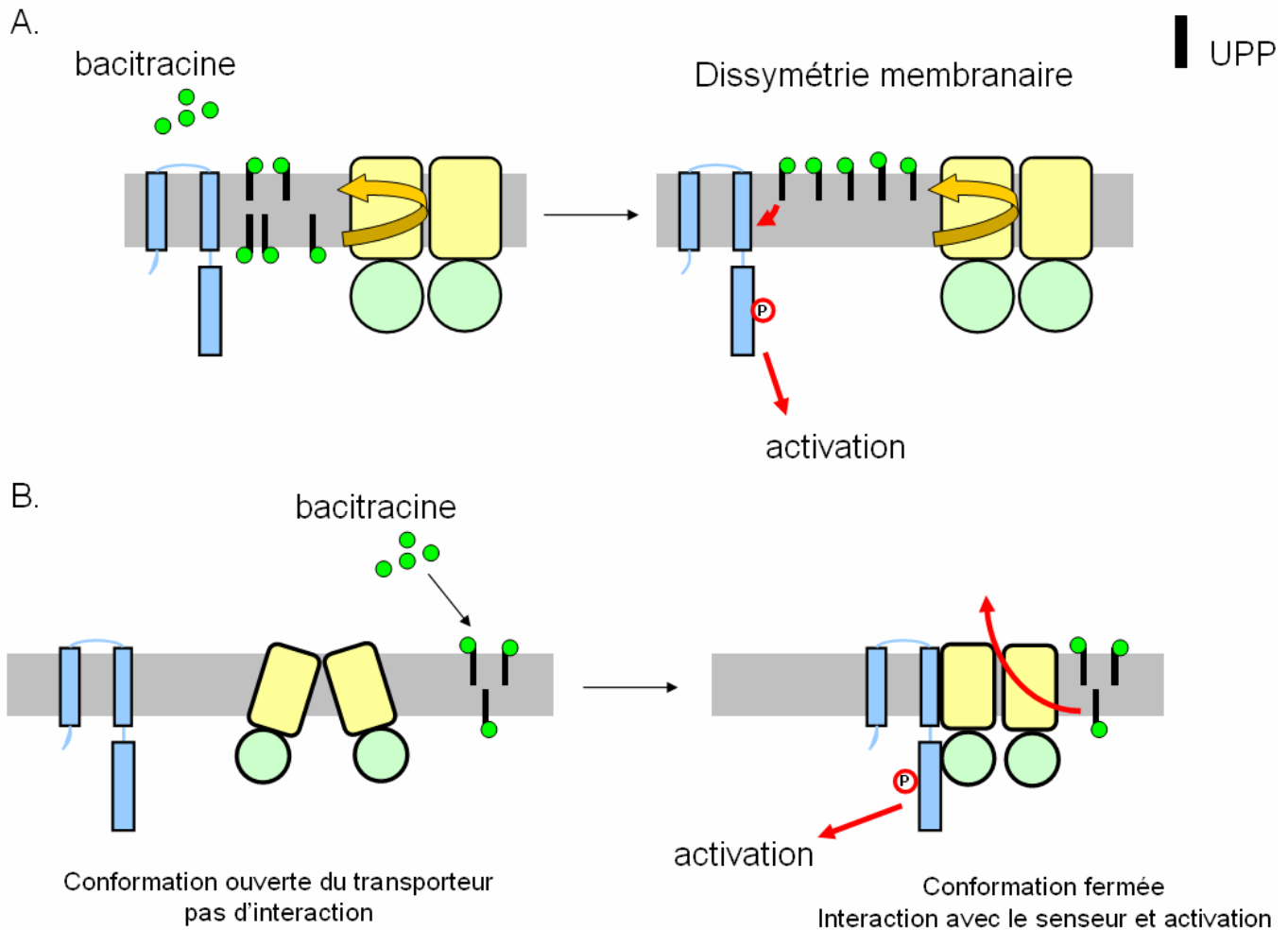


Fig.79 : Modèles d'activation du système BceRSAB. A. Le transporteur ABC BceAB (vert et jaune) agit comme une flippase et prend en charge le complexe membranaire UPP/bacitracine. Ceci crée une dissymétrie membranaire dans le feuillet externe et constitue le véritable stimulus du senseur BceS (en bleu). B. Il existe une interaction directe entre les domaines membranaires du senseur et du transporteur ABC. La conformation ouverte du transporteur (en bas à gauche) ne peut interagir avec le senseur et le système est inactif. En présence du complexe membranaire UPP/bacitracine, le transporteur passe en conformation fermée (en bas à droite) pour expulser ou transloquer ce complexe, et interagit alors avec le senseur pour activer le système.



