



**HAL**  
open science

# Étude structurale et fonctionnelle de tyrosine-kinases bactériennes

Emmanuelle Bechet

► **To cite this version:**

Emmanuelle Bechet. Étude structurale et fonctionnelle de tyrosine-kinases bactériennes. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10163 . tel-00720223

**HAL Id: tel-00720223**

**<https://theses.hal.science/tel-00720223>**

Submitted on 24 Jul 2012

**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.

**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

**Délivrée par**

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE**

**DIPLOME DE DOCTORAT**

**(arrêté du 7 août 2006)**

**soutenue publiquement le 29 Septembre 2010**

**par**

**Melle Emmanuelle BECHET**

**TITRE :**

**ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE  
TYROSINE-KINASES BACTERIENNES**

**Directeur de thèse :**

**Dr. Christophe GRANGEASSE**

**Jury :**

**M le Pr. Alain J. COZZONE**

**Mme la Dr. Anne GALINIER**

**Mme la Dr. Anne Marie DI GUILMI**

**M le Dr. Yvan MIJAKOVIC**

**M le Dr. Christophe GRANGEASSE**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examineur**

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

---

**RESUME EN FRANÇAIS :**

Au laboratoire, une famille de tyrosine kinases propres aux bactéries et ne présentant aucune ressemblance structurale avec les protéine-kinases d'origine eucaryote a été identifiée. Ces enzymes, appelées BY-kinases, sont notamment impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires, mais leurs rôles précis ainsi que leurs mécanismes catalytiques sont encore peu compris.

Dans la première partie de ce travail, nous avons caractérisé le rôle physiologique de la phosphorylation sur la tyrosine de la protéine Ugd, une UDP-glucose déshydrogénase, par les BY-kinases Wzc et Etk d'*E. coli*. Nous avons démontré que la phosphorylation d'Ugd sur un site commun à Wzc et Etk augmente son activité. Nous avons également établi que la phosphorylation d'Ugd par Wzc participe à la régulation de la quantité d'acide colanique produit, tandis que la phosphorylation d'Ugd par Etk influence la résistance de la bactérie à la polymyxine.

Nous avons également effectué une analyse structure-fonction du domaine cytoplasmique de deux BY-kinases, CapA1/CapB2 de *S. aureus* et Wzc d'*E. coli*. Nous avons montré que ces deux protéines s'associent en octamère, grâce au motif EX2RX2R et qu'elle s'autophosphoryle selon un mécanisme intermoléculaire. Nous avons, de plus, identifié le mécanisme d'activation de ces protéines et révélé l'importance d'un domaine particulier dans l'autophosphorylation de Wzc et la biosynthèse de l'acide colanique.

La caractérisation structurale et fonctionnelle des BY-kinases représente une approche prometteuse et originale en vue de l'élaboration de molécules inhibant spécifiquement leur activité et pouvant affecter le pouvoir virulent des bactéries pathogènes.

---

**TITRE EN ANGLAIS :**

Structural and functional analysis of bacterial tyrosine kinases

---

**RESUME EN ANGLAIS :**

A new class of bacterial enzymes, named BY-kinases, has been shown to catalyze protein-tyrosine phosphorylation. These enzymes share no structural and functional similarities with their eukaryotic counterparts. Evidence of their involvement in extracellular polysaccharide biosynthesis has been provided, but their accurate functions and their catalytic mechanism remain largely unknown.

First, we characterized the physiological role of tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase, by the BY-kinases Wzc and Etk of *E. coli*. We demonstrated that Ugd phosphorylation by Wzc or Etk occurs on the same site and increases its activity. We also established that Wzc-mediated phosphorylation of Ugd participates in the regulation of colanic acid production whereas Ugd phosphorylation by Etk influences resistance to polymyxin.

In addition, we performed a structure-function analysis of the cytoplasmic domain of two BY-kinases, namely CapA1/CapB2 from *S. aureus* and Wzc from *E. coli*. We showed that these two proteins associate in a ring-shaped octamer in which the motif EX2RX2R plays a crucial role. In addition, we showed that BY-kinases autophosphorylate using an intermolecular mechanism. We also identified the activation mechanism of BY-kinases and we revealed the role of a particular domain, found specifically in BY-kinases from proteobacteria, in Wzc autophosphorylation and colanic acid biosynthesis.

Structural and functional characterization of BY-kinases represents an original and promising approach in order to develop new molecules inhibiting specifically these enzymes and to affect the virulence of bacterial pathogens.

---

**DISCIPLINE :**

Biochimie - Microbiologie

---

**MOTS-CLES :**

Phosphorylation – Tyrosine – « Bacterial tYrosine-kinases » (BY-kinases) – Synthèse de l'acide colanique – Résistance à la polymyxine – Structure – Mécanisme de phosphorylation

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :**

Institut de Biologie et Chimie des Protéines – CNRS – Université Lyon 1  
7 passage du Vercors, 69367 LYON Cedex 07



*A Mamie Guite*

## *Remerciements*

*Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le laboratoire de « Phosphorylation des Protéines et Pathogénie Bactérienne » dirigé par le professeur Alain J. Cozzone à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon, sous la direction scientifique du Dr. Christophe Grangeasse.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr. Alain J. Cozzone pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir offert la chance de réaliser ma thèse dans le domaine de la biochimie alors que j'avais une formation de chimiste.*

*Je remercie très sincèrement les directeurs de recherche Anne-Marie Diguilmi et Anne Galinier pour avoir accepté de juger ce travail, qui plus est pendant le mois d'août. Je remercie aussi très chaleureusement le professeur Ivan Mijakovic pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.*

*Je remercie également très sincèrement mon directeur de thèse, le Dr. Christophe Grangeasse, tout d'abord pour avoir pris le risque d'encadrer en thèse une ingénieure chimiste qui n'y connaissait rien aux bactéries ! Je le remercie également pour son excellent encadrement pendant ces trois années, sa disponibilité, ses conseils et son ouverture d'esprit...bien qu'il n'ait pas adhéré à toutes mes théories farfelues ! Enfin d'un point de vue personnel, un grand merci à Christophe, pour avoir malgré lui joué les entremetteurs ;-)*

*Je remercie toutes les personnes de l'IBCP avec qui j'ai interagi au cours de ma thèse et plus particulièrement Christophe Combet et Raphaël Terreux du Laboratoire de Bioinformatique. Toute ma reconnaissance va également à Sylvie Nessler et Jakub Gruszczyk du Laboratoire d'Enzymologie et Biologie Structurale de Gif/Yvette, pour notre active collaboration qui a contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie également mes parents, ma sœur, mes grands-parents et Brice pour leur soutien et leur amour. J'ai une pensée toute particulière pour Mamie Guite qui, malgré elle, a fait naître ma passion pour la recherche en biologie.*

*Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe. En particulier un grand merci à Soline, pour m'avoir transmis tout son savoir-faire. Il n'y a que la polymyxine, je sais pas pourquoi, c'est pas bien passé...Merci à Brice, alias Brissou le Chouchou, que je n'ai*

## *Remerciements*

*malheureusement pas réussi à détrôner, pour ses bons conseils sur la préparation de l'acide colanique...là je ne sais pas non plus pourquoi, mais la transmission s'est mieux faite que pour la polymyxine ! Merci à Brice et Didier pour leur résine Ni-NTA, je préfère ne pas savoir par quels stades exacts elle est passée, mais elle marche nickel c'est le cas de le dire !!! Je tiens également à remercier tout particulièrement Aurore pour toutes les séances de ciné gratuites, le paquet de pop corn presque gagné, sa bonne humeur communicative et les rigolades au labo. Je lui souhaite bon courage pour sa thèse. Je souhaite également une bonne intégration à Jean-Pierre dans cette nouvelle thématique. Merci à Seb pour ses anecdotes bricolage, France télécom et ses histoires dans le métro qui nous font nous dire que finalement on a de la chance. Une petite pensée aussi pour Hongwei, qui nous a fait passer une année un peu spéciale et nous a fait redécouvrir les bonnes pratiques de laboratoire ;-) le taillage de pipette, le séchage des boîtes de Pétri au dessus de la flamme, les milliers de PCR et de miniprep toutes identiques et la découpe de la ficelle du store tout neuf... que de bons souvenirs !!!*

# **SOMMAIRE**

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>10</b>
<i>I Phosphorylation des protéines bactériennes sur la tyrosine</i>	<i>10</i>
<b>I.1 Les tyrosine-kinases bactériennes</b>	<b>10</b>
I.1.1 Caractérisation de la première tyrosine-kinase bactérienne : la protéine Ptk d' <i>A. johnsonii</i>	10
I.1.2 Emergence d'une nouvelle famille de protéines : les BY-kinases	12
I.1.2.1 La BY-kinase Wzc d' <i>E. coli</i>	15
I.1.2.2 La BY-kinase Etk d' <i>E. coli</i>	20
I.1.2.3 La BY-kinase Cap5B2 chez <i>S. aureus</i>	23
I.1.3 Les tyrosine-kinases bactériennes de type eucaryote	23
I.1.4 Autres tyrosine-kinases bactériennes	25
<b>I.2 Substrats des BY-kinases et rôles physiologiques</b>	<b>27</b>
<i>II Les polysaccharides bactériens extracellulaires</i>	<i>31</i>
<b>II.1 Présentation générale</b>	<b>31</b>
II.1.1 Définition	31
II.1.2 Rôles physiologiques des polysaccharides extracellulaires et applications industrielles	31
II.1.3 Mécanismes de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires	33
II.1.3.1 Le système Wzy-dépendant	33
II.1.3.2 Le système ABC-transporteur-dépendant	35
II.1.3.3 Autres systèmes de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires	36
<b>II.2 L'exopolysaccharide d'<i>E. coli</i> K12 : l'acide colanique</b>	<b>37</b>
II.2.1 Structure de l'acide colanique	37
II.2.2 Voie de biosynthèse de l'acide colanique	37
II.2.3 Organisation et régulation génétique de la biosynthèse de l'acide colanique	41
II.2.4 Rôles de l'acide colanique	42
<b>II.3 Rôle de la phosphorylation sur la tyrosine dans la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires</b>	<b>43</b>
<i>III La résistance aux antibiotiques cationiques de type polymyxine</i>	<i>46</i>
<b>III.1 Introduction</b>	<b>46</b>
III.1.1 Résistance aux antibiotiques	46
III.1.2 Les peptides antimicrobiens cationiques	47
III.1.3 La polymyxine B	48
<b>III.2 Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens cationiques</b>	<b>49</b>
III.2.1 Modification par addition de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N) sur le lipide A du LPS	50
III.2.2 Modification par addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A et le corps oligosaccharidique du LPS	52
III.2.3 Modification par déphosphorylation des résidus osidiques du LPS	52
III.2.4 Modification par addition d'un palmitate sur le lipide A du LPS	53
III.2.5 Modification de la liaison des acides gras du lipide A du LPS	53
III.2.6 Mécanismes d'induction de la résistance à la polymyxine par modification du LPS	54
<b>III.3 Rôle de la protéine Etk dans la résistance à la polymyxine</b>	<b>56</b>

**MATERIELS ET METHODES** **59****I Matériels** **59****II Méthodes** **60****II.1 Souches, plasmides et milieux de culture** **60**

II.1.1 Caractéristiques des souches bactériennes	60
II.1.2 Plasmides	60
II.1.2.1 Le plasmide pQE30	60
II.1.2.2 Le plasmide pGEX-KT	61
II.1.2.3 Le plasmide pGEX(M)	62
II.1.2.4 Le plasmide pET15b	62
II.1.2.5 Le plasmide pUC18	63
II.1.2.6 Le plasmide pUC18-rcsA.	63
II.1.2.7 Le plasmide pREP4-groESL	63
II.1.2.8 Le plasmide pRedET	64
II.1.2.9 Les plasmides pKD3 et pKD4	65
II.1.2.10 Plasmides utilisés pour cette étude	65
II.1.3 Milieux de culture	69
II.1.4 Antibiotiques	69

**II.2 Techniques de biologie moléculaire** **70**

II.2.1 Préparation, analyse et purification d'ADN	70
II.2.2 Clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide	70
II.2.2.1 Amplification de fragments d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	70
II.2.2.2 Digestion par des endonucléases de restriction	73
II.2.2.3 Ligation	73
II.2.3 Transformation des bactéries	74
II.2.4 Mutagenèse dirigée par la technique de double PCR	75
II.2.5 Séquençage de l'ADN	75
II.2.6 Inactivation de gène	75
II.2.6.1 Principe	75
II.2.6.2 Préparation du fragment de recombinaison	77
II.2.6.3 Transformation de la souche à modifier avec le plasmide pRedET	77
II.2.6.4 Recombinaison du fragment de PCR	78
II.2.7 Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)	78
II.2.7.1 Préparation d'ARN total	78
II.2.7.2 Réaction de reverse transcription (RT)	79

**II.3 Techniques de biochimie** **79**

II.3.1 Surproduction de protéines recombinantes	79
II.3.2 Préparation de vésicules de membranes internes	80
II.3.3 Préparation d'un extrait total de protéines bactériennes	80
II.3.4 Purification d'une protéine fusionnée à 6 résidus histidyles	81
II.3.5 Purification d'une protéine fusionnée à la glutathion-S-tranférase	81
II.3.6 Analyse des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	82
II.3.6.1 Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes	82
II.3.6.2 Coloration des protéines	83
II.3.7 Analyse des protéines par électrophorèse en conditions natives (PAGE)	83
II.3.8 Analyse des protéines par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	83
II.3.9 Dosage des protéines	83
II.3.10 Transfert des protéines sur membrane PVDF	84
II.3.11 Immunorévélation des protéines sur membrane de PVDF	84
II.3.12 Test de phosphorylation <i>in vitro</i>	85
II.3.12.1 Phosphorylation des protéines	85
II.3.12.2 Traitement des gels par l'acide trichloroacétique	86
II.3.12.3 Autoradiographie	86
II.3.13 Comptage de la radioactivité en scintillation liquide	86
II.3.14 Déphosphorylation <i>in vitro</i>	86
II.3.15 Test d'activité UDP-glucose déshydrogénase	86

II.3.16 Méthodes de purification et d'analyse de l'acide colanique	87
II.3.16.1 Purification de l'acide colanique	87
II.3.16.2 Dosage de l'acide colanique	87
II.3.16.3 Estimation de la taille du polymère d'acide colanique.	88
II.3.17 Test de résistance à la polymyxine	88

## **RESULTATS** **89**

---

### ***I Caractérisation du rôle de la phosphorylation sur la tyrosine de la protéine Ugd chez E. coli*** **89**

<b>I.1 Phosphorylation <i>in vitro</i> de la protéine Ugd par la BY-kinase Etk</b>	<b>89</b>
<b>I.2 Identification <i>in vitro</i> du site de phosphorylation de la protéine Ugd</b>	<b>90</b>
<b>I.3 Phosphorylation <i>in vivo</i> de la protéine Ugd par Wzc ou Etk en fonction des conditions de culture</b>	<b>92</b>
<b>I.4 Influence de la phosphorylation de la protéine Ugd sur son activité UDP-glucose déshydrogénase</b>	<b>94</b>
<b>I.5 Influence de la phosphorylation de la protéine Ugd dans la production d'acide colanique</b>	<b>95</b>
I.5.1 Dosage de l'acide colanique produit en fonction de la phosphorylation de la protéine Ugd	96
I.5.2 Estimation de la taille de l'acide colanique produit en fonction de la phosphorylation de la protéine Ugd	97
<b>I.6 Influence de la phosphorylation de la protéine Ugd sur la résistance à la polymyxine B</b>	<b>98</b>

### ***II Caractérisation biochimique et structurale de la BY-kinase A1<sub>Ct</sub>B2 de S. aureus*** **100**

<b>II.1 Description de la structure cristallographique de A1<sub>Ct</sub>B2</b>	<b>100</b>
<b>II.2 Description de la structure cristallographique de A1<sub>Ct</sub>B2(K55M)</b>	<b>102</b>
<b>II.3 Etude du mécanisme d'autophosphorylation intermoléculaire</b>	<b>103</b>
<b>II.4 Etude du mécanisme d'activation de B2 par A1</b>	<b>106</b>
<b>II.5 Pertinence biologique de l'octamère</b>	<b>107</b>

### ***III Etude structurale et fonctionnelle de la BY-kinase Wzc<sub>ca</sub> d'E. coli*** **110**

<b>III.1 Description de la structure cristallographique de Wzc<sub>cyto</sub> K540M</b>	<b>110</b>
<b>III.2 Etude du mécanisme d'autophosphorylation de Wzc<sub>cyto</sub></b>	<b>111</b>
<b>III.3 Pertinence physiologique de l'octamère</b>	<b>115</b>
<b>III.4 Etude de la fonction du domaine RK de Wzc</b>	<b>117</b>

## **DISCUSSION ET CONCLUSION** **122**

---

## **PUBLICATIONS** **130**

---

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **131**

---

# **ABBREVIATIONS**

°C	: degré (s) centigrade
Å	: angström (s)
A <sub>600</sub>	: absorbance à une longueur d'onde de 600 nm
ABC	: ATP-Binding Cassette
<i>Acc65I</i>	: endonucléase de restriction isolée à partir de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADP	: Adénosine 5' DiPhosphate
Amp	: ampicilline
ARN	: Acide RiboNucléique
ATP	: Adénosine 5'-TriPhosphate
<i>BamHI</i>	: endonucléase de restriction isolée à partir de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BET	: Bromure d'ETHidium
BPI	: Bactericidal/Permeability-Increasing protein
BSA	: Albumine de Sérum Bovin
BY-kinase	: Bacterial tYrosine-kinase
ca	: acide colanique
Ci	: curie (s)
<i>cps</i>	: capsular polysaccharide synthesis
CPS	: PolySaccharides Capsulaires
Ct	: extrémité C-terminale
Da	: dalton (s)
DLS	: Dynamic Light Scattering
DMSO	: DiMéthylSulfOxyde
Domaine RK	: domaine riche en arginine et en lysine
DTT	: 1,4-DiThio-D,L-Thréitol
dNTP	: désoxyriboNucléoside TriPhosphate
<i>EcoRI</i>	: endonucléase de restriction isolée à partir de <i>Escherichia coli</i> RY13
EDTA	: acide diamine-éthylène-tétra-acétique
EHEC	: <i>Escherichia coli</i> EntéroHémorragique
EPEC	: <i>Escherichia coli</i> EntéroPathogène
EPS	: ExoPolySaccharide
F	: farad (s)
Fig.	: figure
FRT	: FLP Recognition Target

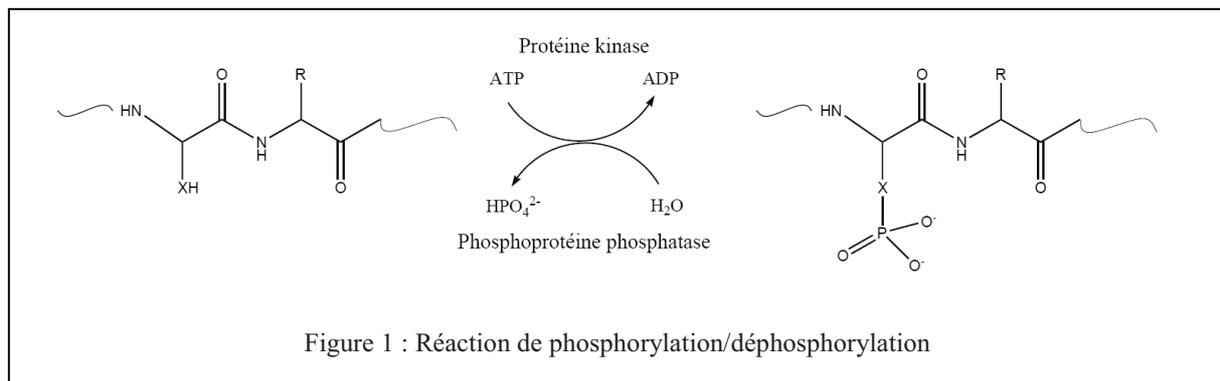
g	: gramme (s)
<i>g</i>	: gravité en m/s <sup>2</sup>
G4C	: Capsule de Groupe 4
GRAS	: Generally Recognized As Safe
GST	: Glutathion- <i>S</i> -Transférase
GTP	: Guanosine 5'-TriPhosphate
HAD	: HaloAcide Déshalogénase
<i>Hind</i> III	: endonucléase de restriction isolée à partir de <i>Haemophilus influenzae</i> Rd
His <sub>6</sub>	: étiquette 6 histidines
IDHK/P	: Isocitrate DésHydrogénase Kinase/Phosphatase
Int	: intégrase
IPTG	: IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside
h	: heure (s)
HMW	: High Molecular Weight
kan	: kanamycine
Kdo	: acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique
K <sub>m</sub>	: constante de Michaelis
L	: litre (s)
L-Ara4N	: 4-amino-4-désoxy-L-arabinose
LB	: milieu de Luria / Bertani
LMW	: Low Molecular Weight
LPS	: LipoPolySaccharide
m	: mètre (s)
M	: mole (s) par litre
mA	: milliampère (s)
MALDI-TOF	: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight
mant-ATP	: 2'/3'-O-(N-Methyl-anthraniloyl)-ATP
MCS	: Site Multiple de Clonage
MDR	: MultiDrug Resistance
MI	: Milieu Inducteur
min	: minute (s)
MM	: Masse Moléculaire
MNI	: Milieu Non Inducteur
m/z	: ratio masse/charge

NAD	: $\beta$ -Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	: $\beta$ -Nicotinamide Adénine Dinucléotide reduced form
Ni-NTA	: Nickel-NitriloTriAcetic acid
Nt	: extrémité N-terminale
NUDIX	: NUCleoside DIphosphate linked to some other moiety X
Oligo	: oligonucléotide
OPX	: Outer membrane Polysaccharide eXport
PAGE	: Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide
pb	: paire (s) de bases
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Réaction de Polymérisation en Chaîne
PCP	: Polysaccharide-CoPolymérase
PDB	: Protein Data Bank
PEG	: PolyEthylène Glycol
PEP	: PhosphoEnolPyruvate
<i>Pfu</i>	: ADN polymérase thermorésistante isolée à partir de <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	: potentiel hydrogène
Ptk	: Prokaryotic tyrosine kinase
PTS	: système phosphoénolpyruvate phosphotransférase
PVDF	: fluorure de polyvinylidène
q.s.p.	: quantité suffisante pour
<sup>R</sup>	: résistance (à l'antibiotique indiqué)
RBS	: site de fixation du ribosome
<i>Rcs</i>	: regulatory of capsular synthesis
rmsd	: root mean square deviation
RT	: Reverse Transcription
s	: seconde (s)
<i>SacI</i>	: endonucléase de restriction isolée à partir de <i>Streptomyces achromogenes</i>
SDS	: Sodium DodécylSulfate
SDS-PAGE	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
<i>SmaI</i>	: endonucléase de restriction isolée à partir de <i>Serratia marcescens</i>
SOB	: Super Optimal Broth
SOC	: Super Optimal broth with Catabolite repression
SSB	: Single-Stranded DNA Binding protein

STKP	: Sérine Thréonine Kinase de type eucaryote
<i>Taq</i>	: ADN polymérase thermorésistante isolée à partir de <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	: Tampon Tris Salin
TCA	: acide TriChloro-Acétique
T <sub>m</sub>	: température de fusion
TM	: hélice transmembranaire
TPR	: TetratricoPeptide Repeat
Tris	: tris-hydroxyméthyl-amino-méthane
TSS	: Transformation and Storage Solution
UDP	: Uridine DiPhosphate
Ugd	: UDP-glucose déshydrogénase
Und-P	: undécaprénol phosphate
Und-PP	: Undécaprénol diphosphate
V	: volt (s)
Vol	: volume (s)
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside
YC	: cluster de tyrosines
Ω	: ohm (s)

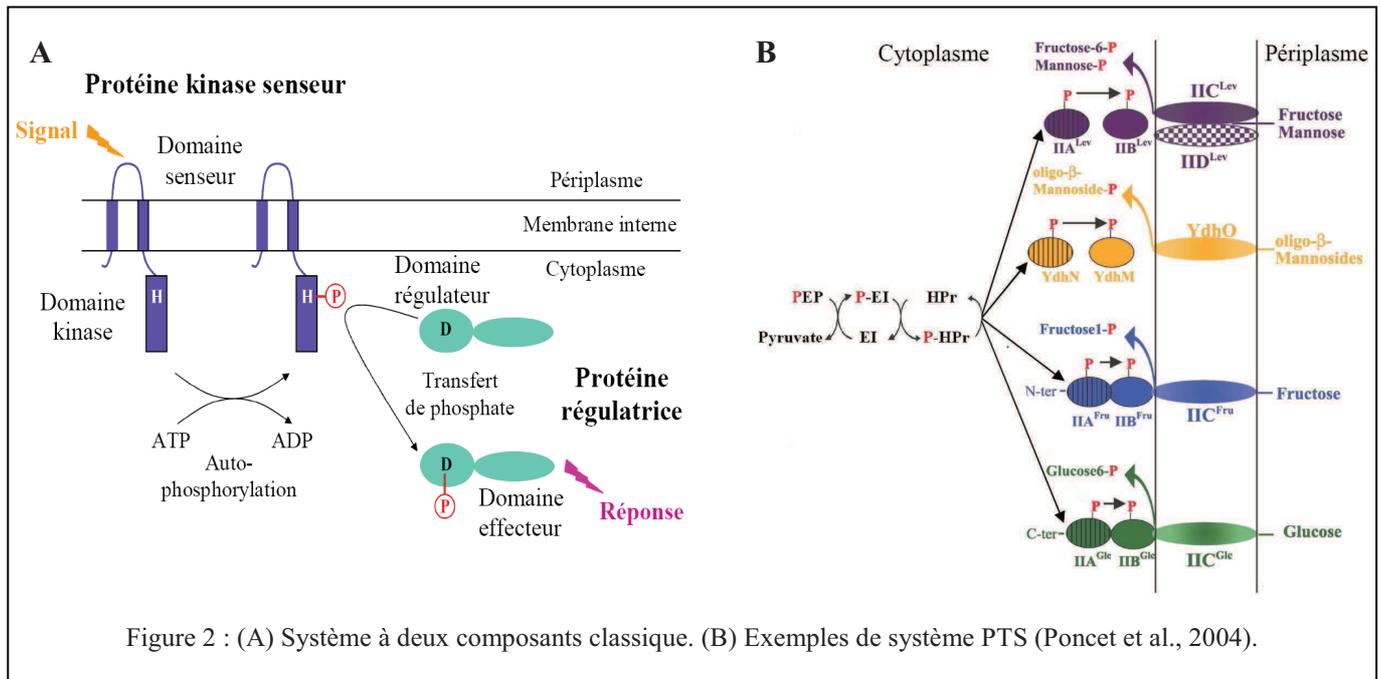
# **INTRODUCTION**

La phosphorylation des protéines est une modification post traductionnelle, catalysée par des enzymes spécifiques, les protéine-kinases. Cette modification consiste en la formation d'une liaison covalente entre un groupement phosphate et la chaîne latérale d'un acide aminé d'une protéine, au niveau de fonctions alcool (sérine, thréonine, tyrosine), amine (arginine, histidine, lysine) ou acide carboxylique (acide aspartique, acide glutamique) et plus rarement thiol (cystéine) (Fig. 1). La phosphorylation induit des modifications fonctionnelles très importantes de la protéine cible se traduisant généralement par une amplification ou une inhibition de son activité enzymatique, une modification structurale affectant sa capacité d'interaction avec ses partenaires (protéines ou ADN), ou encore un changement de sa localisation cellulaire. La phosphorylation est le plus souvent transitoire et le groupement phosphate peut être hydrolysé par une réaction de déphosphorylation, catalysée par une phosphoprotéine-phosphatase. Les réactions de phosphorylation/déphosphorylation interviennent dans la régulation de nombreux processus cellulaires et mécanismes de signalisation (différenciation, division, prolifération, apoptose).



Cette modification est depuis longtemps connue chez les eucaryotes. En effet, Fisher et Krebs, ont démontré dès 1956 que l'activité de la glycogène phosphorylase du muscle squelettique de lapin est régulée par phosphorylation (Krebs and Fisher, 1956). Depuis, les exemples chez les organismes eucaryotes se sont multipliés et les différents rôles physiologiques de cette modification ont été clairement établis (Pawson and Scott, 2005). Chez les eucaryotes, les enzymes qui catalysent la phosphorylation, sont réunies au sein d'une seule et même grande famille sur la base de leur séquence en acides aminés et de leurs caractéristiques structurales (Hanks et al., 1988). Elles utilisent majoritairement l'ATP comme source de phosphate et phosphorylent les protéines substrats exclusivement au niveau de trois acides aminés: la sérine, la thréonine et la tyrosine.

Chez les procaryotes, la phosphorylation a été mise en évidence plus tard avec la découverte de deux systèmes qui leur sont propres : les systèmes à deux composants (Fig. 2A) et le système phosphoénolpyruvate phosphotransférase (PTS) (Fig. 2B) qui sont aujourd'hui reconnus comme les deux grands systèmes de signalisation et de régulation bactériens (Klumpp and Kriegstein, 2002 ; Beier and Gross, 2006 ; Deutscher et al., 2006).



Les systèmes à deux composants interviennent dans un mécanisme de transduction du signal largement utilisé par la plupart des bactéries pour percevoir les modifications de leur environnement et s'y adapter (Bourret et al., 1989 ; Stock et al., 2000). Ces systèmes sont classiquement constitués de deux protéines, une protéine kinase senseur (ou histidine kinase), généralement membranaire, qui en réponse à un signal extérieur s'autophosphoryle aux dépens de l'ATP sur un résidu histidyle, puis transfère ce groupement phosphate sur un résidu aspartyle d'une protéine régulatrice. Cette dernière peut alors initier la réponse cellulaire, généralement en activant la transcription de certains gènes. Les systèmes à deux composants participent ainsi à la régulation d'un grand nombre de fonctions cellulaires telles que le chimiotactisme (Bischoff and Ordal, 1991), la compétence (Weinrauch et al., 1990), la sporulation (Burbulys et al., 1991), la virulence (Leroux et al., 1987) ou l'assimilation de l'azote (Magasanik, 1988).

Le PTS (Reizer et al., 1988) est situé en amont de la glycolyse, et permet, en fonction de la source de carbone présente dans le milieu extracellulaire, une régulation efficace du taux de sucre à l'intérieur de la cellule et donc une adaptation rapide aux besoins énergétiques de la

bactérie (Postma et al., 1993). Dans ce système, une protéine réceptrice fixe le sucre et produit un signal chimiotactique intracellulaire conduisant au transfert séquentiel du groupement phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) sur un résidu histidyle ou parfois cystéyle de quatre intermédiaires protéiques pour finalement permettre la phosphorylation du sucre et sa translocation concomitantes à l'intérieur de la cellule. Il a également été montré que certains composants du PTS sont impliqués dans d'autres fonctions telles que la régulation du métabolisme du carbone (Deutscher *et al.*, 2006).

Vers la fin des années 1970, deux équipes ont démontré simultanément et indépendamment la présence de protéines phosphorylées sur des résidus séryles et thréonyles chez les bactéries *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* (Wang and Koshland, 1978 ; Manai and Cozzone, 1979). Malgré cette caractérisation, l'existence de la phosphorylation des protéines au niveau de la sérine et de la thréonine chez les procaryotes est longtemps restée un sujet de controverse. Dans un premier temps, seulement deux protéine-kinases ne présentant aucune homologie de séquence avec les protéine-kinases eucaryotes ont été caractérisées : l'isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase (IDHK/P) (Garnak and Reeves, 1979) et l'HPr kinase/phosphorylase (Deutscher and Saier, 1983). Ce n'est qu'au début des années 1990 que la première sérine/thréonine kinase de type eucaryote a été caractérisée chez une bactérie. Il s'agit de la protéine Pkn1 de la protéobactérie *Myxococcus xanthus* (Munoz-Dorado et al., 1991). Pkn1 est capable de s'autophosphoryler sur la sérine et la thréonine par transfert du groupement phosphate en position  $\gamma$  de l'ATP et est impliquée dans le développement de la bactérie (sporulation et différenciation). Depuis, la caractérisation de sérine/thréonine-kinases bactériennes s'est accélérée et il est maintenant clairement établi que de nombreuses espèces bactériennes codent pour des protéine-kinases analogues aux sérine/thréonine-kinases eucaryotes (STKP)(Kennelly, 2002 ; Alber, 2009). La ressemblance entre les protéine-kinases bactériennes et leurs homologues eucaryotes est essentiellement basée sur des caractéristiques de séquence et des caractéristiques structurales de leur domaine catalytique. En effet, ce domaine catalytique est constitué de 250 à 300 acides aminés et comprend la plupart des 11 sous-domaines de Hanks typiques des kinases eucaryotes (Hanks et al., 1988). Les motifs de Hanks sont principalement impliqués dans la liaison et l'orientation de la molécule donneuse de phosphate (ATP ou GTP), dans la liaison et l'orientation de la protéine ou du peptide substrat, ainsi que dans le transfert du phosphate  $\gamma$  de l'ATP (ou GTP) sur le résidu accepteur de la protéine substrat.

Les STKP jouent des rôles importants et variés mais encore largement inconnus dans le développement de nombreuses bactéries. En effet, chez la bactérie *M. xanthus* seulement une dizaine de protéine-kinases sont activement étudiées (Udo et al., 1995 ; Zhang, 1996 ; Hanlon et al., 1997) alors que l'analyse de son génome en prédit une centaine (Nariya and Inouye, 2005). De la même manière, le génome de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* code pour 11 protéine-kinases différentes (appelées PknA à PknL) (Av-Gay and Everett, 2000). L'activité protéine-kinase de ces enzymes a été clairement confirmée biochimiquement. Cependant, leurs rôles physiologiques restent encore largement inconnus. Il a été néanmoins démontré que certaines d'entre elles seraient impliquées dans différents processus comme la virulence, la résistance à certains antibiotiques ou encore la division cellulaire (Greenstein et al., 2005). A l'inverse, l'analyse du génome de *Streptococcus pneumoniae* n'a révélé la présence que d'une seule STKP. Elle serait impliquée dans la virulence, la compétence, la résistance aux stressés, la régulation de l'expression de certains gènes et la division cellulaire de la bactérie (Novakova et al., 2010).

Ces dernières années, les efforts de recherche se sont également concentrés sur l'identification de substrats des protéine-kinases bactériennes pour essayer de mieux comprendre leurs rôles régulateurs dans la physiologie bactérienne. Suite aux progrès réalisés en spectrométrie de masse, les phosphoprotéomes de plusieurs bactéries ont été déterminés : *Bacillus subtilis* (Macek et al., 2007), *E. coli* (Macek et al., 2008), *Lactococcus lactis* (Soufi et al., 2008), *Klebsiella pneumoniae* (Lin et al., 2009), *Pseudomonas aeruginosa* et *putida* (Ravichandran et al., 2009), *S. pneumoniae* (Sun et al., 2009), *Mycoplasma pneumoniae* (Schmidl et al., 2010) et *M. tuberculosis* (Prisic et al., 2010). Ils ont chacun permis de détecter entre 56 et 300 protéines phosphorylées au niveau de la sérine ou de la thréonine. Ces protéines phosphorylées sont notamment impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (glycolyse, cycle TCA (acides tricarboxyliques) et PTS), le métabolisme des acides nucléiques, des acides aminés et des protéines, le transfert d'électrons, la sporulation, la régulation de la division cellulaire, la mobilité, le transport ou encore la virulence.

La phosphorylation sur la tyrosine a longtemps été considérée comme l'apanage des eucaryotes. Cependant, en 1997, la caractérisation de la première tyrosine-kinase bactérienne, la protéine Ptk d'*Acinetobacter johnsonii* (Grangeasse et al., 1997), a mis un terme à ce dogme. L'identification de cette tyrosine-kinase bactérienne a été difficile car elle ne présente aucune similarité avec les kinases eucaryotes et n'était par conséquent pas identifiable par les outils de bioinformatique. Par la suite, de nombreuses protéines

homologues à la protéine Ptk ont pu être identifiées chez les bactéries et ont été regroupées au sein d'une même famille appelée BY-kinases pour Bacterial tYrosine-kinases. Cependant, même si l'importance de ces enzymes dans certains processus physiologiques, comme la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires, a été clairement démontrée, leur rôle et leur mécanisme catalytique restent encore peu compris. Les phosphoprotéomes cités précédemment ont également mis en évidence plusieurs protéines phosphorylées sur la tyrosine. La quantité, désormais conséquente, de protéines bactériennes connues comme étant phosphorylées sur des résidus séryles, thréonyles et tyrosyles permet d'envisager l'implication de la phosphorylation dans la régulation d'un très grand nombre de processus biologiques chez les bactéries et contribue à montrer le caractère universel de la phosphorylation en tant que processus général et fondamental de régulation aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes.

Au laboratoire, nous étudions la phosphorylation des protéines bactériennes sur la tyrosine et plus particulièrement la famille des BY-kinases. Afin de mieux comprendre le rôle de la phosphorylation sur la tyrosine, nous nous sommes intéressés, dans la première partie de ce travail, à l'influence de la phosphorylation de la protéine Ugd d'*E. coli* K12, par les BY-kinases Wzc et Etk, dans la production d'acide colanique et la résistance à la polymyxine. Nous avons ensuite, dans la deuxième et la troisième partie de ce travail, réalisé une analyse structure-fonction des BY-kinases Cap5A1<sub>C</sub>/Cap5B2 de *Staphylococcus aureus* et Wzc d'*E. coli* K12 à partir de leurs structures cristallographiques.

Pour introduire ce travail, nous présenterons, dans la première partie de l'exposé bibliographique, un bref historique de la découverte de la phosphorylation des protéines bactériennes sur la tyrosine qui sera suivi d'une description de la famille des BY-kinases. Nous détaillerons, en particulier, les connaissances actuelles concernant les BY-kinases étudiées au cours de ce travail, à savoir les protéines Wzc et Etk d'*E. coli* K12 et les protéines Cap5A1/Cap5B2 de *S. aureus*. Puis, nous aborderons l'identification des protéines endogènes substrats des BY-kinases et la caractérisation de processus biologiques impliquant ces enzymes. Dans la seconde partie de l'exposé bibliographique, nous décrirons les voies de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires et présenterons l'état des connaissances concernant le rôle de la BY-kinase Wzc dans la production et l'export de l'acide colanique, l'exopolysaccharide d'*E. coli* K12. Enfin, nous terminerons par une présentation des différents mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques cationiques de type polymyxine et préciserons le rôle de la BY-kinase Etk d'*E. coli* K12 dans ce processus.

**EXPOSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# I Phosphorylation des protéines bactériennes sur la tyrosine

L'existence de la phosphorylation sur la tyrosine a été décrite pour la première fois chez une bactérie en 1986, lorsque la présence de résidus phosphorylés au niveau de la tyrosine a été détectée dans des hydrolysats totaux de protéines d'*E. coli* (Cortay et al., 1986). L'existence de tyrosine-kinases a ensuite été envisagée chez plusieurs autres bactéries comme *Rhodospirillum rubrum* (Vallejos et al., 1985), *Clostridium thermosulfuricum* (Londesborough, 1986), *P. aeruginosa* (Kelly-Wintenberg et al., 1993), les streptomycètes (Waters et al., 1994) et les mycobactéries (Ray et al., 1994). Ainsi, dans le milieu des années 1990, la présence de phosphotyrosines était détectée chez 22 espèces bactériennes différentes (Cozzone, 1997). Cependant, l'existence de la phosphorylation des protéines bactériennes sur la tyrosine a été contestée car les travaux réalisés ne permettaient pas d'identifier les tyrosine-kinases impliquées, les phosphotyrosine-protéines, ou encore de caractériser précisément le rôle de cette modification au sein d'un processus cellulaire. Il était notamment proposé que les phosphotyrosines détectées dans les hydrolysats cellulaires proviennent non pas d'une activité kinase mais d'une réaction de nucléotidylation de la tyrosine (Foster et al., 1989). Il était alors évident que la caractérisation biochimique et génétique d'une activité tyrosine-kinase bactérienne était nécessaire pour poser les bases de l'étude du rôle de cette modification chez les bactéries.

## I.1 Les tyrosine-kinases bactériennes

### I.1.1 Caractérisation de la première tyrosine-kinase bactérienne : la protéine Ptk d'*A. johnsonii*

Chez la bactérie *A. johnsonii*, une proportion exceptionnellement élevée de phosphotyrosine avait été observée dans des hydrolysats totaux de protéines (Dadssi and Cozzone, 1990). En effet, *in vivo*, la proportion de phosphotyrosine, parmi l'ensemble des phosphoaminoacides présents dans les protéines de cette bactérie, est de 35% et atteint même 95% lorsque la phosphorylation est réalisée *in vitro*. Parmi les différentes protéines phosphorylées chez cette bactérie, une protéine de 82 kDa a été identifiée comme phosphorylée sur la tyrosine aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Il a alors été démontré que cette

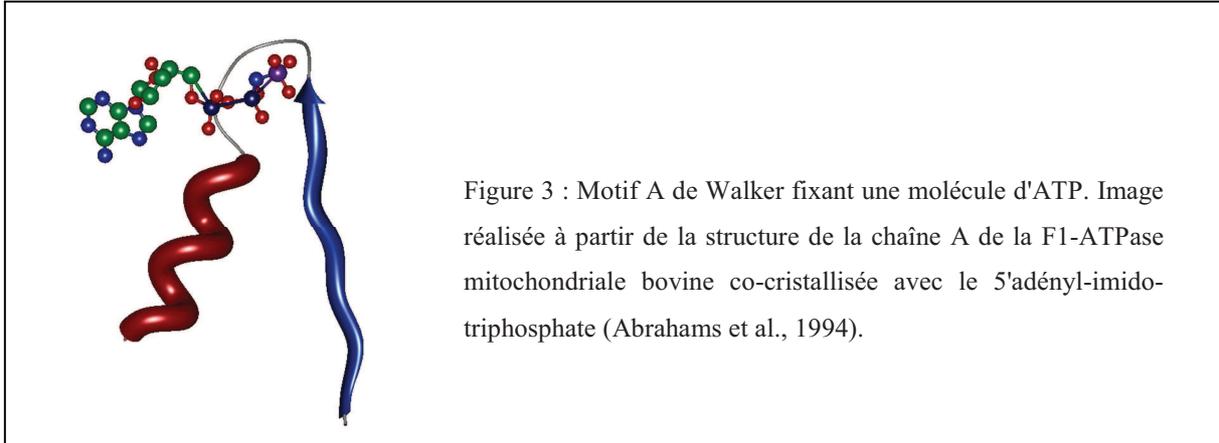
protéine purifiée était capable de s'autophosphoryler *in vitro* et pouvait donc être qualifiée de tyrosine-autokinase (Duclos et al., 1996). Cette protéine, appelée Ptk pour « Prokaryotic Tyrosine-Kinase » constitue le premier exemple de protéine-tyrosine kinase bactérienne. Le gène codant pour cette protéine a ensuite été caractérisé et une étude biochimique de la protéine a été réalisée (Grangeasse et al., 1997).

La protéine Ptk est localisée dans la membrane interne de la cellule bactérienne et est capable de catalyser sa propre phosphorylation aux dépens de l'ATP sur au moins cinq résidus tyrosyles. Il a également été démontré que la protéine Ptk est incapable de phosphoryler certains substrats classiques des tyrosine-kinases eucaryotes, tels que l'angiotensine II ou le polymère Glu<sup>80</sup>Tyr<sup>20</sup>. De plus, cette enzyme n'est pas sensible aux inhibiteurs classiques des tyrosine-kinases eucaryotes comme la génistéine ou la quercétine (Grangeasse et al., 1999). Ces observations suggéraient déjà que cette tyrosine-autokinase bactérienne présenterait des caractéristiques particulières la distinguant des tyrosine-kinases eucaryotes.

L'analyse de la séquence en aminoacides de la protéine Ptk a révélé la présence de deux séquences particulières généralement retrouvées dans les protéines fixant les nucléotides :

- la séquence G<sup>542</sup>PAPEVGKS<sup>550</sup> qui ressemble au motif A de Walker, aussi appelé P-loop, dont la séquence consensus est [A/G]-X<sub>4</sub>-G-K-[S/T]. Dans le cas des protéines à P-loop, il a été montré que cette séquence consensus était localisée entre une structure en feuillet  $\beta$  et une courte hélice  $\alpha$ . Ce motif, par l'intermédiaire de la lysine conservée, forme une boucle qui s'enroule autour des groupements phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléotide tandis que la sérine ou la thréonine interagit avec le cation divalent (magnésium) (Fig. 3).

- la séquence V<sup>618</sup>IID<sup>651</sup> similaire à la séquence consensus h-h-h-D du motif B de Walker (h indique un résidu hydrophobe). L'acide aspartique conservé joue un rôle dans la liaison avec le cation divalent (magnésium) par l'intermédiaire de molécules d'eau. Cette interaction est essentielle pour l'hydrolyse de la liaison  $\beta$ - $\gamma$  de l'ATP. Cet acide aspartique est toujours présent dans l'extrémité C-terminale d'un feuillet  $\beta$ .



Différentes expériences ont permis de démontrer que ces deux motifs constituent le site catalytique de la protéine Ptk (Doublet et al., 1999) et qu'en particulier la lysine 549 et la sérine 550 du Walker A ainsi que l'acide aspartique 651 du Walker B sont indispensables à la fixation de l'ATP et à la réaction de phosphotransfert. La protéine Ptk possède donc un mécanisme original de phosphorylation utilisant les motifs A et B de Walker, ce qui la différencie des tyrosine-kinases eucaryotes.

### I.1.2 Emergence d'une nouvelle famille de protéines : les BY-kinases

Depuis la découverte de Ptk, l'analyse des différents génomes accessibles (NCBI, TIGR,...) a permis de montrer que des gènes homologues à *ptk*, codant pour des tyrosine-autokinases étaient retrouvés chez différentes bactéries mais pas chez les eucaryotes. Parmi les plus étudiées on retrouve *Wzc<sub>ca</sub>* chez *E. coli* K12, *Wzc<sub>cps</sub>* chez *E. coli* K30, *Etk* chez *E. coli* K12 et K30, *ExoP* chez *Sinorhizobium meliloti*, *Yco6* chez *K. pneumoniae*, *Wzc<sub>émulsane</sub>* chez *Acinetobacter lwoffii* RAG-1, *CpsD* chez *S. pneumoniae*, *Cap5B* chez *S. aureus* et *PtkA* (ou *YwqD*) chez *B. subtilis*. Ces protéines ont été regroupées au sein d'une nouvelle famille, les BY-kinases pour Bacterial tYrosine-kinases, qui rassemble les protéines bactériennes possédant une activité tyrosine kinase utilisant les motifs A et B de Walker ainsi que certaines caractéristiques que nous allons maintenant détailler (Grangeasse et al., 2007).

Les BY-kinases sont retrouvées chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif (protéobactéries) et à Gram-positif (firmicutes). Cependant, chez les firmicutes, les BY-kinases ne sont pas codées par un seul gène comme chez les protéobactéries, mais par deux gènes adjacents. Le premier gène code pour une protéine membranaire et le second pour une

protéine cytoplasmique qui porte l'activité kinase (Grangeasse et al., 2007) (Fig. 4). Cette organisation suggère que les deux protéines, membranaire et cytoplasmique, des firmicutes interagissent entre elles, mimant ainsi la situation observée chez les protéobactéries. La protéine membranaire est en fait une protéine activatrice car en son absence la protéine cytoplasmique est inactive (Morona et al., 2000a ; Soulat et al., 2006) ou significativement moins active (Mijakovic et al., 2003). Il a été montré que l'interaction de la protéine cytoplasmique avec le peptide cytoplasmique C-terminal de la protéine membranaire était suffisante pour déclencher l'activité kinase de la protéine cytoplasmique (Soulat et al., 2006). De manière analogue, il a été mis en évidence que le domaine cytoplasmique de la plupart des BY-kinases des protéobactéries était capable de développer une activité kinase indépendante du domaine N-terminal périplasmique (Grangeasse et al., 2002). Il est intéressant de noter que chez la protéobactérie *Sphingomonas elodea*, la protéine GelE associée à la protéine GelC présente une activité tyrosine-kinase comparable à celle retrouvée chez les firmicutes (Moreira et al., 2004). L'analyse des génomes disponibles dans les banques de données permet également d'envisager l'existence de BY-kinases chez les actinobactéries sous la forme d'une seule protéine comme chez les protéobactéries. Néanmoins, la caractérisation biochimique d'une BY-kinase n'a jamais été réalisée chez une actinobactérie. Les boucles extracellulaires des BY-kinases semblent structurellement comparables, même si celle des BY-kinases des protéobactéries sont de taille plus grande (Cuthbertson et al., 2009). Il est proposé que ce domaine extracellulaire puisse servir de senseur et contrôler l'activité kinase du domaine cytoplasmique. Cependant, à ce jour, aucun argument convaincant n'a été apporté pour valider cette hypothèse. Il a néanmoins été mis en évidence un motif riche en proline précédant la deuxième hélice transmembranaire qui semble avoir une fonction importante dans la synthèse des polysaccharides (Becker and Puhler, 1998 ; Morona et al., 2000b ; Obadia et al., 2007).

En plus des motifs A et B de Walker, les BY-kinases possèdent un motif particulier appelé « tyrosine cluster », situé en position C-terminale et contenant de 3 à 7 tyrosines (Fig. 4). A partir de là, une analyse bioinformatique (Jadeau et al., 2008) a permis de définir une signature caractéristique de la famille des BY-kinases : un Walker A : G-K-[S/T], un premier Walker B : [ILVFM](3)-D-X-D-X-R précédemment appelé Walker A' ou encore motif DXD, un second Walker B : [ILVFM](3)-D-X-X-P, et le tyrosine cluster Y-X(0,5)-Y. Cette analyse a permis d'identifier 640 BY-kinases potentielles, suggérant ainsi une très grande distribution de ces enzymes chez les bactéries.

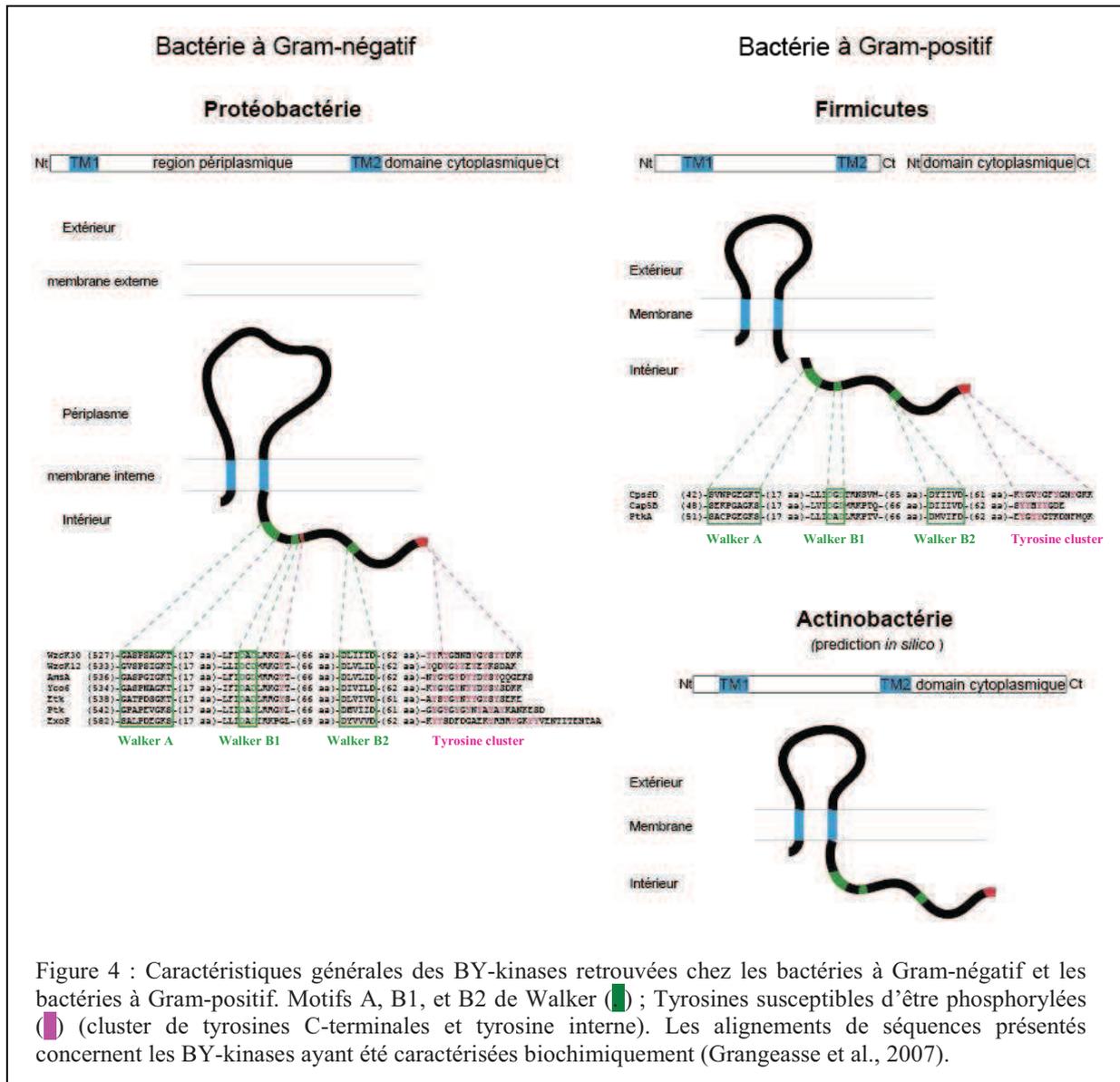


Figure 4 : Caractéristiques générales des BY-kinases retrouvées chez les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif. Motifs A, B1, et B2 de Walker (■) ; Tyrosines susceptibles d’être phosphorylées (■) (cluster de tyrosines C-terminales et tyrosine interne). Les alignements de séquences présentés concernent les BY-kinases ayant été caractérisées biochimiquement (Grangeasse et al., 2007).

Les BY-kinases sont capables de s’autophosphoryler en présence d’ATP sur plusieurs tyrosines présentes dans leur tyrosine cluster. Chez les firmicutes, cette autophosphorylation se déroule en une seule étape selon un mécanisme d’interphosphorylation ou d’intraphosphorylation (Bender and Yother, 2001 ; Mijakovic et al., 2003). En ce qui concerne les BY-kinases des protéobactéries, le mécanisme de phosphorylation semble varier d’une souche à l’autre. En effet, de nombreuses BY-kinases chez les protéobactéries possèdent une tyrosine située quatre acides aminés après le premier Walker B, appelée tyrosine interne. Dans certains cas, il a été montré qu’une première étape de phosphorylation intramoléculaire de cette tyrosine interne était nécessaire à l’activation de la protéine et à la phosphorylation dans une deuxième étape des tyrosines du tyrosine cluster d’une autre copie de la protéine selon un processus de phosphorylation intermoléculaire (Grangeasse et al.,

2002). En revanche, dans d'autres cas la tyrosine interne ne semble pas être phosphorylée et ne semble pas influencer la phosphorylation des tyrosines du tyrosine cluster (Paiment et al., 2002). L'autophosphorylation du tyrosine cluster se ferait alors en une seule étape comme chez les firmicutes. Dans le cas particulier d'ExoP de *S. meliloti* qui ne possède pas de tyrosine interne, une tyrosine localisée dans la partie périplasmique de la protéine a été indiquée comme étant phosphorylée, mais le rôle de la phosphorylation de cette tyrosine n'a pas été étudié (Niemeyer and Becker, 2001). Il semble donc que certaines différences dans l'activation et/ou le mécanisme de phosphorylation existent entre les BY-kinases des protéobactéries et des firmicutes.

Les BY-kinases sont généralement codées par des gènes retrouvés au niveau d'opérons impliqués dans la synthèse et le transport de polysaccharides extracellulaires. Certaines d'entre elles étaient déjà étudiées indépendamment de leur fonction kinase, et connues en tant que Polysaccharide Co-Polymerase (PCP) appartenant à la famille des PCP2a et PCP2b. Les PCP sont indispensables à l'export des polymères polysaccharidiques mais leur fonction exacte restait incertaine. Il était proposé qu'elles jouent un rôle structurant du complexe d'assemblage et d'export des polysaccharides. La caractérisation de leur fonction autokinase a permis de démontrer que leur phosphorylation sur la tyrosine était un élément régulateur de la biosynthèse des polysaccharides (voir section II.3). Cette observation représente le premier rôle décrit des BY-kinases et reste à ce jour l'un des plus étudiés.

Les BY-kinases sont également capables de phosphoryler des protéines endogènes et participent ainsi à la régulation de divers processus physiologiques tels que la réponse aux stresses, le métabolisme de l'ADN ou le contrôle du cycle cellulaire (voir section I.2).

Nous allons maintenant détailler l'ensemble des connaissances actuelles concernant les BY-kinases étudiées au cours de ce travail, à savoir les protéines Wzc et Etk d'*E. coli* et les protéines Cap5A/Cap5B de *S. aureus*.

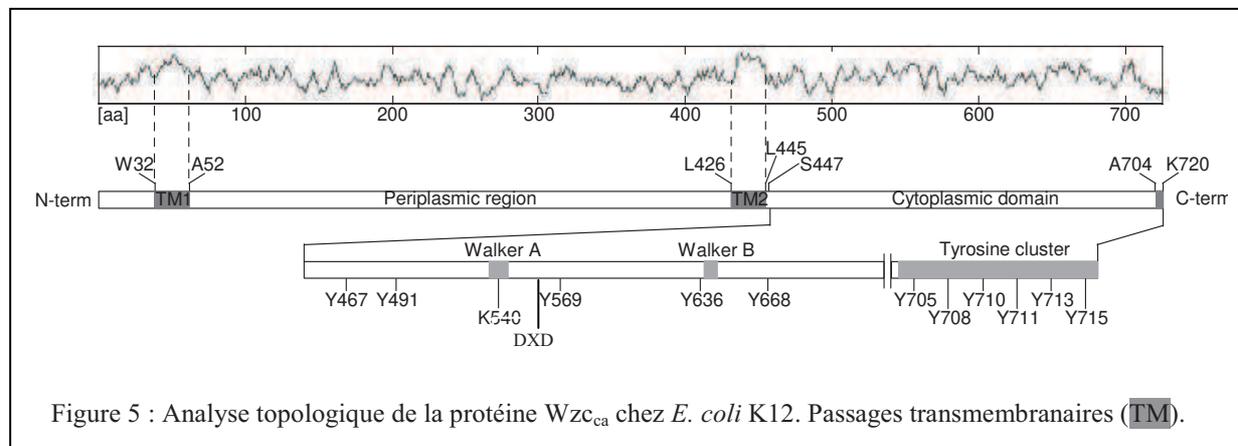
#### **I.1.2.1 La BY-kinase Wzc d'*E. coli***

L'une des protéines homologues à la protéine Ptk, la protéine Wzc d'*E. coli*, a été particulièrement bien étudiée chez deux sérotypes : *E. coli* K12 et *E. coli* K30, produisant respectivement de l'acide colanique et un polysaccharide capsulaire. L'analyse de cette

protéine a fortement contribué à la définition des caractéristiques des BY-kinases et à la caractérisation de leur rôle dans la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires.

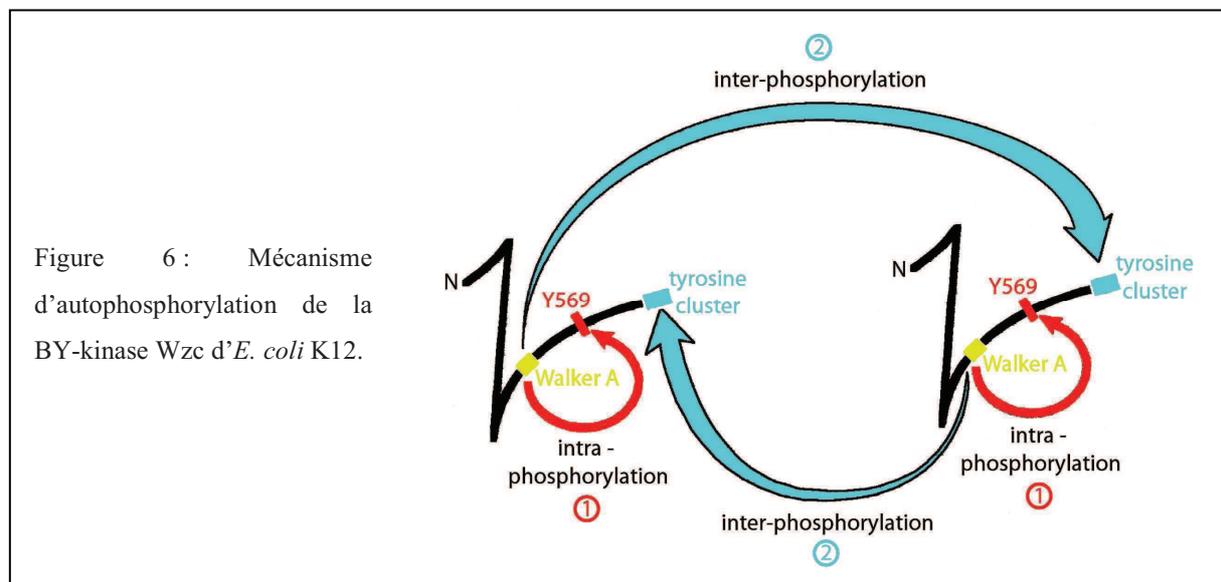
La protéine  $Wzc_{ca}$  d' *E. coli* K12 est localisée dans la membrane interne de la bactérie. L'analyse du profil hydrophatique de la séquence de  $Wzc_{ca}$ , par la méthode de Kyte et Doolittle (1982), a suggéré la présence de 2 hélices transmembranaires pouvant délimiter trois domaines distincts (Fig. 5). La topologie membranaire de la protéine  $Wzc_{ca}$  a été confirmée par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase et phosphatase alcaline de protéines chimériques résultant de fusions traductionnelles de différents fragments du gène *wzc* avec soit le gène *lacZ*, soit le gène *phoA* (Doublet et al., 2002). Ainsi, la protéine  $Wzc_{ca}$  est constituée de :

- un premier domaine cytoplasmique correspondant à la partie N-terminale de la protéine. Il est délimité par une première hélice  $\alpha$  transmembranaire TM1 et s'étend de la thréonine 2 à l'arginine 31.
- un domaine périplasmique s'étendant de la thréonine 53 à la glycine 425, délimité par les deux hélices  $\alpha$  transmembranaires TM1 (Trp<sup>32</sup> à Ala<sup>52</sup>) et TM2 (Leu<sup>426</sup> à Leu<sup>445</sup>).
- un deuxième domaine cytoplasmique correspondant à la partie C-terminale de la protéine s'étendant de l'arginine 446 à la lysine 720 (Fig. 5).



Les protéines  $Wzc_{ca}$  d'*E. coli* K12 et  $Wzc_{cps}$  d'*E. coli* K30 possèdent deux motifs présentant une homologie avec les motifs A et B de Walker. En particulier, les séquences  $G^{533}VSPSIGKT^{541}$  de  $Wzc_{ca}$  et  $G^{533}ASPSAGKT^{541}$  de  $Wzc_{cps}$  sont caractéristiques du motif A de Walker et il a été démontré, dans les deux cas, que la lysine en position 540 est un élément indispensable pour l'activité kinase intrinsèque de la protéine (Wugeditsch et al., 2001 ; Grangeasse et al., 2002).

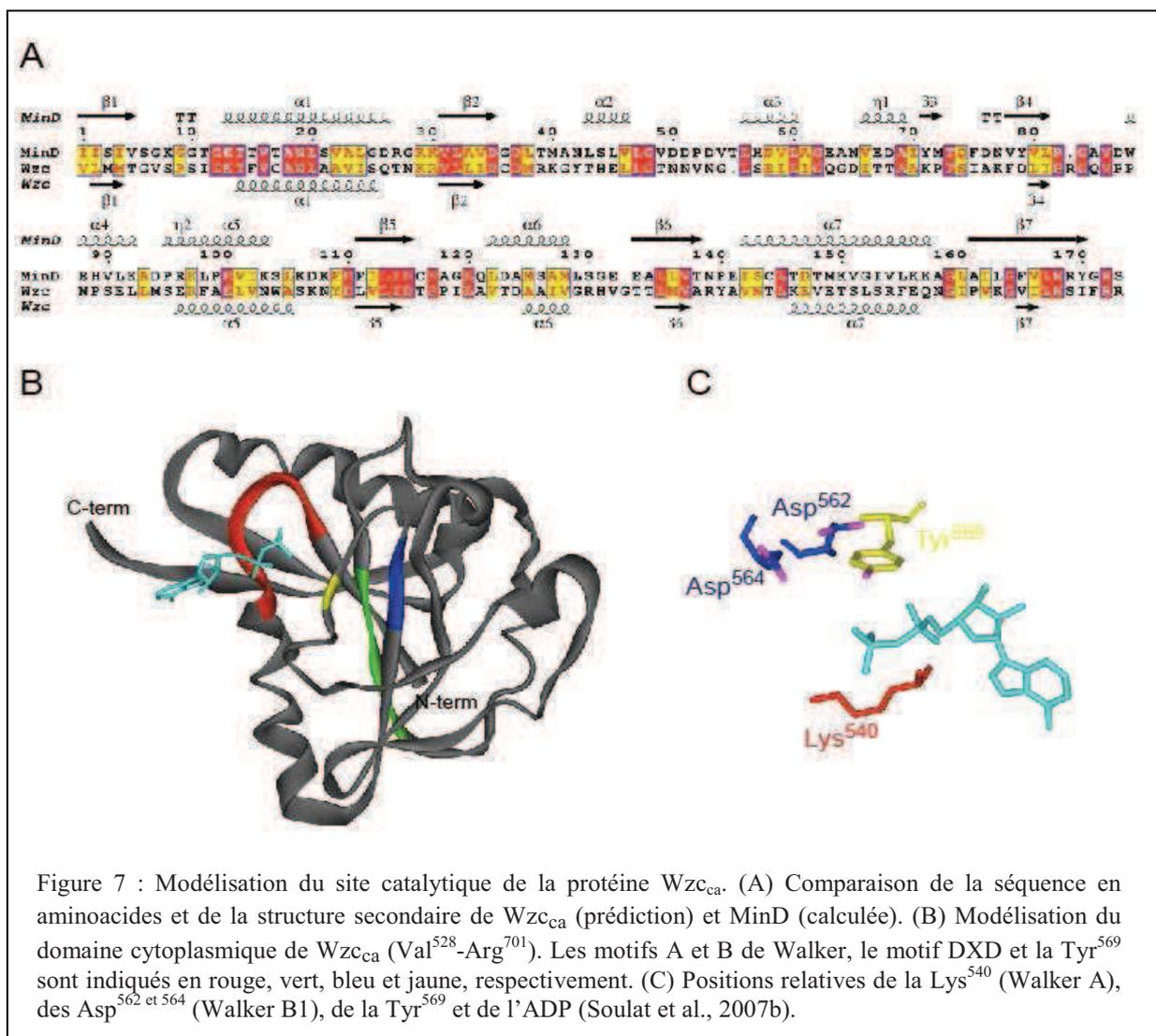
Il a, par ailleurs, été démontré que la protéine  $Wzc_{ca}$  est capable de s'autophosphoryler aux dépens de l'ATP (Vincent et al., 1999) sur 6 résidus tyrosyles : la tyrosine interne  $Tyr^{569}$  et 5 tyrosines du tyrosine cluster ( $Tyr^{708}$ ,  $Tyr^{710}$ ,  $Tyr^{711}$ ,  $Tyr^{713}$ , et  $Tyr^{715}$ ) (Grangeasse et al., 2002). Le mécanisme de phosphorylation de la protéine  $Wzc_{ca}$  a été étudié *in vitro*. Il a d'abord été observé que le domaine cytoplasmique C-terminal de la protéine ( $Ser^{447}$ - $Lys^{720}$ , noté  $Wzc_{cyto}$ ) était capable de développer une activité kinase indépendante du domaine N-terminal membranaire. Il a ensuite été démontré que la  $Tyr^{569}$  s'autophosphorylait selon un mécanisme intramoléculaire tandis que les tyrosines du tyrosine cluster ne pouvaient être phosphorylées que par un mécanisme intermoléculaire. Il a également été observé que l'ensemble des sites de phosphorylation n'étaient pas équivalents, étant donné que le signal de phosphorylation de  $Wzc_{cyto}$  est 45 fois supérieur au signal de phosphorylation du même fragment muté sur la  $Tyr^{569}$  et 700 fois supérieur au signal de phosphorylation du même fragment dépourvu du tyrosine cluster. Il a donc été envisagé que la phosphorylation de  $Wzc_{ca}$  s'opère en deux étapes distinctes. Dans un premier temps, la  $Tyr^{569}$  devrait s'autophosphoryler par un processus intramoléculaire. Cette autophosphorylation générerait une augmentation importante de l'activité kinase de la protéine  $Wzc_{ca}$  permettant la phosphorylation des 5 tyrosines du tyrosine cluster d'une autre protéine  $Wzc_{ca}$  selon un processus intermoléculaire (Grangeasse et al., 2002) (Fig. 6).



L'étude du mécanisme de phosphorylation de  $Wzc_{cps}$  a conduit à des résultats différents. Tout d'abord, il semble que dans le cas de  $Wzc_{cps}$  le domaine N-terminal soit indispensable à l'activité du domaine cytoplasmique C-terminal ( $Lys^{487}$ - $Lys^{721}$ ) (Wugeditsch et al., 2001). Cette différence peut trouver une explication dans le fait que le domaine

cytoplasmique de  $Wzc_{cps}$  étudié est beaucoup plus court que celui de  $Wzc_{ca}$  et ne correspond pas à l'intégralité du domaine cytoplasmique de la protéine. Une autre différence majeure entre  $Wzc_{ca}$  et  $Wzc_{cps}$  provient du fait que la mutation de la Tyr<sup>569</sup> sur  $Wzc_{cps}$  n'affecte que très peu la phosphorylation globale de la protéine.

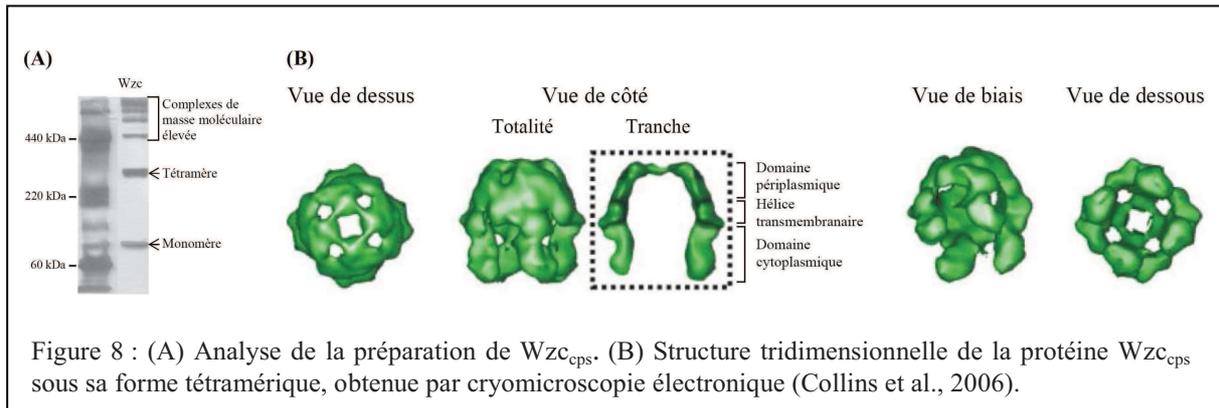
Le domaine catalytique de la protéine  $Wzc_{ca}$ , et plus généralement des BY-kinases, présente également une certaine ressemblance avec la protéine MinD, qui possède une activité ATPase utilisant les domaines A et B de Walker (Hayashi et al., 2001). Même si ces deux protéines possèdent un faible taux d'identité (21%), la comparaison de la structure secondaire prédite du domaine catalytique de la protéine  $Wzc_{ca}$  et celle calculée de la protéine MinD permet de suggérer qu'elles posséderaient un repliement  $\alpha/\beta$  comparable (Fig. 7). Un modèle de la structure tridimensionnelle de la protéine  $Wzc_{ca}$  a été construit à partir de la structure cristallographique de MinD.



Ce modèle a mis en évidence la présence de deux acides aspartiques (Asp<sup>562</sup> et Asp<sup>564</sup>) chez Wzc<sub>ca</sub> susceptibles d'intervenir dans son mécanisme catalytique. Ces deux acides aspartiques font partie du premier motif de Walker B et il a été montré qu'ils étaient effectivement importants pour l'autophosphorylation de la protéine (Soulat et al., 2007b). Comme dans le cas de MinD, ces deux acides aspartiques pourraient être impliqués dans la coordination du cation Mg<sup>2+</sup> ou du groupement phosphate β de l'ATP, ou bien dans l'hydrolyse et le phosphotransfert du phosphate γ de l'ATP (Hayashi et al., 2001). Il a également été mesuré que l'intraphosphorylation de Wzc sur la Tyr<sup>569</sup> ne modifiait pas l'affinité de la protéine pour l'ATP. Il a donc été suggéré que l'intraphosphorylation sur la Tyr<sup>569</sup> pourrait plutôt induire un réarrangement local de certains acides aminés environnant la molécule d'ATP dans le site catalytique de Wzc<sub>ca</sub>, tels que les deux acides aspartiques Asp<sup>562</sup> et Asp<sup>564</sup>, de façon à rendre plus efficace l'hydrolyse de l'ATP et l'interphosphorylation.

Des expériences de pontage chimique *in vivo* ont mis en évidence que la protéine Wzc<sub>ca</sub> était capable de s'oligomériser pour former des dimères, des trimères et des complexes de taille supérieure à 400 kDa (probablement des hexamères). Il a été démontré que cette oligomérisation était dépendante du domaine C-terminal. Il a également été observé que l'état de phosphorylation de la protéine n'influçait pas son oligomérisation (Doublet et al., 2002).

Une étude par cryomicroscopie électronique de Wzc<sub>cps</sub> a permis de proposer une structure tridimensionnelle de la protéine à une résolution de 14 Å. Dans cette structure, Wzc<sub>cps</sub> apparaît organisée sous forme de tétramère (Collins et al., 2006). Vu de côté, le tétramère a l'apparence d'une molaire arrachée et présente deux parties distinctes : d'une part la partie supérieure qui correspond au domaine extracellulaire de la protéine qui forme une couronne de densité continue et, d'autre part, la partie inférieure qui correspond à la partie cytoplasmique de la protéine et qui est divisée en quatre zones de densités distinctes. Dans l'analyse électrophorétique de la préparation de Wzc<sub>cps</sub>, on peut néanmoins observer d'autres états d'oligomérisation dont un au dessus de 440 kDa qui pourrait correspondre à l'hexamère déjà observé chez *E. coli* K12 (Fig. 8).



### 1.1.2.2 La BY-kinase Etk d'*E. coli*

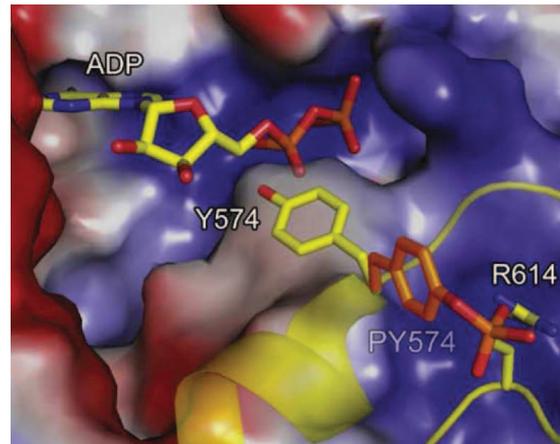
Chez *E. coli*, il existe une seconde BY-kinase, la protéine Etk, également appelée YccC. Il existe une grande similarité de séquence entre les protéines Etk et Wzc (51% d'identité stricte et 33% de similarité). Le gène *etk* (*yccC*) est localisé dans un opéron de synthèse de capsule de groupe 4 (G4C) (Peleg et al., 2005) et code pour une protéine membranaire. Certains résultats suggèrent que cette protéine n'est exprimée que dans les souches pathogènes d'*E. coli* (Ilan et al., 1999). Dans le cas d'*E. coli* K12, il semble que l'opéron *G4C* ne soit pas exprimé du fait de la présence d'une séquence d'insertion IS1 dans sa région promotrice (Peleg et al., 2005).

Récemment, la structure cristallographique du domaine C-terminal cytoplasmique de la protéine Etk (R451-E726) d'*E. coli* K12 a été obtenue à une résolution de 2,5 Å (Lee, 2008). Des analyses par spectrométrie de masse ont indiqué qu'Etk était phosphorylée au niveau de 8 résidus tyrosyles : les sept tyrosines du tyrosine cluster et la Tyr<sup>574</sup>. Ces résultats, conjugués à l'analyse de la structure, ont permis de proposer un mécanisme d'activation de la protéine Etk. Dans la structure, la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> non phosphorylée pointe directement dans le site catalytique d'Etk, empêchant la fixation du magnésium par les acides aspartiques 567, 569 et 647. Il semblerait donc, que comme dans le cas de  $Wzc_{ca}$ , la Tyr<sup>574</sup> (équivalent de la Tyr<sup>569</sup>) soit impliquée dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. Il a été proposé que la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup>, une fois phosphorylée, subisse une rotation sous l'effet d'une attraction électrostatique d'un résidu arginine (Arg<sup>614</sup>) conservé chez les protéobactéries, et libère ainsi le site catalytique (Fig. 9). Cependant la structure cristallographique montrant la Tyr<sup>574</sup> phosphorylée associée à l'Arg<sup>614</sup> n'a jamais été obtenue. En revanche, cette proposition est soutenue par le fait que les mutations de la Tyr<sup>574</sup> en

alanine et en glycine, qui permettent de s'affranchir de la gêne stérique due à la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup>, conduisent à l'obtention de protéines présentant respectivement 98% et 87% de l'activité kinase de la protéine sauvage. De même, la mutation Y574E qui mime un état phosphorylé de la protéine permet d'obtenir une protéine active. Au contraire, une réduction importante de l'activité kinase est observée pour les protéines portant les mutations de la Tyr<sup>574</sup> en phénylalanine et en asparagine, proscrivant l'interaction possible avec l'Arg<sup>614</sup> (12% et 27% respectivement). De la même manière, la protéine portant la mutation R614A, éliminant l'interaction avec P-Y574, présente une activité considérablement réduite (15%). Le mécanisme d'activation d'Etk semble donc dépendre de la rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> hors du site catalytique. Chez *S. meliloti*, la BY-kinase ExoP ne possède pas d'équivalent de la Tyr<sup>574</sup>; cependant, il est intéressant de noter qu'à la place se trouve un résidu glycine qui, selon le modèle d'activation énoncé ci-dessus, résulterait en une activation constitutive de la kinase. De la même manière, le résidu Arg<sup>614</sup> généralement conservé chez les BY-kinases des protéobactéries est également absent sur ExoP (Ala) (Lee, 2009).

Des simulations de dynamique moléculaire réalisées à partir de la structure d'Etk (Lu, 2009) soutiennent la rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> phosphorylée vers l'Arg<sup>614</sup>. Ces analyses ont également permis de montrer l'importance d'un autre résidu dans le mécanisme catalytique d'Etk. En effet, une simulation sur 10 ns a montré que la rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> phosphorylée se déroulait en deux étapes. Dans un premier temps, la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> phosphorylée tourne dans le sens des aiguilles d'une montre pour s'associer avec le résidu Arg<sup>572</sup> proche du site catalytique, puis dans un deuxième temps, cette liaison est rompue et la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> reprend sa rotation dans le sens des aiguilles d'une montre pour aller interagir avec le résidu Arg<sup>614</sup> plus éloigné du site catalytique, et est maintenue dans cette position jusqu'à la fin de la simulation (Fig. 9). Plus précisément, il a été proposé toujours par simulation de dynamique moléculaire, que le résidu Arg<sup>572</sup> régulerait négativement l'activation d'Etk en ralentissant la rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> vers l'Arg<sup>614</sup>. Ce résultat a été confirmé expérimentalement par des tests d'activité kinase indiquant que la protéine Etk R572A était 25 fois plus active que la protéine sauvage.

Figure 9 : Proposition du mécanisme d'activation de la BY-kinase Etk par rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> phosphorylée vers l'Arg<sup>614</sup> pour libérer le site catalytique (Lee and Jia, 2009).



La structure cristallographique d'Etk a également permis de mettre en évidence une boucle flexible chargée positivement (Lys<sup>478</sup>-Ile<sup>498</sup>), contenant 9 résidus arginines et lysines sur un total de 20 résidus. Ce motif, conservé chez les BY-kinases des protéobactéries, a été appelé domaine RK. En plaçant la structure cristallographique de quatre monomères d'Etk dans la structure tétramérique de Wzc obtenue par cryomicroscopie électronique (Collins et al., 2006), les auteurs se sont aperçus que le domaine RK d'un monomère était à proximité du tyrosine cluster d'un monomère voisin (Fig. 10). Ils ont alors formulé l'hypothèse que le tyrosine cluster phosphorylé pourrait interagir avec le domaine RK d'une molécule adjacente pour stabiliser la conformation tétramérique. Cependant, le rôle de ce domaine RK n'a pas été étudié de façon plus approfondie.

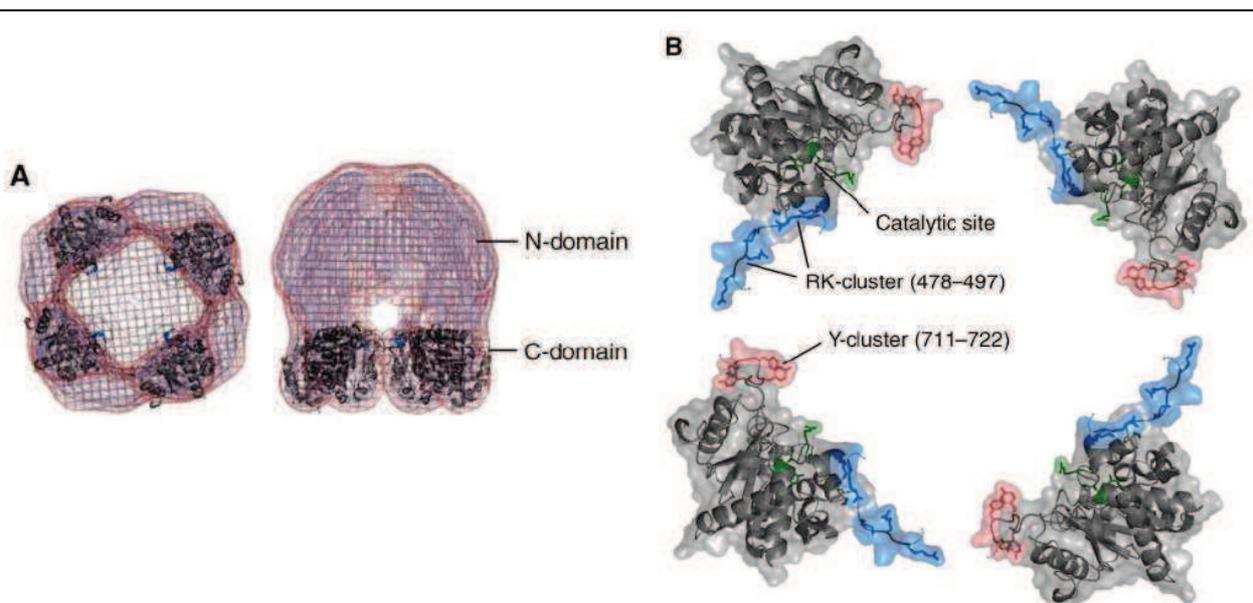


Figure 10 : Structure cristallographique de la BY-kinase Etk d'*E. coli* superposée à la structure cryomicroscopique de Wzc<sub>cps</sub> (Lee et al., 2008.) (A) Le domaine kinase d'Etk est positionné dans la structure tétramérique de Wzc<sub>cps</sub>. (B) Vue de dessous : le domaine RK d'une sous-unité pointe vers le tyrosine cluster de la sous-unité voisine.

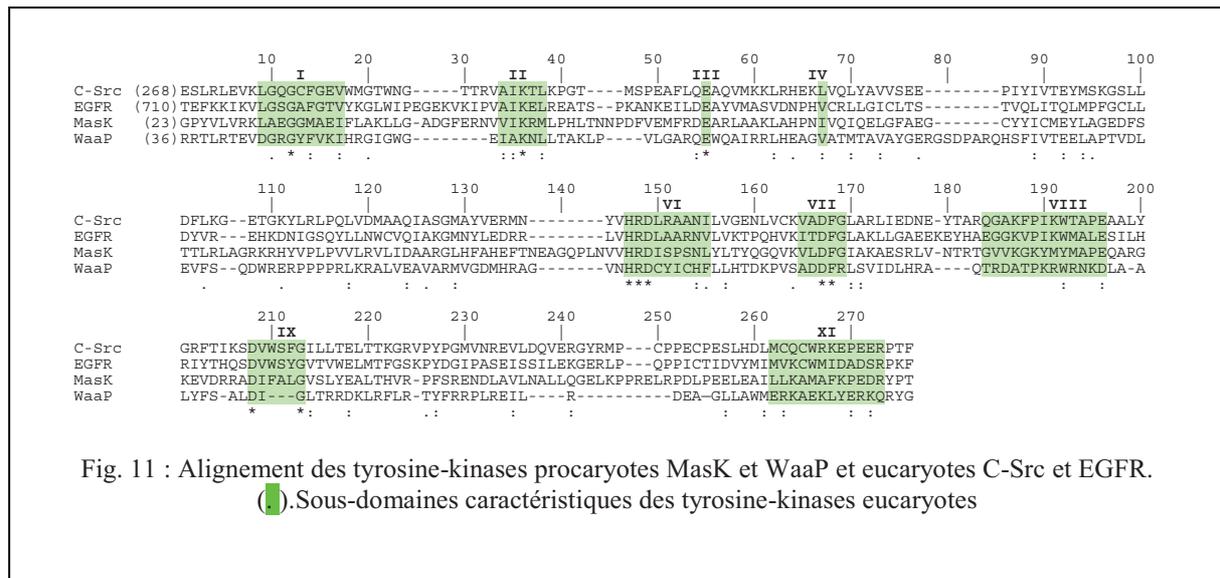
### I.1.2.3 La BY-kinase Cap5B2 chez *S. aureus*

L'analyse du génome de *S. aureus* a mis en évidence la présence de deux couples de gènes codant pour des protéines semblant appartenir à la famille des BY-kinases : *cap5A1/cap5B1* (noté par la suite A1/B1) et *cap5A2/cap5B2* (noté par la suite A2/B2), codant chacun pour une protéine membranaire homologue à la partie N-terminale des BY-kinases des protéobactéries, Cap5A1 (notée par la suite A1) ou Cap5A2 (notée par la suite A2), et une protéine cytoplasmique portant les motifs A et B de Walker, Cap5B1 (notée par la suite B1) ou Cap5B2 (notée par la suite B2). Le couple A1/B1 est localisé dans l'opéron *cap* contrôlant la biosynthèse de la capsule chez *S. aureus* tandis que le couple A2/B2 est situé ailleurs dans le génome.

La protéine B2 possède une activité tyrosine kinase *in vitro* en présence de chacune des deux protéines activatrices A1 et A2. En revanche, de façon surprenante, l'activité kinase de la protéine B1 n'a jamais été observée malgré une forte similarité avec la protéine B2 (57% d'identité et 30% de similarité) (Soulat et al., 2006). Il a été démontré que les fragments C-terminaux cytoplasmiques de A1 (Val<sup>194</sup>-Asn<sup>222</sup>) (noté par la suite A1<sub>Ct</sub>) et de A2 (Leu<sup>194</sup>-Phe<sup>220</sup>) (noté par la suite A2<sub>Ct</sub>), sont suffisants pour activer B2. En effet, les protéines chimères dans lesquelles A1<sub>Ct</sub> ou A2<sub>Ct</sub> sont directement fusionnés à B2 (notées A1<sub>Ct</sub>B2 ou A2<sub>Ct</sub>B2) sont actives. Il a de plus été démontré que A1<sub>Ct</sub>B2 s'autophosphoryle selon un mécanisme intermoléculaire et que la mutation de la lysine du walker A (K55) inactive son autophosphorylation. D'autre part, il a été observé que A1 active mieux B2 que A2 malgré une forte conservation de séquence (52% d'identité et 39% de similarité). Des expériences de fluorescence avec du MANT-ATP ont démontré que B2 seule a une très faible affinité pour l'ATP. A l'inverse, lorsque B2 interagit avec A1<sub>Ct</sub> ou A2<sub>Ct</sub> son affinité pour l'ATP est augmentée. Plus précisément, il a été observé que l'augmentation de l'affinité de B2 pour l'ATP était plus forte dans le cas de l'interaction avec A1<sub>Ct</sub> qu'avec A2<sub>Ct</sub>, expliquant ainsi la meilleure activation de B2 par A1 remarquée précédemment.

### I.1.3 Les tyrosine-kinases bactériennes de type eucaryote

Seulement deux tyrosine-kinases ressemblant aux tyrosine-kinases eucaryotes, ont été identifiées chez deux espèces bactériennes. Il s'agit des protéines MasK chez *M. xanthus* et WaaP chez *P. aeruginosa*. Ces protéines se caractérisent par la présence dans leur séquence de plusieurs sous-domaines de Hanks conservés chez les tyrosine-kinases eucaryotes (Hanks and Quinn, 1991) (Fig. 11).



La protéine MasK de *M. xanthus* est une protéine membranaire essentielle pour la croissance bactérienne. Elle comporte un domaine N-terminal contenant la plupart des onze sous-domaines caractéristiques des protéine-kinases eucaryotes et possède également la signature V-x-H-R-D-I-S-x-x-N-L spécifique des tyrosine-kinases eucaryotes dans son domaine VIIIb (Fig. 11). Il a été démontré que MasK s'autophosphorylait sur la tyrosine et interagissait avec la protéine MglA, une petite GTPase, pour contrôler la motilité et le développement de la bactérie. Il est suggéré que l'interaction entre MasK et MglA serait une partie essentielle d'un système de transduction du signal (Thomasson et al., 2002).

Chez *P. aeruginosa*, le gène *waaP* fait partie de l'opéron de synthèse du lipopolysaccharide (LPS). Il a été démontré que la protéine WaaP possède non seulement une activité heptose-kinase lui permettant de phosphoryler le premier heptose du coeur oligosaccharidique du LPS, mais qu'elle est également capable de s'autophosphoryler sur des résidus tyrosyles (Zhao and Lam, 2002). Selon ces auteurs, l'autophosphorylation de cette protéine pourrait lui permettre de réguler son activité heptose-kinase. La phosphorylation du LPS est une modification particulièrement importante dans la biologie des bactéries à Gram-négatif. En effet, il a été démontré qu'elle est impliquée dans la stabilisation de la membrane externe des bactéries (Yethon et al., 1998), qu'elle est nécessaire à la résistance aux peptides cationiques antimicrobiens chez *E. coli* et *Salmonella enterica* et qu'elle est requise pour la virulence de souches invasives de *S. enterica* (Yethon et al., 2000).

De manière étonnante, l'activité kinase de ces deux enzymes n'a pas été observée dans leurs protéines homologues chez d'autres bactéries.

### I.1.4 Autres tyrosine-kinases bactériennes

Il a été démontré que la protéine BipA (aussi appelée TypA) d'une souche entéropathogène d'*E. coli* (EPEC) est capable de s'autophosphoryler sur des résidus tyrosyles. L'activité kinase de BipA est augmentée en présence d'un extrait total de protéines de la souche pathogène d'*E. coli* tandis que l'ajout d'un extrait total de protéines d'*E. coli* K12 n'a pas d'effet. Ceci indique qu'une autre protéine présente uniquement dans les souches d'*E. coli* pathogènes est capable d'influencer l'activité kinase de BipA. La protéine BipA, bien que possédant des motifs A et B de Walker, présente plus de similarité de séquence avec des GTPases interagissant avec les ribosomes et des facteurs d'élongation qu'avec les BY-kinases déjà décrites. La protéine BipA phosphorylée possède une activité ATPase et GTPase plus forte que la protéine BipA non phosphorylée, ce qui suggère que l'autophosphorylation de BipA est capable de moduler son activité. Il a été mis en évidence que la protéine BipA est nécessaire pour les réarrangements du cytosquelette de la cellule hôte observés lors de l'infection par les EPEC, qu'elle participe à la protection de la bactérie contre le système immunitaire de l'hôte et, en particulier, à la résistance de la bactérie à la BPI (Bactericidal/Permeability-Increasing protein) et enfin qu'elle régule négativement la motilité cellulaire médiée par les flagelles et notamment l'expression des flagellines (Farris et al., 1998). Il a également été démontré que la protéine BipA régule la traduction de l'ARNm *fis*. La protéine Fis contrôle le niveau d'expression d'un système de sécrétion de type III, impliqué dans l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales de l'organisme infecté, en induisant un réarrangement du cytosquelette de la cellule-hôte (Owens et al., 2004). Le rôle de la phosphorylation de BipA dans ces processus n'a pas été étudié. Cependant, on peut aisément envisager qu'il existe un lien entre la virulence des souches d'*E. coli* entéropathogènes (EPEC), qui dépend principalement de leur capacité à se fixer sur les cellules intestinales de l'organisme infecté, et l'autophosphorylation de la protéine BipA. Enfin, il est intéressant de signaler que les protéines homologues à BipA présentes chez les souches non-pathogènes ne semblent pas être phosphorylées.

Chez *Caulobacter crescentus* CB15, une activité tyrosine-kinase originale est portée par la protéine DivL. En effet, cette protéine appartient à la famille des systèmes à deux composants mais, de façon étonnante, DivL ne s'autophosphoryle pas sur un résidu histidyle, comme les histidine-kinases senseurs classiques, mais sur un résidu tyrosyle occupant la place de l'histidine. Il a été démontré qu'*in vitro* la protéine DivL est capable de phosphoryler CtrA, un régulateur transcriptionnel majeur contrôlant la division cellulaire et que la tyrosine

phosphorylée de DivL est essentielle pour la régulation du cycle cellulaire de la bactérie (Wu et al., 1999).

La protéine McsB, chez la bactérie *B. subtilis*, a également été décrite comme une tyrosine-kinase particulière. En effet, cette protéine est capable de s'autophosphoryler sur des résidus tyrosyles en utilisant un domaine guanidino-phosphotransférase comme site catalytique. La protéine McsB est activée par interaction avec la protéine McsA (Kirstein and Turgay, 2005) et inhibée en présence de la protéine ClpC. Il a été démontré que McsB phosphorylait McsA sur des résidus tyrosyles et il semble que la phosphorylation des tyrosines 40 et 103 de McsA soit nécessaire à l'activation de McsB. Il a également été mis en évidence que McsB était capable de phosphoryler CtsR, un régulateur transcriptionnel de l'opéron d'adaptation aux chocs thermiques (Kirstein et al., 2007). Un travail récent (Fuhrmann et al., 2009) a démontré que McsB phosphoryle CtsR au niveau de résidus arginyles (Arg<sup>28</sup>, Arg<sup>49</sup> et Arg<sup>62</sup>). Ces arginines sont très conservés au sein de la famille des protéines CtsR et jouent un rôle crucial dans la fixation de l'ADN. MscB phosphoryle préférentiellement la protéine CtsR libre empêchant ainsi la formation du complexe avec l'ADN ce qui favorise l'expression des gènes de réponse aux chocs thermiques. A l'inverse, la protéine CtsR non phosphorylée fixe très bien l'ADN, inhibant ainsi la transcription des gènes en aval. McsB semble donc être à la fois une tyrosine-kinase et une arginine-kinase.

Une protéine homologue à la protéine McsB a été identifiée chez *Bacillus anthracis* et, de la même manière que chez *B. subtilis*, il a été démontré que cette protéine s'autophosphorylait sur des résidus tyrosyles en présence d'une protéine activatrice homologue à la protéine McsA. Cette protéine McsA est également phosphorylée par McsB (Mattoo et al., 2008).

Chez *Mycobacterium tuberculosis*, une protéine initialement classée dans la superfamille des haloacide déshalogénases (HAD) vient d'être identifiée comme tyrosine-kinase (Bach et al., 2009). Cette protéine, appelée PtkA, est capable de s'autophosphoryler et de phosphoryler la protéine PtpA sur des résidus tyrosyles en utilisant indifféremment l'ATP ou le GTP comme donneur de phosphate. PtkA ne possède pas les motifs A et B2 de Walker caractéristiques des BY-kinases et l'analyse bioinformatique de sa séquence n'a pas non plus révélé la présence de motif caractéristique des tyrosine-kinases eucaryotes. Des expériences de mutagenèse dirigée ont alors été entreprises pour identifier les résidus impliqués dans le mécanisme catalytique de cette enzyme. Ainsi, il a été montré que les résidus Lys<sup>184</sup>, Lys<sup>217</sup> et

Lys<sup>270</sup> étaient tous impliqués dans la fixation de l'ATP, que la Tyr<sup>262</sup> était le site d'autophosphorylation de PtkA et que l'Asp<sup>85</sup> appartenant au motif DXD conservé au sein des protéines de la famille HAD était essentiel pour l'activité autokinase de PtkA. De plus, il a été montré que PtkA phosphorylait la protéine PtpA, une phosphoprotéine phosphatase, sur deux tyrosines adjacentes (Tyr<sup>128</sup> et Tyr<sup>129</sup>). En revanche, PtpA n'est pas capable de déphosphoryler PtkA.

## I.2 Substrats des BY-kinases et rôles physiologiques

Depuis 2003, plusieurs protéines endogènes ont été identifiées comme substrats des BY-kinases. Définir l'impact de leur phosphorylation au niveau de leur fonction permet de comprendre le rôle régulateur des BY-kinases.

Les premiers substrats endogènes des BY-kinases à avoir été découverts sont le facteur sigma  $\sigma^{32}$  (RpoH) et le facteur anti-sigma  $\sigma^E$  RseA qui participent à la régulation de la réponse aux chocs thermiques d'*E. coli* (Klein et al., 2003). Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la BY-kinase Etk était capable de phosphoryler RpoH sur la Tyr<sup>260</sup>. Cette tyrosine est située dans la région conservée 4.2 qui est impliquée dans la reconnaissance de la région -35 du promoteur. Une réduction importante de la capacité de RpoH à initier la transcription lorsqu'elle est phosphorylée suggère que la phosphorylation de RpoH altère sa reconnaissance du promoteur. L'expression d'un mutant RpoH Y260A confère un phénotype thermosensible à la bactérie et conduit à une réponse aux chocs thermiques altérée. De la même manière, il a été établi qu'Etk phosphorylait RseA *in vitro* et *in vivo* sur la Tyr<sup>38</sup> du domaine N-terminal impliqué dans l'interaction avec  $\sigma^E$ . Il est envisagé que cette phosphorylation augmente l'affinité de RseA pour  $\sigma^E$ . Ceci est le premier exemple d'implication de la phosphorylation sur la tyrosine chez les bactéries dans des processus de régulation d'expression génique.

Le deuxième substrat endogène des BY-kinases, l'UDP-glucose déshydrogénase, a été découvert simultanément chez une bactérie à Gram-négatif, *E. coli* K12, et chez une bactérie à Gram-positif, *B. subtilis*. Cette caractérisation a constitué une avancée majeure dans la compréhension du rôle biologique de la phosphorylation des protéines bactériennes au niveau de la tyrosine. Il a ainsi été démontré que les deux UDP-glucose déshydrogénases de *B. subtilis*, Ugd<sub>BS</sub> (YwqF) et TuaD, étaient phosphorylées sur la tyrosine par la BY-kinase PtkA (YwqD) en présence de la protéine membranaire TkmA (YwqC) uniquement. De plus, il a été mis en évidence que l'autophosphorylation de PtkA n'était pas nécessaire pour phosphoryler ces deux enzymes. Il a également été établi que la phosphorylation d'Ugd<sub>BS</sub> et TuaD

augmentait leur activité UDP-glucose déshydrogénase, favorisant la conversion d'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique, précurseur de l'acide teichuronique (Mijakovic et al., 2003). De la même manière, chez *E. coli* K12, il a été démontré que la protéine Ugd<sub>EC</sub>, était phosphorylée sur une tyrosine par la BY-kinase Wzc<sub>ca</sub>. Comme chez *B. Subtilis* l'activité UDP-glucose déshydrogénase d'Ugd<sub>EC</sub> est augmentée par phosphorylation (Grangeasse et al., 2003). Il est intéressant de souligner que la protéine Ugd<sub>EC</sub> catalyse la formation d'UDP-acide glucuronique à partir d'UDP-glucose. L'UDP-acide glucuronique est non seulement un élément précurseur de l'exopolysaccharide d'*E. coli*, l'acide colanique (voir section II.2.2), mais il participe également à la synthèse du 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara-4N), composé impliqué dans les phénomènes de résistance aux peptides antimicrobiens cationiques (voir section III.2.1).

Il a également été démontré que la BY-kinase B2 de *S. aureus* phosphoryle la protéine CapO, une UDP-N-acétylmannosamine déshydrogénase produisant l'un des précurseurs de la capsule de *S. aureus* (Sau et al., 1997 ; Portoles et al., 2001). L'activité UDP-N-acétylmannosamine déshydrogénase de CapO est également activée par phosphorylation (Soulat et al., 2007a).

Chez la bactérie *Streptococcus thermophilus* il a été démontré que l'expression de la BY-kinase EpsC/EpsD est nécessaire à l'activité phosphogalactosyltransférase de la protéine EpsE et à la biosynthèse de son exopolysaccharide (Minic et al., 2007). Il est donc très probable que EpsC/EpsD contrôle l'activité d'EpsE par phosphorylation.

Récemment, il a été observé que les protéines SSB (Single-Stranded DNA Binding protein) de *B. subtilis*, *S. coelicolor* et *E. coli* sont phosphorylées *in vivo* au niveau de tyrosine (Mijakovic et al., 2006). Il a été démontré *in vitro* que PtkA était capable de phosphoryler deux membres de la famille SSB, BsSSB et YwpH, en présence de TkmA uniquement et que l'autophosphorylation de PtkA n'était pas non plus nécessaire pour la phosphorylation de ces protéines. La phosphorylation de BsSSB par PtkA s'effectue *in vivo* sur la Tyr<sup>82</sup>. *In vitro*, la phosphorylation de BsSSB augmente sa capacité à fixer l'ADN simple brin d'un facteur 200. Une analyse préliminaire a mis en évidence que la phosphorylation de BsSSB était diminuée en réponse à des lésions de l'ADN. Le rôle de la phosphorylation de BsSSB est encore mal connu ; cependant l'existence d'une relation entre la phosphorylation sur la tyrosine médiée par les BY-kinases et le métabolisme de l'ADN est soutenue par l'observation qu'une souche de *B. subtilis* dont le gène *ptkA* a été inactivé accumule un excédent d'ADN et présente un défaut dans l'initiation de la réplication de l'ADN (Petranovic et al., 2007).

Il a également été rapporté que chez *E. coli*, les intégrases (Int) des coliphages HK022 et  $\lambda$  étaient phosphorylées *in vivo* sur des résidus tyrosyles (Kolot et al., 2008). Wzc est capable de phosphoryler *in vitro* Int HK022. Il a été observé qu'une protéine Int HK022 purifiée à partir de bactéries surexprimant Wzc possédait *in vitro* une activité de recombinaison considérablement réduite. En revanche, *in vivo* la phosphorylation de Int HK022 ne requiert pas la présence de Wzc, ce qui suggère que cette phosphorylation est faite par l'intermédiaire d'une autre tyrosine kinase.

Enfin, il est intéressant de noter que les progrès techniques réalisés en spectrométrie de masse ont permis de réaliser des études à haut débit et ainsi d'identifier un nombre relativement important de protéines phosphorylées sur la tyrosine chez *B. subtilis* (Macek et al., 2007), *Campylobacter jejuni* (Voisin et al., 2007), *E. coli* (Macek et al., 2008), *L. lactis* (Soufi et al., 2008), *K. pneumoniae* (Lin et al., 2009), *P. putida* et *P. aeruginosa* (Ravichandran et al., 2009) et *S. pneumoniae* (Sun et al., 2009) (Tableau 1). Ces protéines phosphorylées sur la tyrosine sont impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires comprenant le métabolisme du carbone, des protéines, des acides aminés et des acides nucléiques, la division cellulaire, la compétence, la mobilité,... De façon surprenante, aucune protéine phosphorylée sur la tyrosine n'est commune à tous les phosphoprotéomes. Seulement trois protéines sont retrouvées dans deux phosphoprotéomes différents, mais dans ces trois cas les sites de phosphorylation identifiés diffèrent entre les espèces. En effet, chez *B. subtilis* InfA est phosphorylée sur la Tyr<sup>60</sup> alors qu'elle est phosphorylée sur la Tyr<sup>44</sup> chez *S. pneumoniae*. De façon analogue, le site de phosphorylation de TufA chez *E. coli* est la Tyr<sup>332</sup> alors que chez *S. pneumoniae* il s'agit de la Tyr<sup>314</sup>. Enfin, GlnA est phosphorylée sur la Tyr<sup>310</sup> chez *L. lactis* et sur la Tyr<sup>287</sup> chez *S. pneumoniae*. Il est important de garder en mémoire que les phosphoprotéomes ne sont absolument pas exhaustifs mais représentent une image de l'état de la phosphorylation des protéines de la bactérie à un instant donné dans des conditions de culture données.

Aujourd'hui, les BY-kinases sont les tyrosine-kinases bactériennes les plus répandues. Nous pouvons donc supposer qu'un grand nombre des protéines identifiées dans les phosphoprotéomes sont phosphorylées par ces enzymes. Par conséquent, nous pouvons envisager que les BY-kinases sont probablement impliquées dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques.

	<i>B. subtilis</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. lactis</i>	<i>K. pneumo-niae</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. aerugi-nosa</i>	<i>S. pneumo-niae</i>
<b>Métabolisme du carbone/Energie</b>								
Glycolyse	LctE				Pgk			PfkA
Métabolisme des carbohydrates					CsrA, DeoC			
Cycle de l'acide tricarboxylique							SucC	
Métabolisme du glucose					PpsA			PflB
Autres						TrxB, CcmE2		
<b>Métabolisme des protéines</b>								
Régulateurs transcriptionnels					Mlc		PA3965	
Facteurs d'initiation	InfA							InfA
Facteurs d'élongation			TufA		Efp			Tuf
Facteurs de terminaison								PrfA
Ribosome					RplU, RpsI			
Autres			AsnS, GroES			Pfl01_22 13		
<b>Métabolisme des acides aminés</b>	Asd		TnaA	GlnA			ThiC	GlnA
<b>Métabolisme des acides nucléiques</b>	YorK		Dps			HrpA	SbcB	PurA
<b>Processus cellulaires</b>								
Division cellulaire								FtsA
Compétence/Sporulation	OppA							LytA
Mobilité/adhésion	YvyG				FimA			
Biosynthèse des polysaccharides					Wzc, ManB, WcaJ			
Stockage/transport du fer		Ferritine						
Métabolisme du phosphate			Ppa					
Homéostasie redox					AhpC	AhpF		
Sérine/Thréonine kinase				PknB				StkP
Divers		ThiJ			GalU	Pfl01_44 93	PvdL	CbpC
<b>Fonction Inconnue</b>	YjoA, YnfE	Cj0681	YgfB		YhaH		PA0920, PA3238, PA3347, PA5205	1

Tableau 1 : Protéines phosphorylées sur la tyrosine identifiées par phosphoprotéomique.

## **II Les polysaccharides bactériens extracellulaires**

La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides incluant les polysaccharides intracellulaires servant généralement de réserves métaboliques (glycogène), les polysaccharides structuraux participant à l'architecture de la paroi cellulaire (lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycane, acides téichoïques) et les polysaccharides extracellulaires offrant notamment un rôle de protection à la bactérie vis-à-vis de l'environnement dans lequel elle évolue et contribuant à la virulence des bactéries pathogènes.

### **II.1 Présentation générale**

#### **II.1.1 Définition**

De nombreuses bactéries, autant à Gram-positif qu'à Gram-négatif, exportent des polysaccharides. Les polysaccharides extracellulaires sont constitués de la répétition de monomères saccharidiques, soit d'un seul type (homopolysaccharides), soit de plusieurs types (hétéropolysaccharides), auxquels peuvent être fixés d'autres groupements tels que des acétate, pyruvate, succinate, ou phosphate pour former généralement des polymères anioniques fortement hydratés, de masse moléculaire très élevée comprise entre  $10^5$  Da et  $10^6$  Da. Les hétéropolysaccharides représentent la très grande majorité des polysaccharides bactériens. Ils sont composés d'unités répétitives de 2 à 10 sucres de complexité variable et peuvent être ramifiés ou linéaires. Les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés sont le glucose, le galactose et le rhamnose pour les oses neutres, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique pour les oses acides.

Les polysaccharides extracellulaires peuvent être covalamment liés à la surface de la bactérie au niveau de phospholipides ou du lipide A du LPS et appelés polysaccharides capsulaires (CPS) ou être retenus à la surface de la cellule par de faibles interactions, voire même relargués dans le milieu extracellulaire et appelés exopolysaccharides (EPS).

#### **II.1.2 Rôles physiologiques des polysaccharides extracellulaires et applications industrielles**

Les polysaccharides extracellulaires semblent conférer aux bactéries des facultés d'adaptation importantes pour leur survie en milieu naturel et une protection contre les

environnements hostiles. La grande diversité structurale des polysaccharides extracellulaires microbiens témoigne de l'adaptation des microorganismes à des environnements très différents et il a été proposé que la capacité de production d'EPS constitue une réponse directe aux pressions sélectives de l'environnement (Dudman, 1964).

En particulier, le caractère anionique des polysaccharides extracellulaires leur permet de fixer des cations à la surface de la bactérie et de favoriser ainsi l'apport en minéraux essentiels et en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (Costerton et al., 1981) ou de bloquer l'entrée d'ions métalliques toxiques. Ce type d'interaction est également impliqué dans l'adhésion des bactéries sur des surfaces métalliques et la corrosion subséquente de ces surfaces. La nature visqueuse de la couche de polysaccharides extracellulaires a également un effet important sur les propriétés de diffusion des molécules entrant ou sortant de la cellule (Allison and Matthews, 1992) et peut, par exemple, permettre de bloquer la pénétration d'antibiotiques comme les peptides antimicrobiens cationiques (Campos et al., 2004). Ainsi, la production d'EPS confère à *Lactococcus lactis*, une tolérance augmentée envers le cuivre, la nisine et le lysozyme (Looijesteijn et al., 2001). De plus, les polysaccharides extracellulaires assurent à la bactérie une protection contre la dessiccation de par leur caractère fortement hydraté (Schnider-Keel et al., 2001).

Dans le cas des bactéries pathogènes, il a été démontré que les CPS étaient très souvent des facteurs de virulence essentiels. En effet, ils protègent la bactérie contre le système immunitaire inné de l'hôte, en prévenant par exemple le contact entre le phagocyte et la bactérie et en empêchant l'activation du complément. Les CPS confèrent également une résistance à la réponse immunitaire spécifique de l'hôte en masquant les structures antigéniques à la surface de la bactérie et en la soustrayant ainsi à l'action des anticorps (Roberts, 1996). De plus, l'extrême variabilité de la composition des polysaccharides bactériens rend ces molécules très faiblement immunogènes. Cette faible immunogénicité est accentuée par le fait que les polysaccharides bactériens possèdent certaines similarités avec les glycolipides et les glycoprotéines présents chez la cellule-hôte (Weintraub, 2003). Les CPS jouent également un rôle dans la virulence des bactéries en favorisant l'adhérence de la bactérie à l'organisme-hôte (Tosteson and Corpe, 1975) et en facilitant la formation de biofilms qui permettent à leur tour de protéger les bactéries contre les antibiotiques.

Les polysaccharides extracellulaires présentent un intérêt majeur pour l'industrie pharmaceutique. En effet, des mélanges de plusieurs sérotypes de CPS de bactéries

pathogènes sont utilisés pour le développement de vaccins contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (Pletz et al., 2008 ; Schaffer and Lee, 2009). D'autre part, il a été remarqué que certains polysaccharides bactériens possèdent des propriétés antitumorale, antivirale, anticoagulante et immunostimulante (Suzuki et al., 1994 ; Smelcerovic et al., 2008). Les EPS sont aussi utilisés dans l'industrie agroalimentaire et l'industrie cosmétique pour leur propriétés viscosifiante, stabilisante et émulsifiante afin d'améliorer la texture des produits (Rosenberg and Ron, 1997 ; Becker et al., 1998). Les polysaccharides extracellulaires bactériens jouent également un rôle écologique dans la décontamination des métaux lourds. En effet, la nature anionique de la couche de polysaccharides permet aux bactéries de capturer des ions métalliques tels que  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  (Mohamed, 2001 ; Iyer et al., 2005).

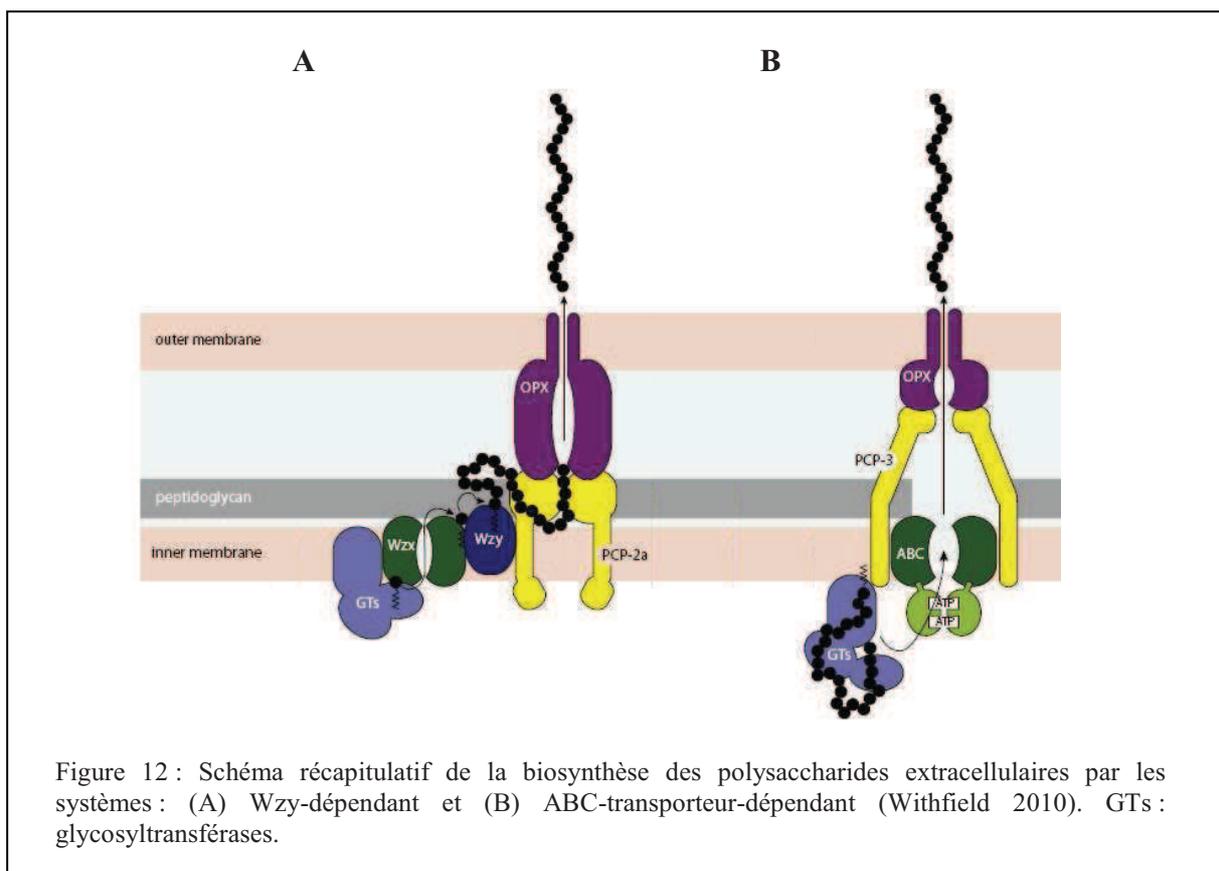
### II.1.3 Mécanismes de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires

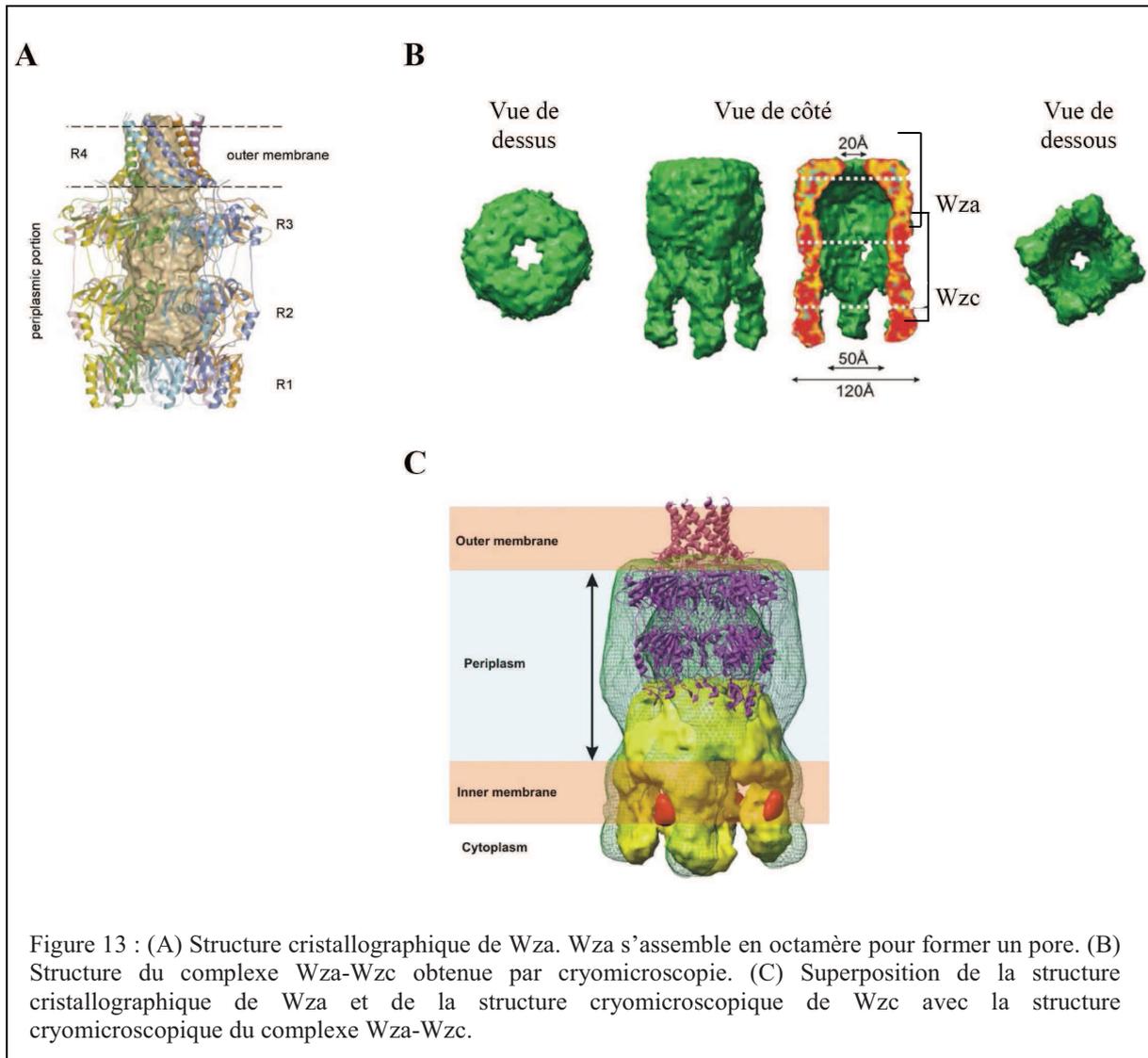
La production de polysaccharides extracellulaires représente un défi majeur de transport cellulaire. En effet, ces polymères hydrophiles de très haut poids moléculaire doivent être assemblés dans un processus traversant la membrane interne, une couche de peptidoglycane et éventuellement la membrane externe dans le cas des bactéries à Gram-négatif, tout cela sans compromettre l'intégrité des membranes cellulaires. Malgré la très grande variabilité de structure des polysaccharides extracellulaires - rien que chez *E. coli*, il existe 80 sérotypes de CPS différents - l'éventail de stratégies de biosynthèse, d'assemblage et d'export de ces polysaccharides est très limité puisque seulement deux mécanismes généraux ont été décrits pour assurer la biosynthèse de la plupart des polysaccharides extracellulaires (Cuthbertson et al., 2009).

#### II.1.3.1 Le système Wzy-dépendant

Le système Wzy-dépendant est le mécanisme de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires le plus répandu. Il contribue notamment à la biosynthèse des capsules de groupe I et IV chez *E. coli* (Whitfield, 2006). Dans ce système, les sous-unités répétitives seraient construites une à une, dans le cytoplasme, par des glycosyltransférases, à partir d'un accepteur lipidique, l'undécaprénol diphosphate (und-PP). La sous-unité liée à l'und-PP nouvellement synthétisée, serait ensuite exportée à travers la membrane interne grâce à une

flippase (Wzx chez *E. coli*) dont le mécanisme d'action reste inconnu. La polymérisation se déroulerait ensuite au niveau du périplasma, sous-unité après sous-unité, par l'intermédiaire d'une polymérase (Wzy chez *E. coli*) (Woodward et al., 2010). La polymérisation est également influencée par une protéine appartenant à la famille des PCP2a (Wzc chez *E. coli*) qui détermine la longueur du polymère final. Le rôle de cette protéine ne semble cependant pas se limiter à la polymérisation et apparaît beaucoup plus complexe. En effet, chez *E. coli*, cette protéine appartient à la famille des BY-kinases et joue un rôle essentiel dans la translocation du polysaccharide du périplasma à la surface de la cellule, en partenariat avec une protéine de la famille des OPX (Outer membrane Polysaccharide eXport) (Wza chez *E. coli*) (Fig. 12 A). La structure du complexe Wza-Wzc d'*E. coli* K30, obtenue par cryomicroscopie électronique, suggère que ce complexe formerait un échafaudage moléculaire traversant l'enveloppe cellulaire. Il est composé de l'association d'un octamère de Wza formant un canal constitué d'hélices  $\alpha$  amphipathiques traversant la membrane externe et d'un tétramère de Wzc (Fig. 13).





### II.1.3.2 Le système ABC-transporteur-dépendant

Le système ABC-transporteur-dépendant (ATP Binding Cassette-transporteur-dépendant) contribue, en particulier, à la biosynthèse des capsules de groupe II et III d'*E. coli* (Whitfield, 2006). Dans ce système, la polymérisation de la chaîne polysaccharidique s'effectue sur un accepteur lipidique et est réalisée entièrement dans le cytoplasme, par addition séquentielle de sucres sur l'extrémité non réductrice de la chaîne naissante par des glycosyltransférases. La nature exacte de l'accepteur lipidique n'est pas établie. En revanche, il a été observé que le polysaccharide exporté est fixé à un résidu diacylglycérophosphate. Il est donc probable que ce résidu terminal serve d'accepteur pour la croissance de la chaîne. Le polymère synthétisé est alors exporté à travers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire

d'un ABC-transporteur. La translocation du polysaccharide à travers le périplasma vers la surface de la cellule nécessite ensuite la présence de deux autres protéines, une copolymérase de la famille des PCP-3 et un membre de la famille des OPX. Un oligomère de la protéine de la famille des OPX jouerait le rôle de canal tandis que la copolymérase de la famille des PCP3 jouerait le rôle de protéine adaptatrice reliant l'ABC transporteur au canal formé par l'oligomère d'OPX et agissant comme une pompe (Fig. 12 B). Ce système ressemble ainsi au complexe Wza-Wzc retrouvé dans le système Wzy-dépendant. Il apparaît donc que si les étapes précoces de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires varient entre le système ABC-transporteur et le système Wzy-dépendant, l'étape d'export présente au contraire des similarités en impliquant dans les deux cas des membres de la famille des PCP et des OPX.

### II.1.3.3 Autres systèmes de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires

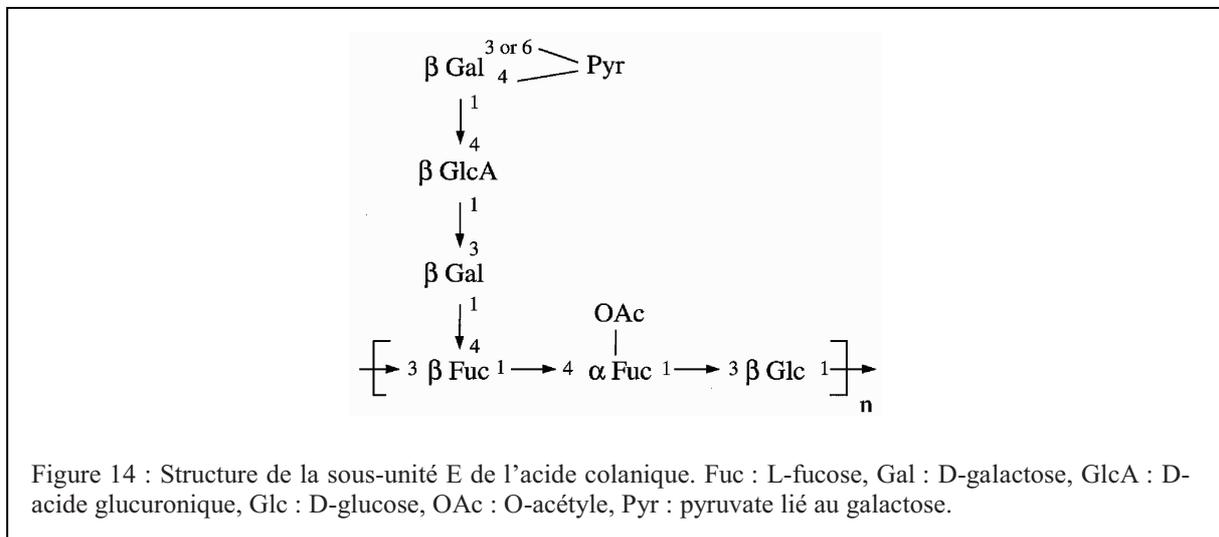
La biosynthèse de quelques exopolysaccharides, dont notamment les poly- $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamines, la cellulose, et l'alginate de *P. aeruginosa*, diffèrent des modèles Wzy-dépendant et ABC-transporteur-dépendant. En effet, les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de ces polysaccharides ne codent pas pour des protéines homologues aux protéines constituant ces deux grandes voies de biosynthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires. Récemment, une étude a révélé que la protéine AlgK, impliquée dans la biosynthèse de l'alginate, était une lipoprotéine structurée en motif TPR (tetratricopeptide repeat) et contribuait à la localisation, dans la membrane externe, de la protéine AlgE, une porine présentant une structure en tonneaux  $\beta$  impliquée dans l'export de l'alginate vers le milieu extracellulaire. Il est donc proposé que les protéines AlgK et AlgE s'assemblent pour former un nouveau système de sécrétion d'exopolysaccharides, dans lequel le motif TPR d'AlgK agirait comme un échafaudage pour l'assemblage d'un complexe multiprotéique nécessaire à la biosynthèse de l'alginate et le domaine porine d'AlgE faciliterait le transport de l'alginate à travers la membrane externe (Keiski et al., 2010).

On peut également signaler que la synthèse de certains homopolysaccharides tels que le dextrane, l'alternane et le levane est réalisée extracellulairement (Vanhooren and Vandamme, 1998) par des enzymes excrétées par la bactérie et ne nécessite donc pas de système de transport.

## II.2 L'exopolysaccharide d'*E. coli* K12 : l'acide colanique

### II.2.1 Structure de l'acide colanique

La bactérie *E. coli* K12 synthétise, dans certaines conditions, un exopolysaccharide appelé acide colanique. L'acide colanique est un hétéropolysaccharide composé d'un enchaînement répétitif d'une sous-unité oligosaccharidique ramifiée (sous-unité E). La sous-unité E est composée de 4 sucres différents (le D-glucose, le D-galactose, le D-acide glucuronique et le L-fucose) modifiés par des groupements acétyles et pyruvyles (Stevenson et al., 1996) (Fig. 14).



### II.2.2 Voie de biosynthèse de l'acide colanique

Le processus de biosynthèse de l'acide colanique s'effectue selon le système Wzy-dépendant et est donc comparable à celui des capsules de groupe I et IV. Il peut être divisé en quatre étapes, caractérisées par leur localisation cellulaire (Fig. 15 et 16) :

#### *Au niveau du cytoplasme :*

Les unités répétitives nucléotide-sucres nécessaires à la sous-unité E sont synthétisées par diverses enzymes. Des quatre nucléotide-sucres utilisés pour la synthèse de l'acide colanique, seul le GDP-fucose est uniquement impliqué dans cette biosynthèse et est, par conséquent, produit par des gènes localisés dans l'opéron responsable de la synthèse de

l'acide colanique. Il dérive du mannose 6-phosphate et est synthétisé grâce à l'activité de 4 protéines : ManB, ManC, Gmd et Fcl/WcaG (Andrianopoulos et al., 1998). Les trois autres nucléotide-sucres, l'UDP-galactose, l'UDP-glucose et l'UDP-acide glucuronique sont utilisés dans d'autres métabolismes et donc synthétisés par les produits des gènes de ménage GalU, GalT, GalK, GalE et Ugd (Fig. 16).

**Au niveau de la face cytoplasmique de la membrane interne :**

Dans cette étape, la sous-unité E est assemblée sur le transporteur lipidique undécaprénol diphosphate (Johnson and Wilson, 1977). Le premier nucléotide-sucre fixé sur l'undécaprénol diphosphate est le glucose-1-phosphate grâce à la protéine WcaJ (Fig. 16). Sur la base d'alignements de séquences, il semblerait que les cinq gènes *wcaA*, *wcaC*, *wcaE*, *wcaI* et *wcaL* codent pour des glycosyltransférases qui seraient responsables du transfert séquentiel des sucres suivants sur la sous-unité E naissante.

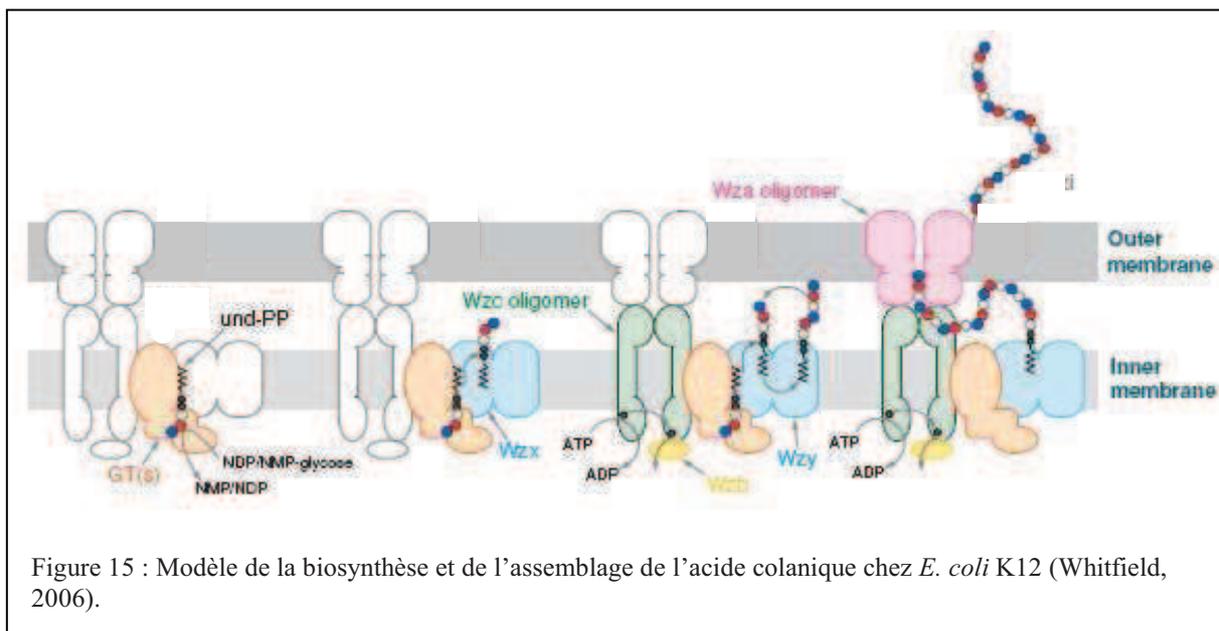
L'acétylation semble impliquer les protéines WcaB et WcaF (Fig. 16). En effet, ces deux protéines sont homologues à certaines protéines possédant une activité acétyltransférase et fixeraient donc deux groupements acétyles : un sur le premier fucose et un sur le galactose distal de la ramification de la sous-unité E pour ensuite permettre la fixation du pyruvate. La protéine WcaK présente une homologie de séquence avec la protéine CsaB de *B. subtilis* qui fait partie de la famille des hydrolases NUDIX (NUcleoside DIphosphate linked to some other moiety X) et est impliquée dans l'addition d'un groupement pyruvate sur le peptidoglycane de *B. subtilis*. La protéine WcaK serait donc capable de fixer le pyruvate sur le galactose acétylé de l'acide colanique grâce à une activité pyruvyltransférase (Fig. 16) (Mesnage et al., 2000).

**Au niveau de la face périplasmique de la membrane interne :**

Cette étape permet le transfert de la sous-unité E fixée sur l'undécaprénol diphosphate à travers la membrane interne et la polymérisation du polysaccharide au niveau du périplasme. Il semble que les protéines Wzx et WcaD (aussi appelée Wzy) soient responsables de cette fonction. La protéine Wzx est supposée être une flippase et la protéine WcaD semble agir en tant que polymérase (Fig. 15) (Whitfield and Paiment, 2003).

**Au niveau des membranes interne et externe :**

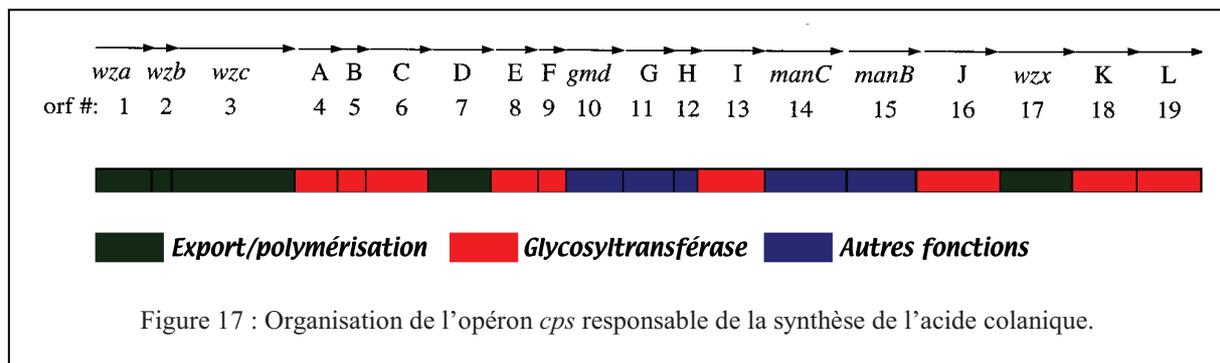
Lors de cette dernière étape, l'acide colanique est transloqué à travers la membrane externe et relargué dans le milieu extérieur. Ce phénomène serait assuré par le duo de protéines Wza et Wzc (Fig. 15). Cependant, le rôle précis de chacune de ces protéines reste encore inconnu. Wza semble impliquée dans l'export du polysaccharide à travers la membrane externe. La BY-kinase Wzc est également une co-polymérase qui semble participer à la régulation de la longueur du polysaccharide et à son export (Obadia et al., 2007) (voir section II.3). Il est intéressant de noter qu'une protéine cytoplasmique, la protéine Wzb, affecte la fonction de la protéine Wzc. Wzb est une phosphotyrosine-phosphatase capable de déphosphoryler Wzc (Vincent et al., 1999). Elle participe ainsi à la régulation de la quantité d'acide colanique produit (Obadia et al., 2007). Cependant, il n'est pas exclu qu'elle puisse également déphosphoryler l'und-PP et participer ainsi à son recyclage en und-P après la polymérisation (Bugert and Geider, 1997).





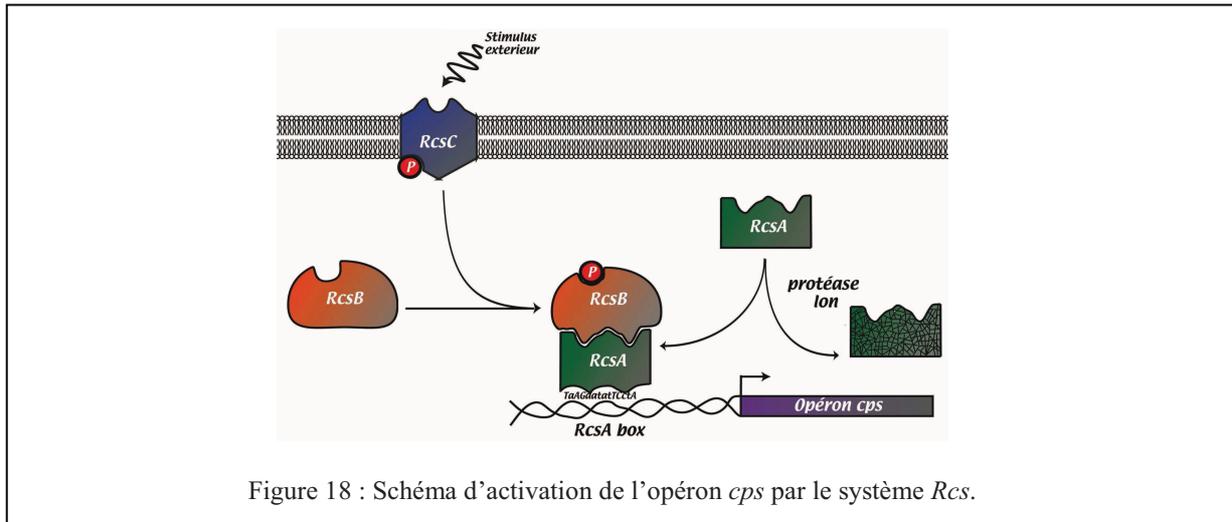
### II.2.3 Organisation et régulation génétique de la biosynthèse de l'acide colanique

L'opéron *cps* (Capsular Polysaccharide Synthesis) est un opéron de 21 kpb composé de 19 gènes co-transcrits situé à la 46<sup>ème</sup> minute du chromosome d'*E. coli* K12 (Fig. 17).



L'acide colanique est produit par la bactérie *E. coli* à un faible taux basal, mais de nombreuses stimulations du milieu extérieur augmentent sa production. Une faible température (10-20°C) et un pH optimal compris entre 7 et 7,5 permettent d'augmenter le taux de production d'acide colanique (Yeh and Chen, 2004).

La régulation de l'expression de l'opéron *cps* s'opère par le système de transduction du signal *Rcs* (Regulatory of Capsular Synthesis) (Gottesman et al., 1985). Ce système permet également d'activer l'expression de gènes absents de l'opéron *cps* et nécessaires à la production d'acide colanique comme le gène codant pour la protéine Ugd (Mouslim and Groisman, 2003). Le système *Rcs* fait intervenir trois protéines : RcsA, RcsB et RcsC. La protéine RcsB est activée par la protéine membranaire RcsC suite à un transfert d'un groupement phosphate au niveau d'un aspartate dans son domaine N-terminal (Gottesman et al., 1985). Le complexe RcsA/RcsB-phosphorylée se forme alors dans la cellule (Wehland and Bernhard, 2000) et peut se lier sur le génome au niveau de la boîte "*rcaAB*" (séquence consensus : TaAGaatatTCctA) et initier la transcription de certains gènes dont l'opéron *cps* (Fig. 18). La protéine RcsA est une protéine peu stable (demi-vie : 1 minute) soumise à la dégradation par la protéase Lon (Stout et al., 1991). Cette protéine est donc le facteur limitant de l'activation de l'opéron *cps*.



Le système *Rcs* est activé en réponse à des stress environnementaux touchant plus particulièrement l'intégrité de la membrane (stress hydrique, traitement à la chlorpromazine, ajout d'ions zinc, abaissement de la température ou croissance sur une surface solide). Des stress métaboliques comme l'augmentation de la synthèse d'UDP-glucose activent également ce système (El-Kazzaz et al., 2004).

#### II.2.4 Rôles de l'acide colanique

L'acide colanique permet à *E. coli* de résister aux chocs osmotiques et aux stress oxydants (Chen et al., 2004), aux hautes températures et à l'acidité (Mao et al., 2001), ainsi qu'aux antibiotiques affectant la paroi ( $\beta$ -lactames) (Sailer et al., 2003). Il augmente également la survie des *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) dans les fluides gastrointestinaux (Mao et al., 2006).

L'acide colanique est également impliqué dans la formation des biofilms. La bactérie dénuée d'acide colanique adhère tout d'abord sur la surface. En effet, le système *Rcs*, qui active la synthèse de l'acide colanique, inhibe la formation des curli nécessaires pour l'adhésion de la bactérie aux surfaces. L'exopolysaccharide est synthétisé durant le développement du biofilm pour permettre l'acquisition de la structure tridimensionnelle de ce dernier (Danese et al., 2000 ; Prigent and Morin, 2000 ; Hanna et al., 2003).

*E. coli* K12 n'est pas une bactérie "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et donc l'acide colanique ne peut pas être utilisé à des fins technologiques et industrielles. Cependant, étant donnée la conservation observée dans les gènes et les mécanismes de biosynthèse des

EPS, cette bactérie représente un excellent modèle d'étude de ces mécanismes de biosynthèse afin de développer des applications biotechnologiques et/ou médicales chez d'autres bactéries pathogènes ou d'intérêt industriel.

### II.3 Rôle de la phosphorylation sur la tyrosine dans la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires

Ces dernières années, il a été clairement démontré que l'activité tyrosine-kinase des BY-kinases joue un rôle majeur dans la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires du système Wzy-dépendant. Cependant, l'effet de cette phosphorylation semble être complexe et a conduit à des observations divergentes selon la souche étudiée. En effet, certaines études montrent une régulation positive de la quantité de polysaccharides extracellulaires produite, par phosphorylation des BY-kinases (Wugeditsch et al., 2001 ; Bender et al., 2003 ; Morona et al., 2003), tandis qu'à l'inverse d'autres études indiquent que la forme non phosphorylée des BY-kinases est nécessaire à la production des polysaccharides extracellulaires (Vincent et al., 2000 ; Niemeyer and Becker, 2001 ; Nakar and Gutnick, 2003). De manière surprenante, il a été observé qu'un motif de Walker A fonctionnel, capable de fixer l'ATP, était nécessaire à l'activité des BY-kinases dans la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires, et ce indépendamment de son rôle dans leur autophosphorylation (Morona et al., 2000a ; Niemeyer and Becker, 2001 ; Wugeditsch et al., 2001 ; Obadia et al., 2007). En effet, la mutation de la lysine du Walker A des BY-kinases résulte en une diminution considérable, voire une abolition totale, de la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires alors qu'à l'inverse l'expression de la forme non phosphorylée des BY-kinases conduit à une production normale de polysaccharides.

Chez *S. pneumoniae* RX1, il a été démontré que la mutation des tyrosines du tyrosine cluster de CpsD conduisait à l'obtention d'un phénotype très mucoïde (Morona et al., 2003). Ce phénotype mucoïde coïncide avec une diminution de la quantité de polysaccharide produit mais également avec une diminution de sa taille modifiant ainsi les propriétés physiques et rhéologiques du polymère et expliquant l'aspect mucoïde obtenu. L'autophosphorylation de CpsD conduit donc à une régulation positive de la quantité et de la taille des polysaccharides produits chez *S. pneumoniae* RX1. De la même manière, une corrélation positive entre la phosphorylation de CpsD et la quantité de capsule exprimée a été mise en évidence chez *S. pneumoniae* D39 (Bender et al., 2003). De plus, la phosphorylation d'au moins trois tyrosines

du tyrosine cluster de CpsD semble nécessaire à la production correcte des polysaccharides capsulaires (Morona et al., 2003). En effet, lorsque deux ou trois tyrosines du tyrosine cluster sont mutées, la colonie présente un phénotype mucoïde semblable à celui obtenu pour la mutation des quatre tyrosines. A l'inverse, lorsqu'une seule tyrosine est mutée, la colonie est identique à la souche sauvage.

Chez *S. meliloti*, il a été observé que la mutation du site de fixation de l'ATP d'ExoP induit non seulement une diminution importante de la quantité de succinoglycane produite, mais modifie également son état de polymérisation (Niemeyer and Becker, 2001). En effet, une souche sauvage produit un mélange de monomères, dimères et trimères de la sous-unité octasaccharidique. A l'inverse, la souche exprimant ExoP mutée sur son site de fixation de l'ATP ne produit que des monomères, indiquant que cette mutation affecte la fonction co-polymérase de la protéine. D'autre part, la mutation des tyrosines 505 et 758 d'ExoP conduit à une légère diminution de la production totale de succinoglycane mais surtout à la modification du rapport LMW/HMW des succinoglycanes en faveur des LMW. L'autophosphorylation d'ExoP régule donc positivement la quantité et principalement la taille des succinoglycanes produits.

*Acinetobacter lwoffii* RAG-1 produit un polysaccharide extracellulaire appelé émulsane, très étudié pour ses propriétés émulsifiantes. L'expression de la protéine Wzc, mutée sur les tyrosines de son tyrosine cluster, conduit à l'obtention d'une activité émulsifiante diminuée de 75% (Nakar and Gutnick, 2003). Ce mutant produit une anormalement grande quantité d'un exopolysaccharide de très haut poids moléculaire conférant un aspect très visqueux aux colonies. Les auteurs proposent donc un modèle dans lequel la forme non phosphorylée de Wzc permettrait d'initier la polymérisation et le transport du polymère vers l'extérieur de la cellule tandis que la phosphorylation de Wzc bloquerait la polymérisation et le transport, définissant ainsi la taille de l'émulsane.

Chez *E. coli* K30, l'autophosphorylation de Wzc semble essentielle à la synthèse de la capsule de groupe I puisque la délétion du tyrosine cluster de Wzc conduit à l'absence de capsule. Ceci suggère que la phosphorylation de ses tyrosines est nécessaire à l'activité co-polymérase de Wzc (Wugeditsch et al., 2001). Une étude plus détaillée du rôle de chaque tyrosine du tyrosine cluster de Wzc a été réalisée et conclut que la présence d'une seule tyrosine phosphorylée, quelle que soit sa position dans le tyrosine cluster, n'est pas suffisante pour permettre l'expression de la capsule. De façon analogue, il a été démontré que la

mutation d'une seule tyrosine du tyrosine cluster n'affecte pas la capacité d'*E. coli* à produire de la capsule. En revanche, des combinaisons de mutations altérant de deux à cinq tyrosines affectent la production de capsule. Il semble donc que l'activité co-polymérase de Wzc soit influencée par son niveau global de phosphorylation, plutôt que par la phosphorylation précise d'une combinaison de résidus (Paiment et al., 2002).

Au contraire, chez *E. coli* K12, la forme déphosphorylée de Wzc semble favoriser la biosynthèse de l'acide colanique tandis que la forme phosphorylée semble prévenir la production de cet exopolysaccharide (Vincent et al., 2000). En effet, la mutation de la tyrosine interne 569 et du tyrosine cluster en phénylalanine, mimant un état déphosphorylé, n'affecte pas ou très peu la production d'acide colanique, alors que la mutation des tyrosines du tyrosine cluster en acide glutamique, mimant un état phosphorylé, provoque une réduction de 90% de la quantité d'acide colanique produit (Obadia et al., 2007). De plus, le tyrosine cluster lui-même semble être un élément déterminant de la synthèse de l'acide colanique puisque sa délétion conduit à une suppression totale de la production d'acide colanique. Il a également été remarqué que la phosphorylation de Wzc influençait la distribution de taille de l'acide colanique. En effet, une souche exprimant les tyrosines du tyrosine cluster mutées en phénylalanine présente un type d'acide colanique beaucoup moins dispersé ( $1300 \pm 200\text{kDa}$ ) que celui de la souche sauvage ( $1300 \pm 700\text{kDa}$ ). Les deux états de phosphorylation et déphosphorylation de la protéine Wzc sont donc importants pour la biosynthèse correcte de l'acide colanique. La production d'acide colanique n'est donc pas régulée par phosphorylation selon un mécanisme on/off comparable à un « interrupteur », mais plutôt par l'alternance cyclique de la phosphorylation/déphosphorylation de Wzc régulant à la fois la quantité et la taille du polymère.

Il est important de noter que toutes ces études ne tiennent pas compte de l'influence des mutations des BY-kinases sur la phosphorylation de leurs substrats comme par exemple la protéine Ugd chez *E. coli*. Toutes les observations faites ne sont donc pas forcément imputables à un effet direct de la mutation sur l'activité de la BY-kinase elle-même mais peuvent aussi être attribuées à des effets indirects dûs à la modification de la phosphorylation des substrats et, par conséquent, de leur activité.

## III La résistance aux antibiotiques cationiques de type polymyxine

### III.1 Introduction

#### III.1.1 Résistance aux antibiotiques

Les bactéries sont capables de résister à la présence d'antibiotiques dans leur environnement. Ces capacités de résistance peuvent être naturelles, c'est-à-dire programmées sur le génome bactérien, ou bien acquises, suite à une mutation génétique aléatoire ou à un échange de gènes avec une autre bactérie. Différentes stratégies sont utilisées par les cellules bactériennes pour développer un mécanisme de résistance à un antibiotique :

- la modification de l'antibiotique : les bactéries peuvent acquérir une enzyme qui inactive l'antibiotique (ex : inactivation de la pénicilline par production de  $\beta$ -lactamase).

- la mutation de la cible de l'antibiotique : les antibiotiques agissent en se fixant sur une cible précise de la bactérie (paroi, ribosome, enzyme...). La présence d'une modification au niveau du site de fixation de l'antibiotique due à une mutation génétique peut empêcher la liaison de l'antibiotique à sa cible et donc le rendre inefficace (ex : la résistance à la streptomycine provient d'une modification d'une protéine ribosomique de sorte qu'elle ne puisse plus s'y fixer et inhiber la synthèse protéique).

- la réduction de la perméabilité membranaire : chez les bactéries à Gram-négatif, la barrière constituée par le lipopolysaccharide (LPS) s'oppose à la pénétration des antibiotiques par diffusion. En revanche, des porines, protéines formant des canaux, permettent le passage de certaines molécules dont les antibiotiques. Les bactéries peuvent acquérir des mutations entraînant des modifications quantitatives ou qualitatives de ces porines et ainsi bloquer l'entrée des antibiotiques dans la cellule.

- l'efflux des antibiotiques : les bactéries peuvent produire des protéines membranaires capables d'éliminer les antibiotiques par pompage actif hors de la cellule (c'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*).

Généralement les résistances acquises ne concernent que quelques souches d'une même espèce, mais la généralisation de la résistance à toute une population de bactéries peut être provoquée par une surexposition de cette population à l'antibiotique et conduire à une évolution par sélection naturelle. Si une bactérie est porteuse de plusieurs gènes de résistance

pour différentes familles d'antibiotiques, elle est appelée multirésistante. La propagation des souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques est l'un des sujets les plus préoccupants en médecine actuellement. En effet, il s'agit d'un problème très vaste qui touche toutes les infections aussi bien nosocomiales que communautaires et qui constitue une menace de santé publique pour les années à venir.

### III.1.2 Les peptides antimicrobiens cationiques

Les peptides antimicrobiens cationiques sont l'un des éléments clefs de la défense immunitaire innée des organismes multicellulaires animaux et végétaux (Hoffmann et al., 1999). Plus de 600 peptides antimicrobiens cationiques ont été identifiés. Ils comportent en moyenne de 20 à 50 acides aminés, uniquement de type lévogyre, et possèdent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles (Hancock, 1999). La plupart des peptides antimicrobiens cationiques ont une activité antimicrobienne à large spectre couvrant la majorité des espèces bactériennes et fongiques, voire des virus enveloppés et des protozoaires (Hancock, 2001). Les peptides antimicrobiens cationiques présentent de grandes diversités structurales et peuvent être classés en trois catégories selon leur structure et leur composition en acides aminés :

- les peptides linéaires formant des hélices  $\alpha$ . Les cécropines et les magainines sont les prototypes de cette famille de peptides très fortement cationiques (Berkowitz et al., 1990).
- les peptides cycliques, souvent riches en cystéine, formant ainsi un ou plusieurs ponts disulfure. Parmi eux figurent les défensines  $\alpha$  et  $\beta$  des mammifères, des insectes et des plantes.
- la troisième famille, très hétérogène, rassemble des peptides dont la composition est dominée par un type d'acide aminé : (i) l'histidine dans les histatines trouvées dans la salive humaine, (ii) le tryptophane dans les indolicidines de bovin et (iii) la proline et la glycine dans de nombreux peptides produit par les insectes.

Le mode d'action de ces peptides antimicrobiens est surtout bien connu pour les peptides à hélice  $\alpha$  tels que les cécropines et les magainines qui tuent les microorganismes en perméabilisant leur membrane par un effet de type détergent accompagné de la formation de pores (Fig. 19). La spécificité d'action des peptides antimicrobiens repose principalement sur les différences de composition et de propriétés physicochimiques qui distinguent les

membranes microbiennes de celles des cellules de l'hôte. Nous pouvons cependant noter que certains peptides ne semblent pas agir en perméabilisant les membranes des microorganismes mais *via* une interaction spécifique avec des récepteurs membranaires ou en pénétrant dans la cellule et en interférant avec le métabolisme de la bactérie (Brogden, 2005).

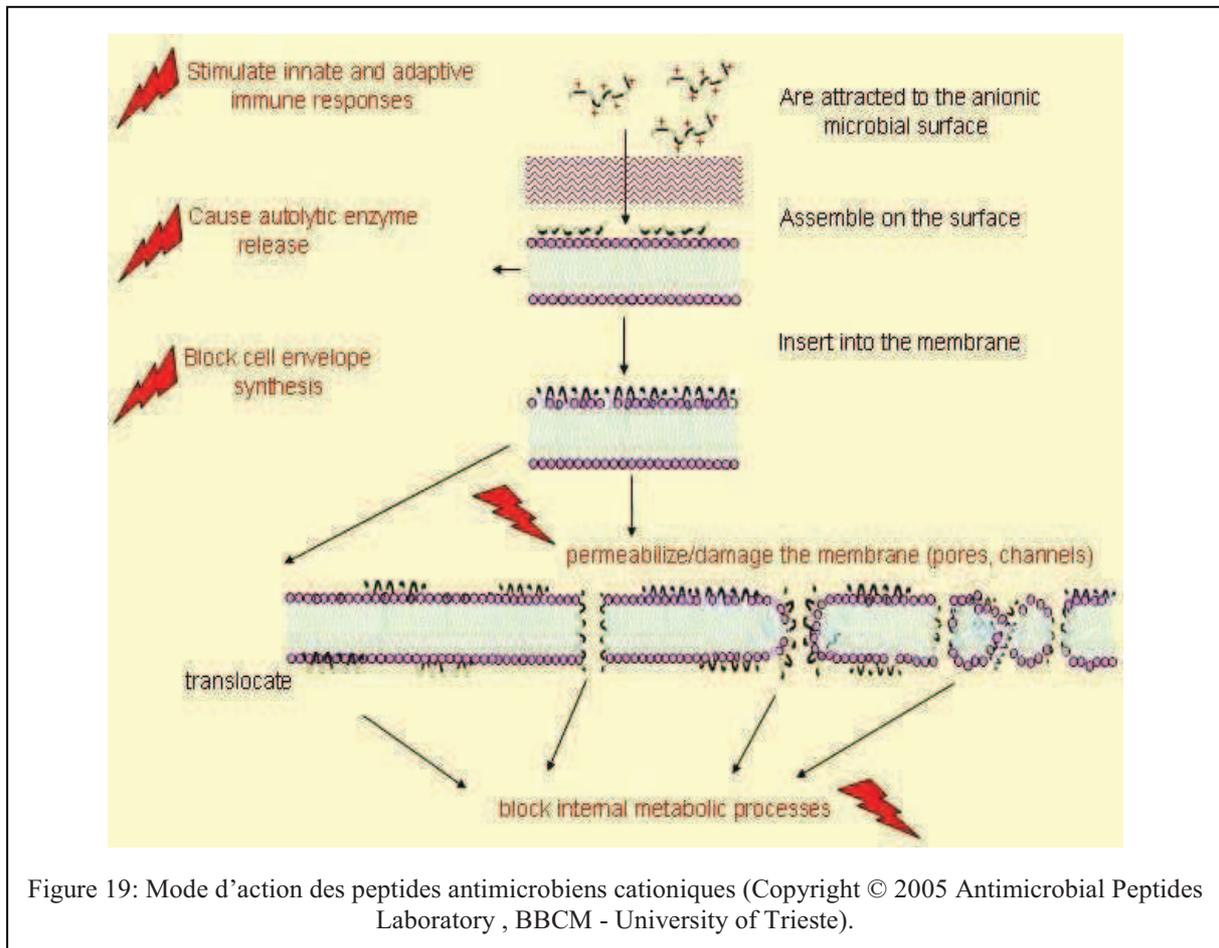


Figure 19: Mode d'action des peptides antimicrobiens cationiques (Copyright © 2005 Antimicrobial Peptides Laboratory , BBCM - University of Trieste).

Enfin, il est important de souligner que les peptides cationiques sont des effecteurs multifonctionnels participant également à l'activation des voies de l'immunité adaptative et à la modulation des réponses inflammatoires (Scott and Hancock, 2000 ; Guani-Guerra et al., 2010).

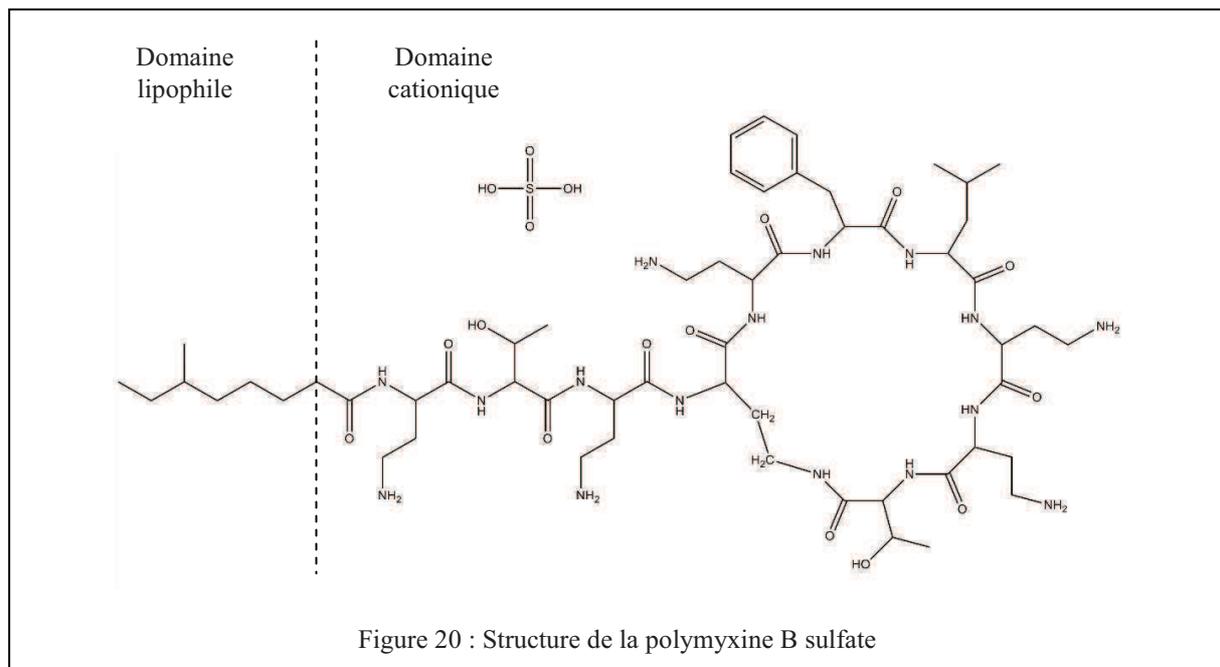
### III.1.3 La polymyxine B

Les polymyxines A, B, C, D, E, F, K, M, P, S et T sont des peptides cationiques cycliques qui ont été isolés de la bactérie *Bacillus polymyxa*. Ces molécules sont utilisées comme antibiotiques depuis 60 ans et agissent préférentiellement sur les bactéries à Gram-

négatif (Storm et al., 1977). De nos jours, seules la polymyxine B et la polymyxine E (ou colistine) sont utilisées en traitement thérapeutique.

La polymyxine B, comme tous les peptides antimicrobiens cationiques, possède un domaine cationique et un domaine lipophile (Fig. 20). Le domaine cationique de la polymyxine B s'associe à la surface des bactéries à Gram-négatif par interactions électrostatiques avec les groupements chargés négativement du LPS. Puis, grâce à son caractère amphipathique, la polymyxine B s'insère dans la membrane perturbant sa structure et sa perméabilité. Cette perturbation détruit la barrière osmotique de la bactérie et conduit à la lyse de la cellule.

La polymyxine B est active envers de nombreuses bactéries à Gram-négatif (*Bordetella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* etc.).



### III.2 Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens cationiques

Certaines espèces bactériennes sont constitutivement résistantes à la polymyxine. Par exemple, il a été démontré que la bactérie *Brucella abortus* est capable de résister à cet antibiotique dans des conditions de culture standard grâce à son système à deux-composants BvrS/BvrR. Ce système de transduction du signal joue un rôle dans le maintien de l'intégrité

de la membrane externe de la bactérie (Manterola et al., 2005). De même, la bactérie *Neisseria meningitidis* présente un niveau intrinsèque de résistance aux antibiotiques cationiques élevé. Il a été mis en évidence que cette capacité de résistance était liée à l'opéron *mtrCDE* qui code pour une pompe à efflux (MDR multidrug resistance transporter) (Tzeng et al., 2005).

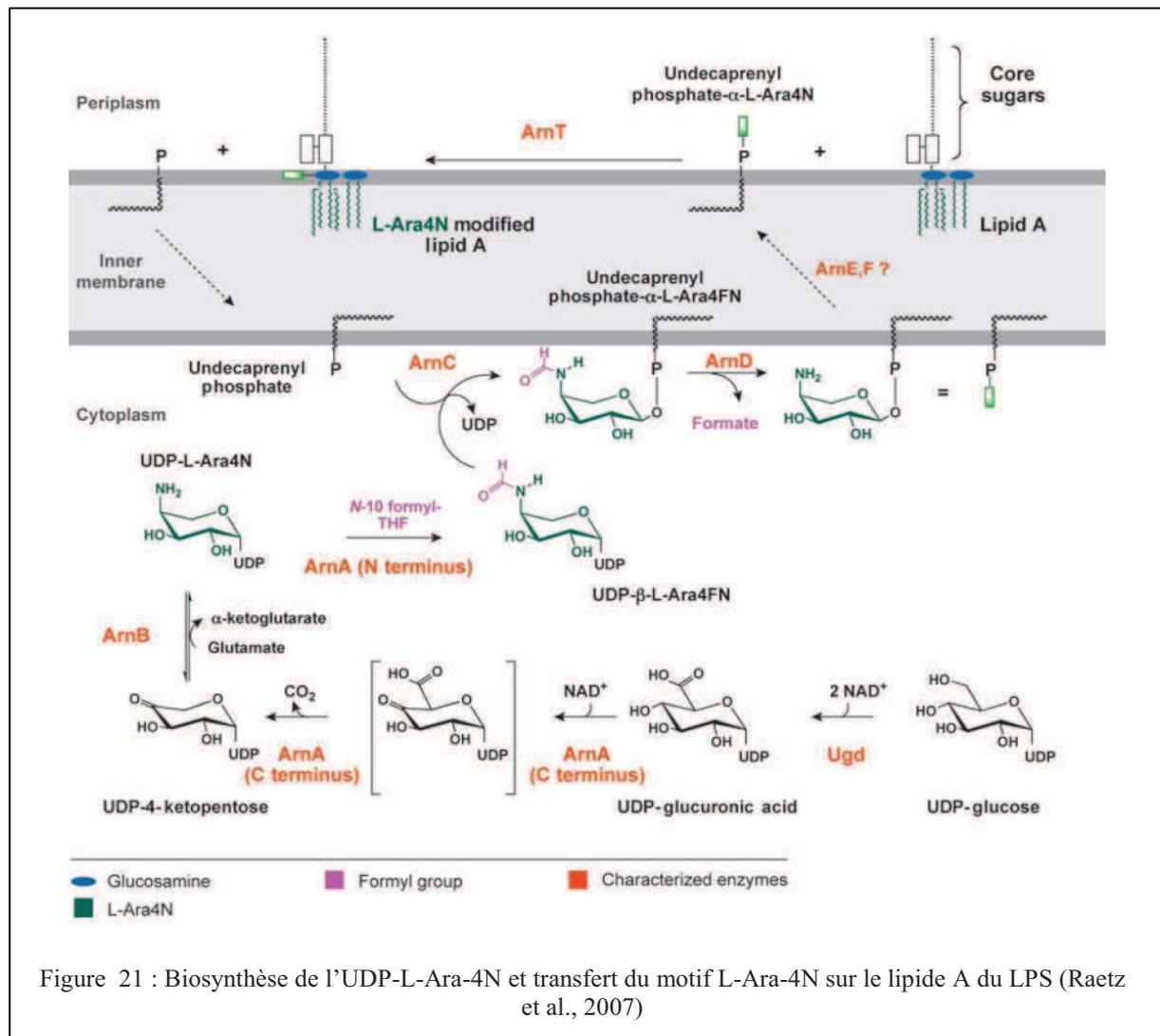
D'autres bactéries sont capables de développer, dans des conditions de culture spécifiques, différentes stratégies de résistance aux peptides antimicrobiens cationiques. Il a par exemple été observé que la couche d'exopolysaccharides pouvait protéger la bactérie *K. pneumoniae* des peptides antimicrobiens cationiques en limitant la diffusion de molécules extérieures vers l'intérieur de la cellule (Bengoechea et al., 2002). Il a également été mis en évidence que chez *Bifidobacterium breve*, la co-expression de deux gènes, codant pour des protéines homologues aux membres de la famille des ABC transporteurs permettait d'augmenter fortement la résistance de la bactérie à la polymyxine (Margolles et al., 2006). Enfin, un autre mécanisme adopté par les bactéries pour se soustraire à l'action des peptides antimicrobiens cationiques repose sur la modification de leur LPS. Il s'agit de la stratégie la plus documentée que nous allons détailler dans les paragraphes suivants.

### III.2.1 Modification par addition de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N) sur le lipide A du LPS

Le processus majeur adopté par les bactéries pathogènes à Gram-négatif pour échapper aux peptides cationiques antimicrobiens produit par le système immunitaire inné de l'hôte est la modification du lipide A de leur LPS par addition d'un composé particulier, le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N) (Vaara, 1981). Cette modification est un processus complexe qui nécessite la participation de plusieurs enzymes (Ugd, ArnA, ArnB, AnrC, ArnT...). Dans un premier temps, la protéine Ugd catalyse la formation d'UDP acide-glucuronique à partir d'UDP-glucose. Puis le composé est modifié par une enzyme bifonctionnelle : ArnA. L'extrémité C-terminale de la protéine ArnA catalyse la décarboxylation oxydative NAD<sup>+</sup>-dépendante de l'UDP acide-glucuronique, formant ainsi de l'UDP-4-ketopentose (ou UDP-Ara4O). Le composé formé est alors converti en UDP-L-Ara4N par l'aminotransférase ArnB. L'extrémité N-terminale de la protéine ArnA porte l'activité formyltransférase de l'enzyme et catalyse la transformation de l'UDP-L-Ara4N en UDP-β-L-Ara4FN en présence de N-10-formyltétrahydrofolate. La protéine ArnC permet le

transfert du résidu L-Ara4FN de la molécule d'UDP-β-L-Ara4FN à l'undécaprényl phosphate, formant ainsi de l'undécaprényl phosphate-α-L-Ara4FN. Ensuite, la protéine ArnD régule la déformylation de ce composé en undécaprényl phosphate-α-L-Ara4N. Après un mécanisme de transport encore inconnu impliquant les protéines ArnE et ArnF, le groupement L-Ara4N du lipide undécaprényl phosphate-α-L-Ara4N peut être transféré sur les groupements phosphates 1 et 4' du lipide A du LPS par la protéine ArnT (Trent et al., 2001b ; Breazeale et al., 2005) (Fig. 21 et 22).

La fixation du L-Ara4N diminue la charge négative nette du lipide A. Par conséquent, les interactions ioniques LPS/L-Ara4N avec des peptides cationiques sont limitées, ce qui permet à la bactérie de résister à leur toxicité en réduisant la pénétration de ces derniers dans la cellule (Trent et al., 2001a ; Ernst et al., 2003).



### III.2.2 Modification par addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A et le corps oligosaccharidique du LPS

La charge du lipide A du LPS peut également être modifiée par fixation d'une ou deux molécules de phosphoéthanolamine sur les groupements phosphate du lipide A (Zhou et al., 2001) (Fig. 22). L'enzyme EptA transfère majoritairement un groupement phosphoéthanolamine à partir de phosphatidyléthanolamine sur le phosphate 1 du lipide A, mais peut également sous certaines conditions de culture ou en absence de L-Ara4N modifier le phosphate 4'. L'incorporation de phosphoéthanolamine dans le lipide A d'*E. coli* K12 n'est observée qu'en conditions légèrement acides alors que dans la souche pathogène *E. coli* O157:H7, cette modification est exprimée de façon constitutive. *E. coli* et *S. typhimurium* possèdent également une seconde enzyme homologue à EtpA, la protéine EtpB capable de fixer un groupement phosphoéthanolamine sur un résidu Kdo (acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique) du corps oligosaccharidique du LPS (Raetz et al., 2007). Il a été démontré que l'addition de phosphoéthanolamine pouvait également avoir lieu sur le phosphate de l'heptose I du corps oligosaccharidique du LPS de *S. typhimurium* par l'intermédiaire de la protéine CptA (Tamayo et al., 2005) (Fig. 22). L'implication de l'addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A du LPS dans la résistance à la polymyxine a été clairement établie chez *Salmonella enterica* (Lee et al., 2004). Il semble que cette observation puisse être généralisée à l'ensemble des bactéries à Gram-négatif. L'addition de phosphoéthanolamine sur le lipide A du LPS conduit probablement à une diminution de la charge négative globale du LPS et, par conséquent, à une diminution de l'affinité des peptides cationiques antimicrobiens pour le LPS. En revanche, la relation entre la résistance à la polymyxine et la modification des résidus du corps oligosaccharidique du LPS (Kdo et heptose) est moins évidente.

### III.2.3 Modification par déphosphorylation des résidus osidiques du LPS

Chez *S. typhimurium*, le résidu Heptose II du corps oligosaccharidique du LPS est normalement phosphorylé par la protéine WaaY (aussi appelée RfaY). Dans certaines conditions de culture, la phosphatase PmrG est exprimée et déphosphoryle le résidu Heptose II (Fig. 22) (Nishino et al., 2006). Le gène *pmrG* n'est pas essentiel pour la résistance de *S. typhimurium* à la polymyxine. Cependant, il peut être envisagé que la déphosphorylation de

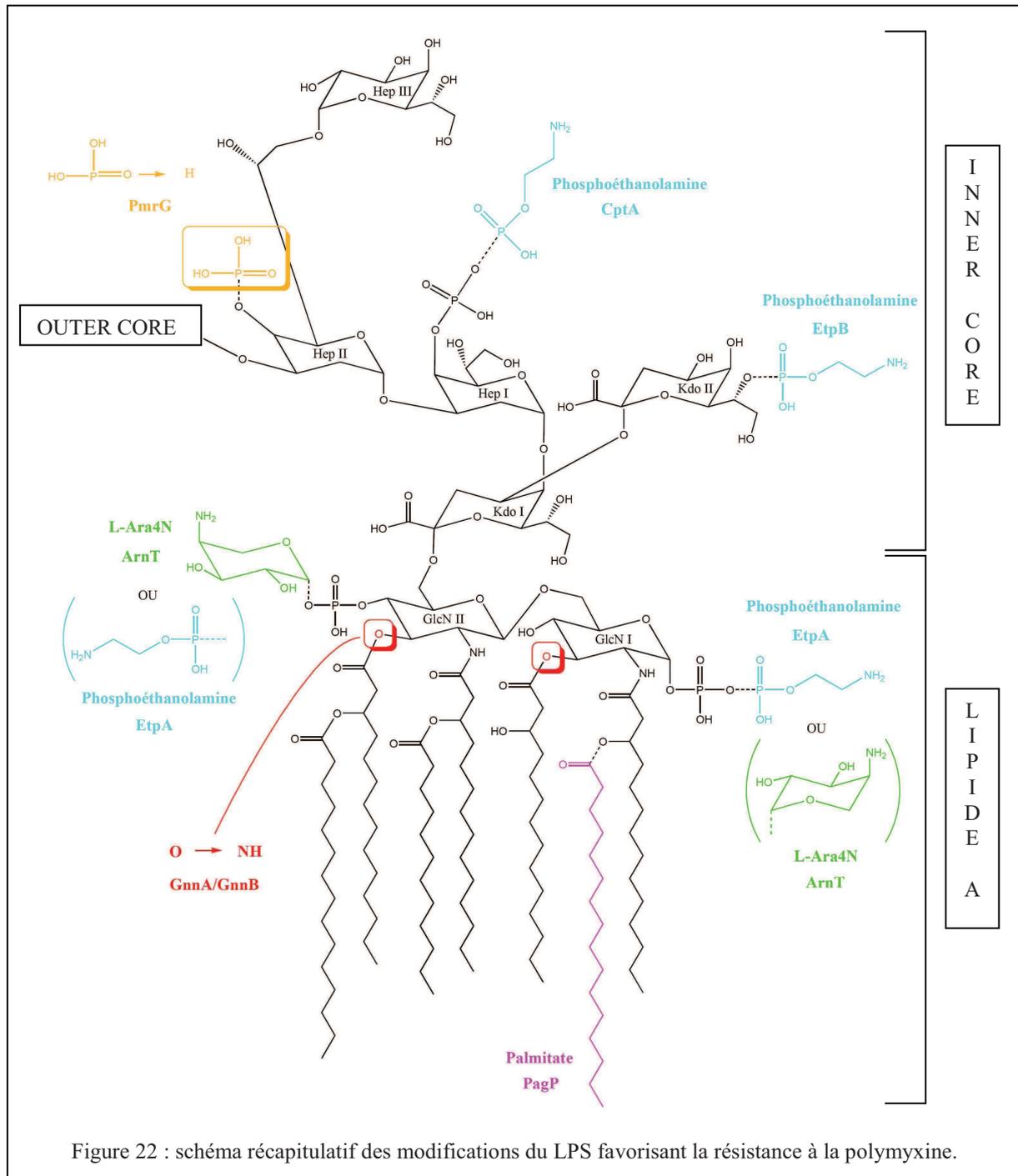
l'heptose II du corps oligosaccharidique du LPS participe à la diminution globale des charges négatives à l'extérieur de la cellule, et ainsi soustrait la bactérie à l'action des peptides antimicrobiens cationiques.

#### III.2.4 Modification par addition d'un palmitate sur le lipide A du LPS

Chez *S. typhimurium*, il a été démontré que la protéine PagP permet de modifier le lipide A comportant normalement 6 chaînes d'acide gras en un lipide A possédant 7 chaînes d'acide gras par ajout d'un résidu palmitate sur un groupement hydroxymyristate du lipide A (Fig. 22). Cette modification favorise la résistance de la bactérie à certains peptides antimicrobiens cationiques de type hélice  $\alpha$ , mais n'a apparemment pas d'influence sur la résistance à la polymyxine. Un homologue de PagP est retrouvé chez *E. coli* : il s'agit de la protéine CrcA. Le transfert d'un acide gras (acide palmitique) supplémentaire sur le lipide A renforce probablement l'imperméabilité de la membrane externe et doit prévenir l'entrée des peptides cationiques antimicrobiens, les empêchant ainsi d'endommager la membrane interne (Bishop et al., 2000).

#### III.2.5 Modification de la liaison des acides gras du lipide A du LPS

Chez *C. jejuni*, un nouveau mécanisme de modification du lipide A vient d'être mis en évidence (van Mourik et al., 2010). Il a été découvert que les protéines GnnA et GnnB sont capables de remplacer une liaison ester entre une chaîne d'acide gras et un sucre du lipide A par une liaison amide (Fig. 22). La liaison amide augmenterait la stabilité et l'imperméabilité de la membrane et permettrait ainsi d'améliorer la résistance de la bactérie aux peptides antimicrobiens cationiques.

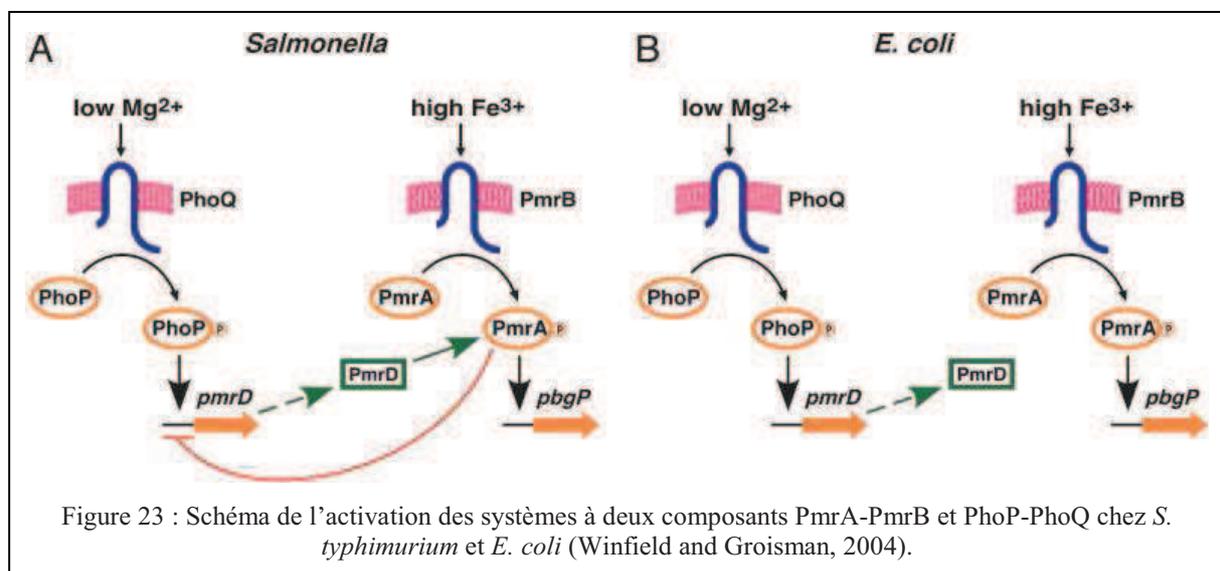


### III.2.6 Mécanismes d'induction de la résistance à la polymyxine par modification du LPS

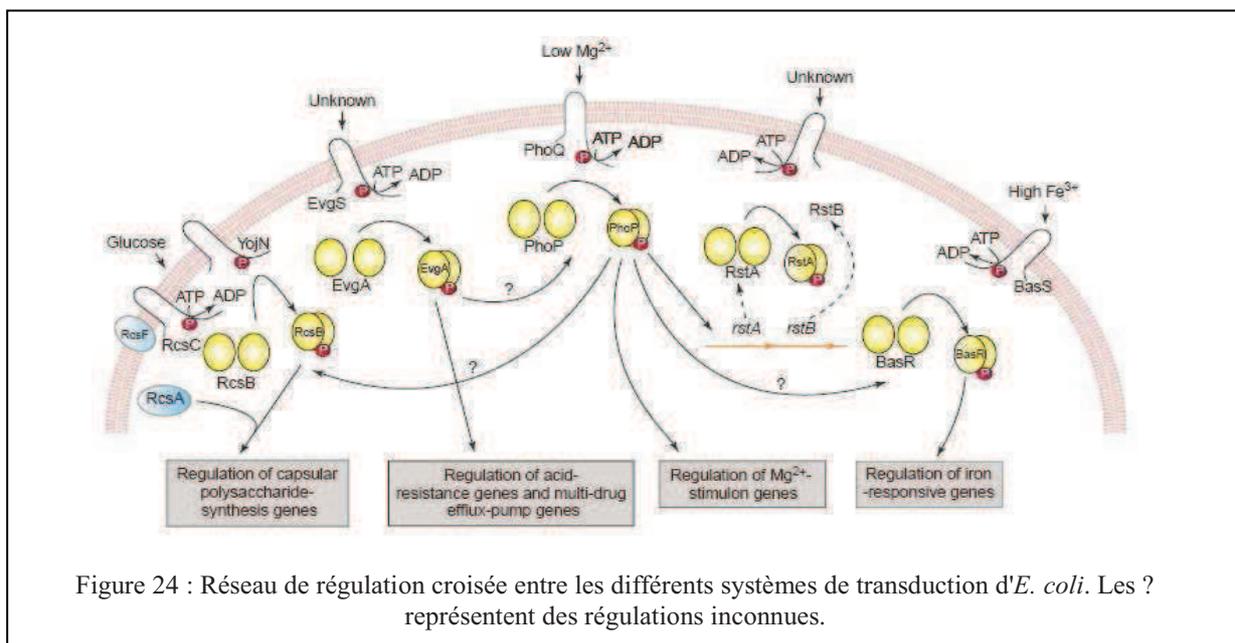
Les mécanismes d'induction de la résistance à la polymyxine ont principalement été étudiés chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Il a notamment été décrit que ces deux bactéries sensibles à la polymyxine dans des conditions de culture standards peuvent développer une résistance à cet antibiotique dans des conditions de culture particulières. Ainsi, de faibles

concentrations en  $Mg^{2+}$ , un pH légèrement acide ainsi que la présence de  $Fe^{3+}$  augmentent significativement le niveau de résistance de *S. typhimurium* à la polymyxine (Groisman, 2001). Ces différentes conditions de culture stimulent deux voies différentes de transduction du signal de type « système à deux composants ». La première fait intervenir les protéines PmrA/PmrB et répond à de fortes concentrations en  $Fe^{3+}$  (Fig. 23). Un milieu riche en fer active la protéine-kinase senseur PmrB, qui s'autophosphoryle puis transfère son groupement phosphate sur la protéine régulatrice PmrA. Cette dernière, une fois phosphorylée, active la transcription de nombreux gènes comme le gène *ugd* (= *pmrE*) et l'opéron *arn* (= *pbgPE* ou *pmrHIJKLM*), le gène *pmrC* (= *eptA*) et enfin le gène *pmrG*. Ces gènes sont impliqués respectivement dans la synthèse du L-Ara4N, la synthèse de la phosphoéthanolamine et la déphosphorylation de l'Hep (II) chez *S. typhimurium* (Gunn et al., 1998). La seconde voie fait intervenir les protéines PhoP/PhoQ. Elle est stimulée par de faibles concentrations en  $Mg^{2+}$  et un pH légèrement acide. Dans ces conditions, la protéine senseur PhoQ, activée par autophosphorylation, phosphoryle l'activateur transcriptionnel PhoP, qui induit la transcription de nombreux gènes parmi lesquels le gène *pmrD*. La protéine PmrD active elle-même la voie PmrA/PmrB et conduit à l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la modification du LPS permettant la résistance à la polymyxine chez *S. typhimurium* (Roland and Spitznagel, 1995 ; Groisman et al., 1997 ; Groisman, 2001) (Fig. 30).

Chez *E. coli*, il a été démontré que les deux systèmes à deux composants PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB (parfois appelé BasR/BasS) étaient essentiels à la résistance à la polymyxine, mais ces deux voies de transduction du signal semblent indépendantes l'une de l'autre (Winfield and Groisman, 2004) (Fig. 23). En effet, la protéine PmrD ne semble pas influencer la voie PmrA/PmrB.



De plus, il semble que ces systèmes à deux composants font partie d'un réseau de régulation extrêmement complexe en étant interconnectés à d'autres systèmes à deux composants (EvgS/EvgA, RcsC/RcsB, RstB/RstA, BasS/BasR) qui n'interviennent pas directement dans la résistance aux antibiotiques cationiques (Eguchi and Utsumi, 2005) (Fig. 24). Il est également démontré chez *S. enterica* qu'il peut y avoir association entre les systèmes de transduction RcsA/RcsB, PhoQ/PhoP et PmrB/PmrA pour la transcription de gènes cibles, comme le gène *ugd* (Mouslim and Groisman, 2003). D'ailleurs, il a été rapporté récemment que les séquences consensus reconnues par les effecteurs transcriptionnels PmrA et RcsB étaient assez similaires (Delgado et al., 2006).



### III.3 Rôle de la protéine Etk dans la résistance à la polymyxine

Il a été démontré que la BY-kinase Etk est indispensable à la résistance d'*E. coli* K12 à la polymyxine. En effet une souche d'*E. coli* inactivée sur le gène *etk* est incapable de développer un phénotype de résistance à cet antibiotique (Lacour et al., 2006).

Au laboratoire, une étude sur l'influence de la phosphorylation d'Etk dans la résistance à la polymyxine a été entreprise (résultats non publiés). Il a été constaté que l'activité kinase de la protéine Etk est indispensable à la résistance à la polymyxine. En effet, le niveau de résistance d'une souche exprimant la protéine Etk inactivée par mutation de la

lysine de son Walker A est environ dix fois plus faible que celui de la souche exprimant la protéine Etk sauvage. Dans les mêmes conditions, une souche exprimant la protéine Etk active mais non phosphorylable sur les tyrosines de son tyrosine cluster, présente un niveau de résistance intermédiaire (20% contre 47% pour la sauvage), indiquant que l'état de phosphorylation de la protéine Etk semble également influencer la résistance à la polymyxine.

La caractérisation de la structure cristallographique d'Etk (Lee et al., 2008) a également permis de formuler des hypothèses quant au mécanisme de régulation de la résistance à la polymyxine par Etk. Les auteurs ont, en particulier, étudié l'influence du mécanisme d'activation d'Etk (libération du site catalytique suite à l'autophosphorylation de la Tyr<sup>574</sup> et à la subséquente rotation de sa chaîne latérale vers l'Arg<sup>614</sup>) sur la capacité de résistance d'*E. coli* à la polymyxine. Ils ont observé qu'une souche d'*E. coli* exprimant la protéine Etk Y574A (site catalytique libre) présente une résistance à la polymyxine comparable à celle de la souche sauvage, tandis qu'une souche exprimant la protéine Etk Y574F (interaction impossible avec Arg<sup>614</sup>, site catalytique non accessible) est très sensible à la polymyxine. De la même manière, une souche exprimant la protéine Etk R614A (interaction impossible avec P-Y574, site catalytique encombré) perd sa capacité de résistance à la polymyxine. Ceci suggère que la fonction kinase d'Etk est indispensable dans le développement de la résistance à la polymyxine de la bactérie. Une étude très préliminaire a également montré que les résidus Lys<sup>478</sup>, Arg<sup>479</sup> et Arg<sup>481</sup> du domaine RK étaient indispensables à la résistance de la bactérie à la polymyxine.

En revanche, la BY-kinase Wzc ne semble pas impliquée dans la résistance d'*E. coli* K12 à la polymyxine puisque l'inactivation du gène *wzc* ne modifie quasiment pas le niveau de résistance de la bactérie à cet antibiotique. D'autre part, il a été observé que l'expression de la protéine Wzc, dans une souche inactivée au niveau du gène *etk*, ne permet pas de restaurer la résistance à la polymyxine. Il semble donc que les protéines Wzc et Etk, bien que fortement homologues, ne sont pas interchangeables et ont chacune des propriétés particulières qui leur confèrent un rôle spécifique au sein de la cellule bactérienne.

Le mécanisme par lequel Etk module la résistance à la polymyxine n'est pas encore connu. Cependant, nous venons de voir que la protéine Ugd intervient dans la biosynthèse du L-Ara4N et, par conséquent, dans l'un des processus majeurs de résistance à la polymyxine. Or, il a été démontré que l'activité de la protéine Ugd est augmentée par phosphorylation par la BY-kinase Wzc (Grangeasse et al., 2003). Nous pouvons donc envisager qu'Etk, comme

Wzc, augmente l'activité catalytique d'Ugd par phosphorylation, et joue ainsi un rôle indirect dans la résistance à la polymyxine en favorisant la production de L-Ara4N et sa subséquente fixation sur le lipide A du LPS, empêchant ainsi la polymyxine de se fixer à la membrane cellulaire. Etk pourrait également intervenir directement dans la résistance à la polymyxine. En effet, chez *E. coli*, le gène *etk* appartient à un opéron de synthèse de capsule de groupe 4 (Peleg et al., 2005). Or une étude réalisée chez *K. pneumoniae* montre que les polysaccharides capsulaires augmentent la résistance à la polymyxine en limitant les interactions de cette dernière avec la surface de la bactérie (Campos et al., 2004).

**MATERIELS**

**&**

**METHODES**

## I Matériels

<i>Appareil PCR :</i>	- MJ Mini (Biorad)
<i>Bain sec :</i>	- Digital Heatblock (VWR)
<i>Bain marie :</i>	- GD100 (Grant)
<i>Balance :</i>	- PC2000 (Mettler Toledo)
<i>Cassette d'autoradiographie :</i>	- Biomax MS intensifying screen (Kodak)
<i>Centrifugeuses :</i>	- Centrifuge 5424 (Eppendorf) - Multifuge 1S-R (Heraeus) - RC 5B plus (Sorval)
<i>Développeuse :</i>	- X-Omat 2000 processor (Kodak)
<i>DLS :</i>	- Zetasizer Nano series (Malvern instruments)
<i>Electrophorèse en gel d'agarose :</i>	- Run One (Embi Tec)
<i>Electrophorèse en gel de polyacrylamide :</i>	- Miniprotean III (BioRad)
<i>Electroporateur :</i>	- Pulse controller / Gene pulser (BioRad)
<i>Évaporateur :</i>	- Speevac RH40-11 (Savant)
<i>Générateur :</i>	- Model 1000/500 (BioRad)
<i>Incubateur :</i>	- Minitron (Infors HT)
<i>Lyophilisateur :</i>	- Christ alpha 1-4 (BioBlock scientifique)
<i>pH-mètre :</i>	- WTW series pH 720 (Inolabo)
<i>Sécheur de gel :</i>	- Model 583 (BioRad)
<i>Sonicateur :</i>	- Sonifier 250 (Branson)
<i>Spectromètre à scintillation liquide :</i>	- Tri Carb 2100 TR (Packard)
<i>Spectrophotomètres :</i>	- Biophotometer (Eppendorf) - Infinite M1000 (Tecan)
<i>Transfert de gel :</i>	- Transblot SD semi dry transfer cell (BioRad)
<i>Transilluminateur :</i>	- Baby imager (Appligène oncor)

## II Méthodes

### II.1 Souches, plasmides et milieux de culture

#### II.1.1 Caractéristiques des souches bactériennes

Les souches d'*E. coli* utilisées sont répertoriées dans le tableau 2. Elles sont conservées à -80°C dans leur milieu de culture additionné de glycérol à une concentration de 50%. Pour l'utilisation courante, les cultures d'*E. coli* sont effectuées en milieu liquide à 37°C sous agitation.

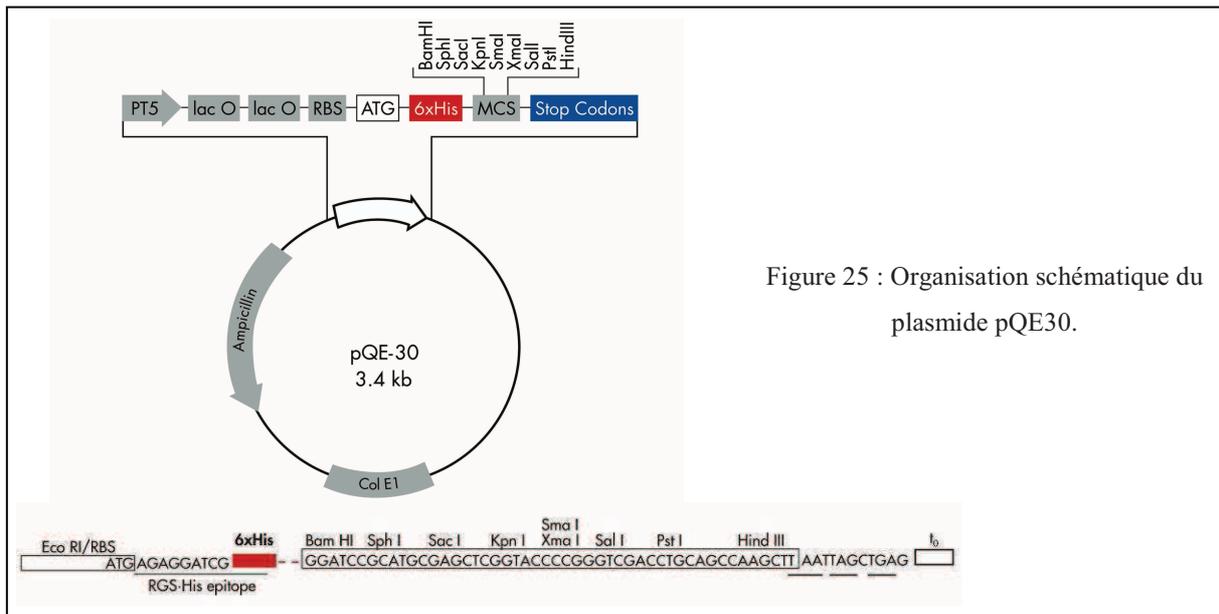
Souches	Génotypes	Références
BL21 (DE3)	<i>HsdS gal (lacIts85, ind1, nin5, lacUV5-T7 gene1</i>	(Studier and Moffatt, 1986)
BL21 pREP4- <i>groESL</i>	<i>F', dmc, ompT, hsd S (r<sup>-</sup>B m<sup>-</sup>B) galλ, pREP4 groESL</i>	(Amrein et al., 1995)
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, (φ80 ΔlacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	(Hanahan, 1983)
JM 83	<i>F-ara Δ(lac-proAB) rpsL(Str<sup>R</sup>) (φ80 ΔlacZΔM15) thi</i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
XL1-Blue	<i>(supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>, [proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>R</sup>)])</i>	(Bullock et al., 1987)
W3110	<i>IN (rrnD-rrnG)1, rph-I, F-, λ-</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, Yale university

Tableau 2 : Description des souches utilisées.

#### II.1.2 Plasmides

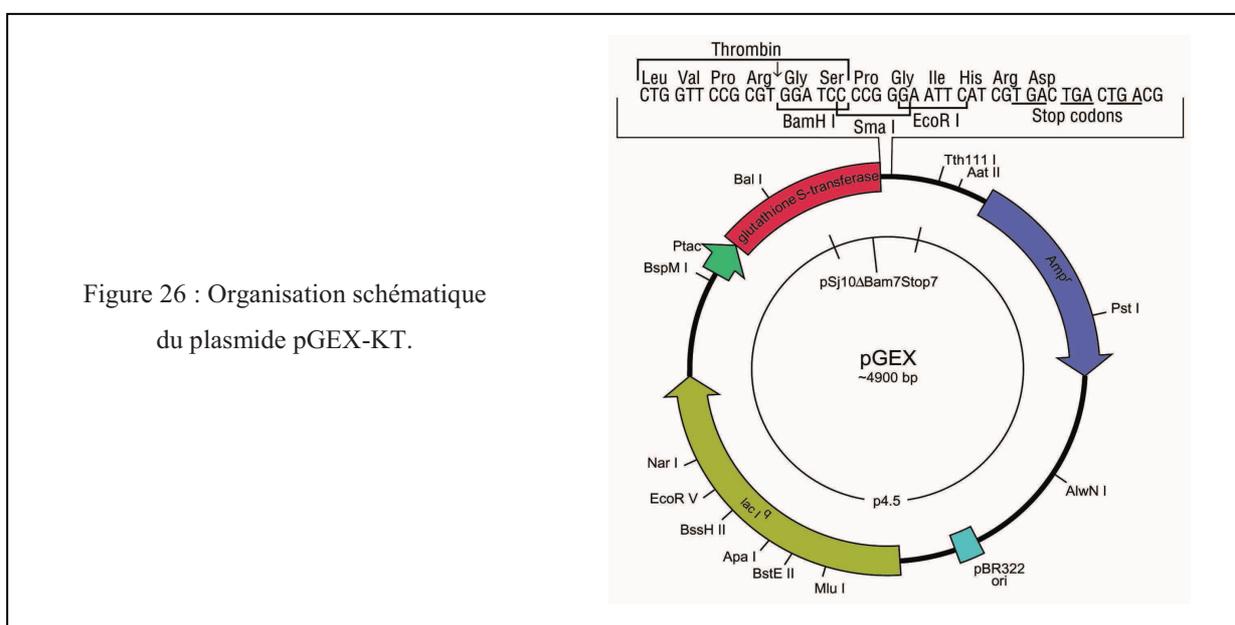
##### II.1.2.1 Le plasmide pQE30

Le plasmide pQE30 (Fig. 25) est commercialisé par la société Qiagen. Il possède un site multiple de clonage (MCS) permettant de fusionner six résidus histidyles du côté N-terminal de la protéine à étudier. L'expression de la protéine recombinante est sous la dépendance d'une région comprenant le promoteur du phage T5 et deux séquences opératrices *lac*. Par ailleurs, ce plasmide porte une cassette de résistance à l'ampicilline.



### II.1.2.2 Le plasmide pGEX-KT

Le plasmide pGEX-KT (Fig. 26) est commercialisé par la société Amersham-Biosciences. Il permet de fusionner la protéine Glutathion-S-transférase (GST) issue de *Schistosoma japonicum* (Smith et al., 1986) à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt dont le gène peut être cloné dans le site multiple de clonage situé à l'extrémité 3' du gène codant pour la GST. Entre la GST et la protéine d'intérêt, le plasmide code pour un site de digestion à la thrombine. L'expression de la protéine recombinante est sous la dépendance d'une région comprenant le promoteur *tac* et la séquence opératrice *lac*. Ce plasmide porte également le gène *lacI<sup>f</sup>* permettant de réprimer le système jusqu'à induction par l'IPTG. Ce plasmide confère la résistance à l'ampicilline.



### II.1.2.3 Le plasmide pGEX(M)

Le plasmide pGEX(M) a été construit au laboratoire et dérive du plasmide pGEX-KT (Molle et al., 2004). Le fragment *EcoRI/BamHI* de 321pb du plasmide pET19b a été inséré au niveau des sites *BamHI* et *EcoRI* du site multiple de clonage du pGEX-KT. Il permet d'introduire un site *HindIII* dans le MCS.

### II.1.2.4 Le plasmide pET15b

Le plasmide pET15b est commercialisé par la Société Novagen (Fig. 27). Ce plasmide permet de fusionner six résidus histidyles à l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt. Il possède un site de coupure à la thrombine suivi du site de clonage multiple. L'expression de la protéine hybride est sous la dépendance d'une région comprenant le promoteur du phage T7 et la séquence opératrice *lac*. Ce plasmide exprime également le répresseur *LacI<sup>q</sup>*, permettant ainsi un meilleur contrôle de la surproduction de la protéine recombinante. Ce plasmide confère la résistance à l'ampicilline.

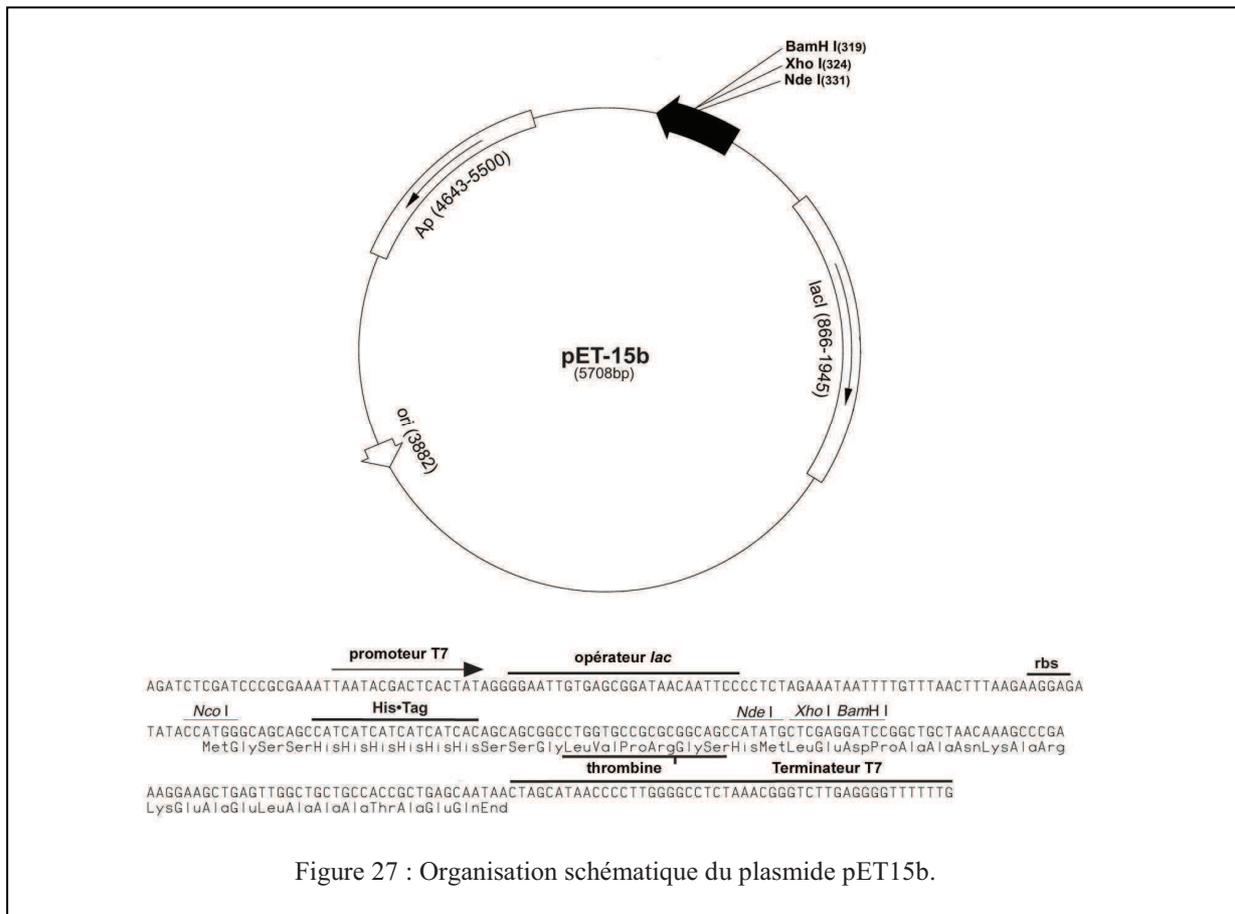
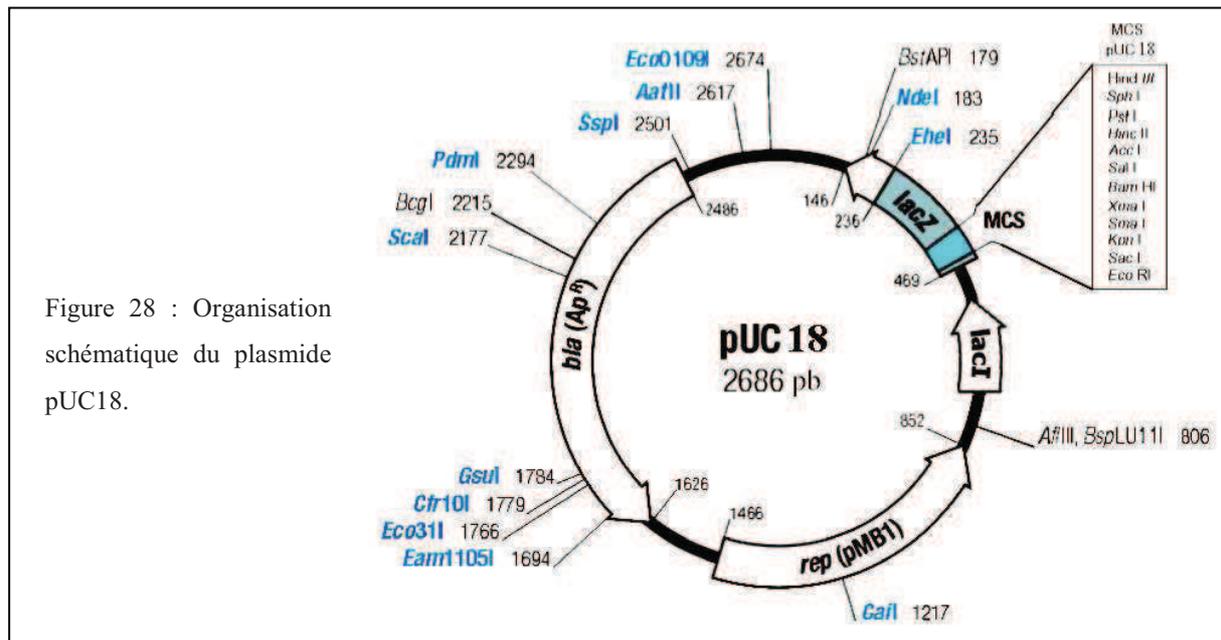


Figure 27 : Organisation schématique du plasmide pET15b.

### II.1.2.5 Le plasmide pUC18

Le plasmide pUC18 (Fig. 28) dérive du plasmide pBR322 et du phage M13mp18 (Yanisch-Perron et al., 1985). Ce vecteur comporte le gène *lacZ* codant pour le peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase et permet ainsi une sélection par  $\alpha$ -complémentation en présence de X-Gal. Un site de clonage multiple a été inséré au niveau du gène *lacZ*. Ce vecteur possède également le gène *lacI<sup>f</sup>* permettant de réprimer le système jusqu'à induction par l'IPTG et confère la résistance à l'ampicilline.



### II.1.2.6 Le plasmide pUC18-rcsA.

Le plasmide pUC18-*rcsA* a été construit au laboratoire (Vincent et al., 2000). Un fragment de 818 pb contenant le gène *rcsA* d'*E. coli* et sa région promotrice a été amplifié par PCR (Bullock et al., 1987), puis inséré dans le vecteur pUC18 au niveau des sites de restriction *Bam*HI/*Hind*III.

### II.1.2.7 Le plasmide pREP4-groESL

Le plasmide pREP4-*groESL* (Fig. 29) a été décrit par Amrein et al. (1995). Sa construction a été effectuée à partir de l'opéron contenant les gènes *groES* et *groEL* d'*E. coli* et le plasmide pREP4 distribué par la société QIAGEN. Ce plasmide code pour le répresseur

LacI<sup>q</sup>, permettant ainsi de contrôler le système d'expression des protéines chaperones GroES et GroEL par induction à l'IPTG. Il porte aussi un gène de résistance à la kanamycine.

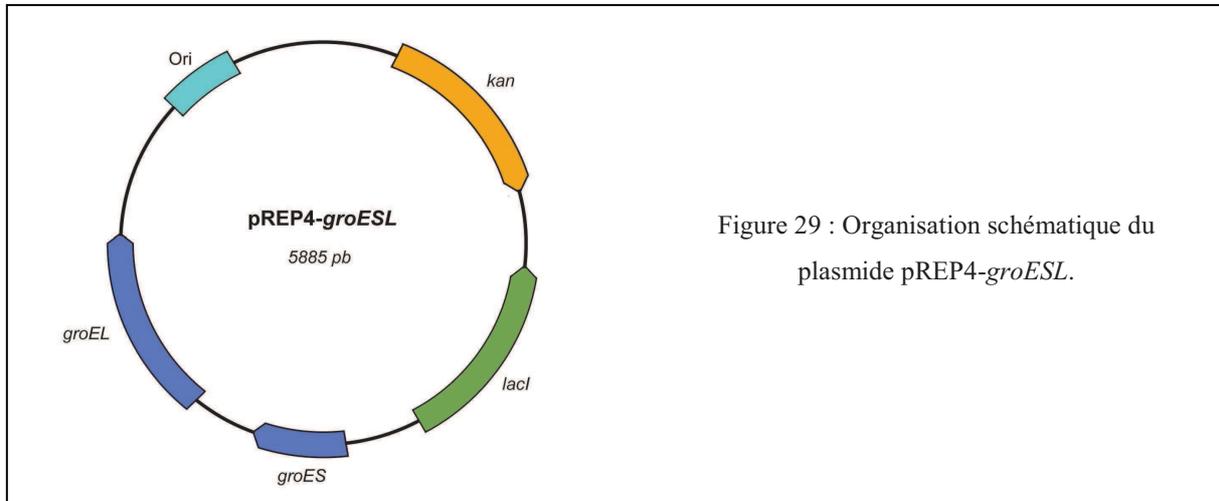


Figure 29 : Organisation schématique du plasmide pREP4-groESL.

### II.1.2.8 Le plasmide pRedET

Le plasmide pRedET (Fig. 30) est un plasmide thermosensible, commercialisé par la société Gene Bridges. Il est utilisé pour favoriser la recombinaison de fragments PCR dans le génome d'*E. coli* dans le but d'inactiver un gène d'intérêt. Ce plasmide comporte les gènes *red $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$*  du phage  $\lambda$  en opéron avec le gène *recA*. L'expression de ses gènes est sous la dépendance du promoteur pBAD, inductible à l'arabinose (Guzman et al., 1995). Il exprime également la protéine RepA. Cette protéine est nécessaire à la réplication du plasmide et à sa répartition entre les deux cellules filles au moment de la division (Miller et al., 1995). RepA est une protéine thermosensible, ce qui impose de réaliser les cultures bactériennes à 30°C pour maintenir le plasmide. Par ailleurs, ce vecteur confère la résistance à la tétracycline.

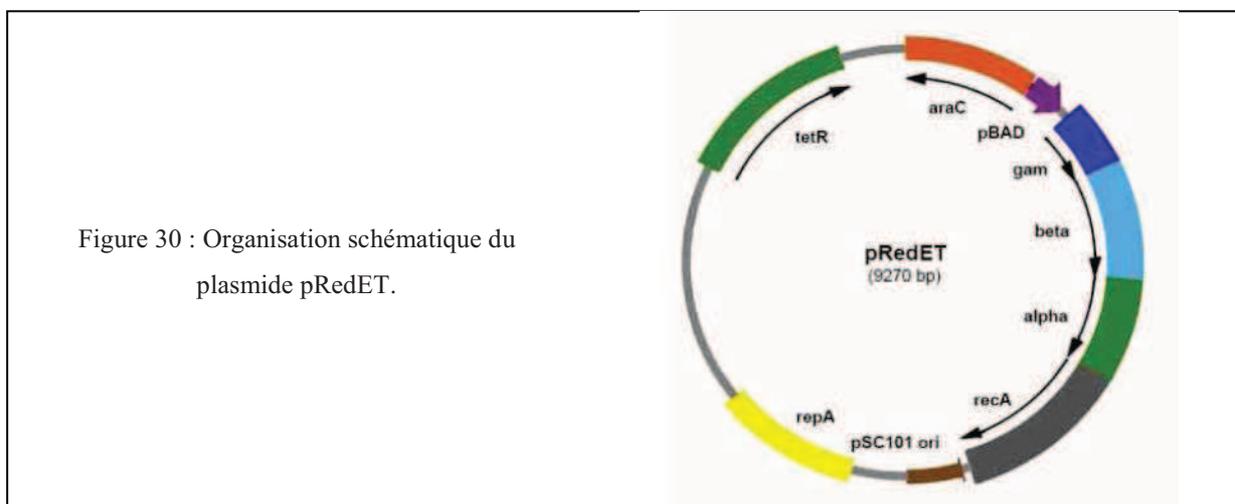
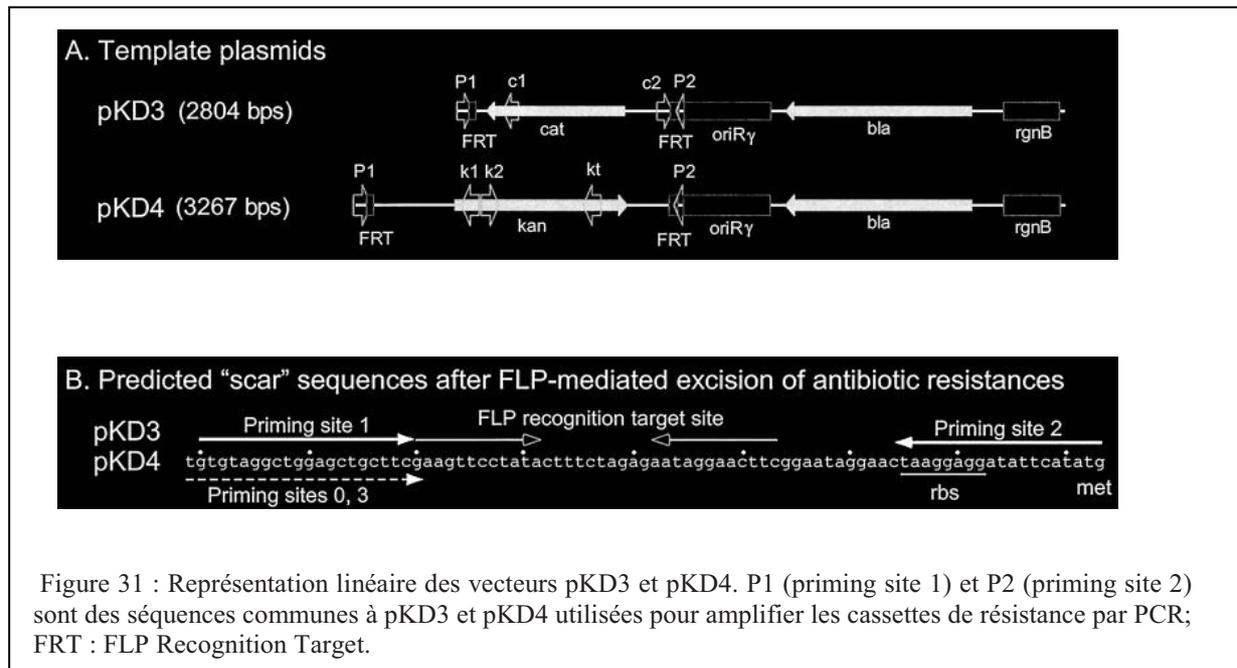


Figure 30 : Organisation schématique du plasmide pRedET.

### II.1.2.9 Les plasmides pKD3 et pKD4

Les plasmides pKD3 et pKD4 contiennent respectivement un gène de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, flanqué de la séquence FRT (FLP Recognition Target) (Datsenko and Wanner, 2000). Ces vecteurs sont utilisés lors de l'inactivation de gène en tant que matrice pour l'amplification d'un fragment PCR comportant le gène de résistance désiré entouré des zones d'homologie du gène à supprimer (Fig. 31).



### II.1.2.10 Plasmides utilisés pour cette étude

Les plasmides construits ou utilisés lors de cette étude sont décrits dans le tableau 3.

Tableau 3 : Plasmides construits et utilisés pour cette étude.

Plasmide	Caractéristiques	Références	Amorces utilisées
pQE30- <i>A1B2</i>	Code pour la protéine chimérique Cap5A1 <sub>cyto</sub> -Cap5B2 (notée par la suite A1B2), fusionnant le fragment cytoplasmique de la protéine Cap5A1 de la Lys <sup>193</sup> à l'Asn <sup>222</sup> à la protéine Cap5B2 entière. Le fragment du gène chimérique <i>A1B2</i> (783 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III dans le plasmide pQE30, Amp <sup>R</sup> .	(Soulat et al., 2006)	
pQE30- <i>A1B2</i> Y(YC)F	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 4 tyrosines du tyrosine cluster de B2 (Tyr <sup>221, 222, 224, 225</sup> ) en phénylalanines.	Cette étude	1 et 4
pQE30- <i>A1B2</i> Y(YC)E	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 4 tyrosines du tyrosine cluster de B2 (Tyr <sup>221, 222, 224, 225</sup> ) en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 5

pQE30- <i>A1B2</i> <i>YYYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la dernière tyrosine (Tyr <sup>225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acide glutamique.	Cette étude	1 et 6
pQE30- <i>A1B2</i> <i>YYFF</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la dernière tyrosine (Tyr <sup>225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanine.	Cette étude	1 et 7
pQE30- <i>A1B2</i> <i>EYYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la première tyrosine (Tyr <sup>221</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acide glutamique.	Cette étude	1 et 8
pQE30- <i>A1B2</i> <i>FYYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la première tyrosine (Tyr <sup>221</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanine.	Cette étude	1 et 9
pQE30- <i>A1B2</i> <i>YYEE</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 2 dernières tyrosines (Tyr <sup>224, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 10
pQE30- <i>A1B2</i> <i>YYFF</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 2 dernières tyrosines (Tyr <sup>224, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanines.	Cette étude	1 et 11
pQE30- <i>A1B2</i> <i>EEYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 2 premières tyrosines (Tyr <sup>221, 222</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 12
pQE30- <i>A1B2</i> <i>FFYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 2 premières tyrosines (Tyr <sup>221, 222</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanines.	Cette étude	1 et 13
pQE30- <i>A1B2</i> <i>YEEE</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 3 dernières tyrosines (Tyr <sup>222, 224, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 14
pQE30- <i>A1B2</i> <i>YFFF</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 3 dernières tyrosines (Tyr <sup>222, 224, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanines.	Cette étude	1 et 15
pQE30- <i>A1B2</i> <i>EEYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 3 premières tyrosines (Tyr <sup>221, 222, 224</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 16
pQE30- <i>A1B2</i> <i>FFYY</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 3 premières tyrosines (Tyr <sup>221, 222, 224</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanines.	Cette étude	1 et 17
pQE30- <i>A1B2</i> <i>EEYE</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 2 premières et la dernière tyrosine (Tyr <sup>221, 222, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 18
pQE30- <i>A1B2</i> <i>FFYF</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation des 2 premières et de la dernière tyrosine (Tyr <sup>221, 222, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanines.	Cette étude	1 et 19
pQE30- <i>A1B2</i> <i>EYEE</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la première et des 2 dernières tyrosines (Tyr <sup>221, 224, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en acides glutamiques.	Cette étude	1 et 20
pQE30- <i>A1B2</i> <i>FYFF</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la première et des 2 dernières tyrosines (Tyr <sup>221, 224, 225</sup> ) du tyrosine cluster de B2 en phénylalanines.	Cette étude	1 et 21
pQE30- <i>A1B2</i> <i>ERR/A</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de l'acide glutamique (Glu <sup>23</sup> ) ainsi que des deux arginines (Arg <sup>26, 29</sup> ) de B2 en alanines.	Cette étude	1 et 22, puis 3
pQE30- <i>A1B2</i> <i>F221A</i>	Idem pQE30- <i>A1B2</i> avec mutation de la phénylalanine (Phe <sup>221</sup> ) de A1 en alanine.	Cette étude	1 et 23, puis 3
pET15b- <i>A1</i>	Code pour la protéine Cap5A1 entière. Le fragment du gène <i>A1</i> (669 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Nde</i> I dans le plasmide pET15b, Amp <sup>R</sup> .	(Soulat et al., 2006)	

pET15b-B2	Code pour la protéine Cap5B2 entière. Le fragment du gène B2 (693 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I dans le plasmide pET15b, Amp <sup>R</sup> .	(Soulat et al., 2006)	
pQE30-B2 ERR/A	Code pour la protéine B2 ayant l'acide glutamique (Glu <sup>23</sup> ) ainsi que les deux arginines (Arg <sup>26, 29</sup> ) mutés en alanines. Le fragment du gène B2 (693 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III dans le plasmide pQE30, Amp <sup>R</sup> .	Cette étude	2 et 22, puis 3
pQE30-A1B2 K55M	Idem pQE30-A1B2 avec mutation la lysine (Lys <sup>55</sup> ) du Walker A de B2 en méthionine.	(Soulat et al., 2006)	
pQE30-wzc <sub>cyto</sub>	Code pour le fragment cytoplasmique de la protéine Wzc de la Ser <sup>447</sup> à la Lys <sup>720</sup> . Le fragment du gène <i>wzc</i> (822 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III dans le vecteur pQE30; Amp <sup>R</sup> .	(Grangeasse et al., 2002)	
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> RKdel	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec suppression du domaine RK (Asp <sup>480</sup> -Gln <sup>493</sup> ).	Cette étude	28 et 27, puis 26
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> K477A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la lysine (Lys <sup>477</sup> ) en alanine.	Cette étude	26 et 29, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> D480A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de l'acide aspartique (Asp <sup>480</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 30, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> K483A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la lysine (Lys <sup>483</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 31, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> K486A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la lysine (Lys <sup>486</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 32, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> K489A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la lysine (Lys <sup>489</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 33, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> R490A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de l'arginine (Arg <sup>490</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 34, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> Y491A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>491</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 35, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> K492A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la lysine (Lys <sup>492</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 36, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> Q493A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la glutamine (Gln <sup>493</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	26 et 37, puis 27
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> K540M	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la lysine (Lys <sup>540</sup> ) du Walker A en alanine.	(Grangeasse et al., 2002)	
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> Y569A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>569</sup> ) en alanine.	Cette étude	38 et 27, puis 26
pQE30-wzc <sub>cyto</sub> ERR/A	Idem pQE30-wzc <sub>cyto</sub> avec mutation de l'acide glutamique (Glu <sup>508</sup> ) ainsi que des deux arginines (Arg <sup>511, 514</sup> ) en alanines.	Cette étude	39 et 27, puis 26
pUC18-wzc-rcsA	Code pour la protéine Wzc entière. Le fragment du gène <i>wzc</i> (2163 pb), précédé d'une séquence RBS améliorée, est cloné en <i>Eco</i> RI/ <i>Acc</i> 65I dans le vecteur pUC18- <i>rscA</i> ; Amp <sup>R</sup> .	(Vincent et al., 2000)	
pUC18-wzc RKdel-rcsA	Idem pUC18-wzc-rcsA avec suppression du domaine RK (Asp <sup>480</sup> -Gln <sup>493</sup> ).	Cette étude	28 et 25, puis 24
pUC18-wzc K477A-rcsA	Idem pUC18-wzc-rcsA avec mutation de la lysine (Lys <sup>477</sup> ) en alanine.	Cette étude	24 et 29, puis 25

pUC18- <i>wzc D480A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de l'acide aspartique (Asp <sup>480</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	24 et 30, puis 25
pUC18- <i>wzc K489A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de la lysine (Lys <sup>489</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	24 et 33, puis 25
pUC18- <i>wzc R490A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de l'arginine (Arg <sup>490</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	24 et 34, puis 25
pUC18- <i>wzc Y491A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>491</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	24 et 35, puis 25
pUC18- <i>wzc K492A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de la lysine (Lys <sup>492</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	24 et 36, puis 25
pUC18- <i>wzc Q493A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de la glutamine (Gln <sup>493</sup> ) du domaine RK en alanine.	Cette étude	24 et 37, puis 25
pUC18- <i>wzc K540M-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de la lysine (Lys <sup>540</sup> ) du Walker A en alanine.	(Doublet et al., 2002)	
pUC18- <i>wzc Y569A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>569</sup> ) en alanine.	Cette étude	38 et 25, puis 24
pUC18- <i>wzc ERR/A-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>wzc-rcsA</i> avec mutation de l'acide glutamique (Glu <sup>508</sup> ) ainsi que des deux arginines (Arg <sup>511, 514</sup> ) en alanines.	Cette étude	39 et 25, puis 24
pQE30- <i>etk<sub>cyto</sub></i>	Code pour le fragment cytoplasmique de la protéine Etk de l'alanine (Ala <sup>447</sup> ) à l'acide glutamique (Glu <sup>726</sup> ). Le fragment du gène <i>etk</i> (843 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III dans le vecteur pQE30; Amp <sup>R</sup> .	Cette étude	40 et 41
pGEX-KT- <i>etk</i>	Code pour la protéine Etk entière. Le fragment du gène <i>etk</i> (2178 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I dans le vecteur pGEX-KT; Amp <sup>R</sup> .	(Vincent et al., 2000)	
pQE30- <i>ugd</i>	Code pour la protéine Ugd. Le fragment du gène <i>ugd</i> (1164 pb) est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III dans le vecteur pQE30, Amp <sup>R</sup> .	(Grangeasse et al., 2003)	
pQE30- <i>ugd Y10F</i>	Idem pQE30- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>10</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	53 et 48
pQE30- <i>ugd Y71F</i>	Idem pQE30- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>71</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	47 et 54, puis 48
pQE30- <i>ugd Y150F</i>	Idem pQE30- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>150</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	47 et 55, puis 48
pQE30- <i>ugd Y249F</i>	Idem pQE30- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>249</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	56 et 48, puis 47
pQE30- <i>ugd Y335F</i>	Idem pQE30- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>335</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	57 et 48, puis 47
pQE30- <i>ugd Y380F</i>	Idem pQE30- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>380</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	47 et 58
pUC18- <i>rcsA</i>	Permet l'expression du phénotype mucoïde dans la bactérie <i>E. coli</i> . Un fragment du gène <i>rcsA</i> (818 pb), précédé de sa région promotrice, est cloné en <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III dans le vecteur pUC18, Amp <sup>R</sup> .	(Vincent et al., 2000)	
pUC18- <i>ugd-rcsA</i>	Code pour la protéine Ugd. Le fragment du gène <i>ugd</i> (1167 pb), précédé d'une séquence RBS améliorée, est cloné en	Cette étude	50 et 52

	<i>SacI/Acc65I</i> dans le vecteur pUC18- <i>rcsA</i> , Amp <sup>R</sup>		
pUC18- <i>ugd Y71F-rcsA</i>	Idem pUC18- <i>ugd-rcsA</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>71</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	50 et 52
pUC18- <i>ugd</i>	Code pour la protéine Ugd. Le fragment du gène <i>ugd</i> (1167 pb), précédé d'une séquence RBS améliorée, est cloné en <i>Acc65I/BamHI</i> dans le vecteur pUC18, Amp <sup>R</sup> .	Cette étude	49 et 51
pUC18- <i>ugd Y71F</i>	Idem pUC18- <i>ugd</i> avec mutation de la tyrosine (Tyr <sup>71</sup> ) en phénylalanine.	Cette étude	49 et 51

### II.1.3 Milieux de culture

Les souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu complet et synthétique Luria-Bertani (LB) (10 g de NaCl, 10 g de bactotryptone et 5 g d'extrait de levure par litre) distribué par la société MP Biomedicals ou sur support solide (15 g d'agar pour 1 L de milieu LB).

Lors des tests de résistance des bactéries à la polymyxine, deux milieux de culture minimum sont utilisés : le milieu non inducteur (MNI) de composition: KCl 5 mM / (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,5 mM / K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM / Tris-HCl 50 mM pH 7,7 / MgSO<sub>4</sub> 10 mM / Glucose 0,2 % / Thiamine 30 mM, et le milieu inducteur (MI) de composition : KCl 5 mM / (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,5 mM / K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM / Tris-HCl 25 mM pH 5,8 / Bis Tris 25 mM pH 5,8 / FeSO<sub>4</sub> 1 μM / MgSO<sub>4</sub> 10 μM / Glucose 0,2 % / Thiamine 30 mM.

Lors de l'inactivation de gènes, les cellules sont cultivées en milieu SOB pH 7,0 (bactotryptone 20 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 2,5 mM, KCl 10 mM) ou SOC (milieu SOB auquel est ajouté 20 mM de glucose).

La croissance des bactéries en milieu liquide est suivie en mesurant l'absorbance de la culture à 600 nm.

### II.1.4 Antibiotiques

L'ampicilline, la kanamycine, la tétracycline et le chloramphénicol sont ajoutés au milieu de culture à la concentration finale de 100 μg/mL, à 25 μg/mL, 15 μg/mL et 25 μg/mL, respectivement. La polymyxine B est utilisée à des concentrations finales de 0,5 / 2,5 et 5 μg/mL.

## II.2 Techniques de biologie moléculaire

### II.2.1 Préparation, analyse et purification d'ADN

Les préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du kit « Nucleospin plasmid » commercialisé par la société Macherey-Nagel.

Les échantillons d'ADN sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET) à la concentration finale de 1 µg/mL. Le pourcentage d'agarose varie de 0,5% à 1,2% en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. Les échantillons d'ADN sont repris dans du tampon BEG 6 fois concentré de composition : Bleu de bromophénol 0,25% / Xylène cyanol 0,25% / Glycérol 30% / H<sub>2</sub>O qsp 100% et la migration est effectuée dans le tampon TBE (Tris/Borate/EDTA 0,5X).

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ou par digestion par des enzymes de restriction sont purifiés soit directement en solution, soit par extraction d'un gel d'agarose en utilisant le kit « Nucleospin-extract II » commercialisé par la société Macherey-Nagel.

### II.2.2 Clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide

#### II.2.2.1 Amplification de fragments d'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

##### Protocole

Le protocole utilisé est voisin de celui décrit par Sambrook et al. (1992). Selon les cas, l'ADN polymérase utilisée est l'enzyme *Pfu* isolée de la bactérie *Pyrococcus furiosus* (Promega) ou l'ADN polymérase *Taq* isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* (GE Healthcare).

Mélange réactionnel :	- amorces	25 pmole chacune
	- matrice ADN	1 pmole
	- dNTP	5 nmole chacun
	- tampon 10X	5 µl
	- polymérase	0,5 µl à 3u/µl
	- H <sub>2</sub> O q.s.p.	50 µl

La réaction d'amplification par PCR est automatisée (MJ Mini Biorad) et se déroule en cycles de trois étapes répétés 30 fois :

- dénaturation à 94°C des brins de l'ADN matriciel pendant une minute.
- hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques avec la matrice à une température propre aux amorces utilisées pendant trente secondes. La température est calculée à l'aide de la formule  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 \text{ GC} + 2 \text{ AT}$  (GC et AT représentent les proportions en bases des amorces).
- élongation à 72°C avec l'ADN polymérase.

Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la nature de l'ADN polymérase.

### Amorces utilisés

Tableau 4 : Amorces utilisées. Les amorces orientées 5'→3' sur la séquence codante sont notées (+) alors que les amorces antisens sont notées (-). Les codons initiateurs et les codons stop sont en gras, les sites de restriction en italiques, les sites de fixation du ribosome (RBS) soulignés et les mutations apportées par l'oligonucléotide colorées en rouge.

	<b>Amorce</b>	<b>Séquence de 5' vers 3'</b>
1	Nt-BamHI-A1 <sub>cyto</sub> (+)	TATGGATCCAAAGTAATTTTCGATAAGCGAATT
2	Nt-BamHI-B2 (+)	CGGGATCCACGAATACACGAAGAAGTAC
3	Ct-HindIII-B2 (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATAAATATGC
4	Ct-HindIII-B2 Y(YC)F (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>AAAAA</b> ATGC <b>AAAGAA</b> ACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
5	Ct-HindIII-B2 Y(YC)E (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>TTCTTCT</b> GC <b>TTCTT</b> CACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
6	Ct-HindIII-B2 YYYY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>TT</b> CATATGCATAGTAAC
7	Ct-HindIII-B2 YYYYF (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>AAA</b> AATATGCATAGTAAC
8	Ct-HindIII-B2 EYYY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATAAATATGCATA <b>TT</b> CACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
9	Ct-HindIII-B2 FYYY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATAAATATGCATA <b>AAA</b> ACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
10	Ct-HindIII-B2 YYEE (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>TTCTTCT</b> GCATAGTAACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
11	Ct-HindIII-B2 YYFF (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>AAAAA</b> ATGCATAGTAACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
12	Ct-HindIII-B2 EEYY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATAAATATGC <b>TTCTT</b> CACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
13	Ct-HindIII-B2 FFYY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATAAATATGC <b>AAAAA</b> ACTAGCACTTTTATCTTTAGGC
14	Ct-HindIII-B2 YEEE (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>TTCTTCT</b> GC <b>TT</b> CGTAACTAGC

		ACTTTTATCTTTAGGC
15	Ct- <i>Hind</i> III-B2 YFFF (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>AAAAA</b> ATGC <b>AAAG</b> TAACTA GCACTTTTATCTTTAGGC
16	Ct- <i>Hind</i> III-B2 EEEY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATA <b>TTCT</b> GC <b>TTCTT</b> CACTAGC ACTTTTATCTTTAGGC
17	Ct- <i>Hind</i> III-B2 FFFY (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCCATA <b>AAAT</b> GC <b>AAAAA</b> ACTA GCACTTTTATCTTTAGGC
18	Ct- <i>Hind</i> III-B2 EEYE (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>TT</b> CATATGC <b>TTCTT</b> CACTAGC ACTTTTATCTTTAGGC
19	Ct- <i>Hind</i> III-B2 FFYF (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>AAA</b> ATATGC <b>AAAAA</b> ACTA GCACTTTTATCTTTAGGC
20	Ct- <i>Hind</i> III-B2 EYEE (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>TTCTT</b> CTGCATAT <b>TT</b> CACTAGC ACTTTTATCTTTAGGC
21	Ct- <i>Hind</i> III-B2 FYFF (-)	TATAAGCTTTCATGATTCATCAGTCCC <b>AAAAA</b> ATGCATA <b>AAAA</b> ACTA GCACTTTTATCTTTAGGC
22	B2 E23A/R26A/R29A (-)	CATAATATTTGAT <b>GC</b> TATGC <b>CTG</b> CAAAT <b>TT</b> <b>CGCG</b> GCTAATAGGTGACT TTGG
23	A1B2 F221A (mutation sur A1) (-)	GTATTCGTCATATT <b>AGC</b> TTTTTTGAATTGAACCC
24	Nt- <i>Eco</i> RI-rbs-Wzc pour pUC (+)	CCG <b>G</b> AATTCAGGAGGTATAAGAATGACAGAAAAAGTAAAACAAC
25	Ct- <i>Acc</i> 65I-Wzc (-)	CGGGGTAC <b>CTT</b> ATTTTCGCATCCGACTTA
26	Nt- <i>Bam</i> HI-Wzc <sub>cyto</sub> (+)	TATGGATCCTGGTTGTTAATCGCGGC
27	Ct- <i>Hind</i> III-Wzc (-)	TATAAGCT <b>TT</b> ATTTTCGCATCCGACTTATATT
28	Wzc RK(D480-Q493)del (+)	CGCTGTCGGAATGGCAGAAAGCGCGT <b>---</b> AGCCAGCTACTGGCGGTGG GGAATCC
29	Wzc K477A (-)	CTATCACGCG <b>CTGC</b> CTGCCATTCCG
30	Wzc D480A (-)	GTTTTGACGCT <b>AGC</b> ACGCGCTTTC
31	Wzc K483A (-)	CCTTTGATGGT <b>TGC</b> GACGCTATCAC
32	Wzc K486A (-)	CGTTTAATCC <b>CTGC</b> GATGGTTTTGAC
33	Wzc K489A (-)	CTCTGTTTATAGCG <b>TGC</b> AATCCCTTTG
34	Wzc R490A (-)	GCTCTGTTTATAG <b>GC</b> TTTAATCCCTTTG
35	Wzc Y491A (-)	GGCTCTGTTT <b>AGC</b> GCGTTTAATCCC
36	Wzc K492A (-)	GCTGGCTCTG <b>GC</b> ATAGCGTTTAATC
37	Wzc Q493A (-)	CAGTAGCTGGCT <b>CGC</b> TTTATAGC
38	Wzc Y569A (+)	GCAAAGGC <b>GCC</b> ACCCACGAGC
39	Wzc E508A/R511A/R514A (+)	CAACCGATCTGGCGATT <b>GC</b> AGCCAT <b>CGC</b> TAGTCTGG <b>CT</b> ACCAG TTTGCAC <b>TT</b> C
40	Nt- <i>Bam</i> HI-Etk <sub>cyto</sub> (+)	TATGGATCCGCGATGTTGCGTCGTGGTG
41	Ct- <i>Hind</i> III-Etk <sub>cyto</sub> (-)	TATAAGCT <b>TTTT</b> ACTCTTTCTCGGAGTAACTATAAC
42	Nt- <i>Bam</i> HI-rbs-Etk (+)	TATGGATCC <b>AGG</b> AGGTATAAGAATGACA <b>ACT</b> AAAAATATG



- rapport molaire vecteur/insert	1/4 (50 ng de vecteur)
- ligase du phage T4	1 µL à 3u/µl
- tampon de ligation	2 µl
- H <sub>2</sub> O q.s.p.	20 µl

Le milieu de ligation est ensuite transformé dans des bactéries compétentes selon le protocole décrit en section II.2.3.

### II.2.3 Transformation des bactéries

#### Préparation des cellules compétentes

Une culture saturée de la souche d'intérêt est utilisée pour ensemercer 50 mL de milieu LB (dilution 1/100) contenant les antibiotiques adéquats. Les bactéries sont ensuite cultivées à 37°C sous agitation. La croissance bactérienne est suivie jusqu'à ce que la A<sub>600</sub> atteigne 0,5 (± 0,03). La culture est alors mise dans la glace pendant 20 minutes puis centrifugée 5 minutes à 6 000 g à 4°C. Le culot bactérien est repris par 5 mL de TSS glacé de composition : LB 85% / PEG (masse/vol ; MM 8000) 10% / DMSO (vol/vol) 5% / MgCl<sub>2</sub> (pH 6,5) 50 mM. Les cellules compétentes ainsi obtenues peuvent être utilisées directement ou conservées à -80°C.

#### Transformation des cellules compétentes

20 µL du milieu de ligation ou 1 µL de préparation d'ADN plasmidique sont incubés en présence de 200 µl de cellules compétentes pendant 45 minutes dans la glace, puis soumis à un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes. Les cellules sont ensuite placées 2 minutes dans la glace et incubées pendant 1 heure