## Résumé

L'enveloppe bactérienne est une cible majeure d'un grand nombre d'antibiotiques naturels. Certains provoquent d'importantes perturbations de la membrane cytoplasmique, d'autres ciblent spécifiquement les différentes étapes enzymatiques de la voie de biosynthèse du peptidoglycane, constituant majeur de la paroi. Pour contrer l'action de ces antibiotiques, les bactéries ont développé divers systèmes de résistance leur conférant un avantage sélectif dans leur niche écologique. Le rejet de l'antibiotique est un des principaux mécanismes de résistance rencontrés chez les bactéries. Il implique parfois des transporteurs membranaires de type ABC (pour ATP Binding Cassette) pouvant hydrolyser l'ATP pour exporter ou importer un allocrite. Les bactéries possèdent également divers systèmes leur permettant, d'une part, de détecter un signal environnemental (antibiotique ou stress de la paroi qu'il engendre), et, d'autre part, d'assurer la transduction du signal qui aboutit à une réponse adaptée. Deux types de systèmes sont impliqués dans les réponses aux stress de la paroi : les phosphorelais et les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique.

Le groupe des Firmicutes, dont la bactérie modèle est *Bacillus subtilis*, est un groupe ubiquitaire producteur d'antibiotiques et contenant de nombreux organismes pathogènes. Les analyses effectuées au laboratoire ont permis d'identifier chez les Firmicutes des systèmes associant un phosphorelais et un transporteur ABC. Dans chacun des cas, les gènes codant les différents partenaires du système sont à proximité sur le chromosome et le phosphorelais régule l'expression des gènes codant le transporteur ABC. On trouve trois de ces systèmes chez *B. subtilis* nommés BceRSAB (anciennement YtsABCD), YvcPQRS et YxdJKLM. L'objectif de notre étude était de tester l'hypothèse selon laquelle ces systèmes pouvaient être impliqués dans la résistance aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne.

La bacitracine est un antibiotique qui se complexe à l'undécaprényle pyrophosphate (UPP) et inhibe la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane : la régénération de l'undécaprényle phosphate (UP). Nos résultats indiquent que le système BceRSAB est le composant majeur de la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*. L'expression de l'opéron *bceAB* est activée, en présence de bacitracine, par le phosphorelais BceRS. Nous avons également identifié une protéine, nommée BcrC, qui participe à la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*. Nous avons démontré que cette dernière est une UPP phosphatase impliquée dans la régénération de l'UP et s'oppose ainsi à l'action de la bacitracine. L'expression du gène *bcrC* ne dépend pas du phosphorelais BceRS mais de trois facteurs sigma à fonction extracytoplasmique. En conclusion, *B. subtilis* possède deux types de systèmes de résistance à la bacitracine indépendants et complémentaires.

Nous avons par la suite analysé le mécanisme de régulation de l'induction du système BceRSAB par la bacitracine. Nos résultats sont surprenants et montrent clairement que le transporteur ABC BceAB participe à l'activation de l'expression de ses propres gènes de structure avec le phosphorelais BceRS. De plus, lorsque le pool cellulaire d'UPP diminue (lorsque la phosphatase BcrC est surproduite), et en présence de bacitracine, l'expression du gène *bceA* diminue également. Ceci montre que l'UPP participe, avec la bacitracine, au stimulus du système BceRSAB. Notre hypothèse de travail est que le transporteur ABC, prédit comme étant un exporteur, prend en charge le complexe UPP/bacitracine et agit comme une flippase pour créer une dissymétrie membranaire ressentie par le senseur BceS. Il n'est pas exclu, qu'en présence de bacitracine, le transporteur BceAB puisse interagir avec le senseur BceS pour permettre l'activation du système.

La majeure partie des bactéries du groupe des Firmicutes possède, d'une part, des protéines similaires à BcrC, et, d'autre part, des systèmes similaires au système BceRSAB. Toutes les protéines « BcrC-like » ont un motif caractéristique permettant de les classer dans la famille des phosphatases de type PAP2. Il est tentant de penser qu'elles sont toutes des UPP phosphatases assurant une des étapes clés de la synthèse du peptidoglycane.

Par ailleurs, les deux autres systèmes « Bce-like » de *B. subtilis*, YvcPQRS et YxdJKLM, sont également activés en présence d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne et nous savons que le transporteur ABC YvcRS est aussi impliqué dans le mécanisme de régulation. Nous proposons donc que les systèmes « Bce-like » des Firmicutes sont tous des systèmes de détoxification dirigés contre des antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne.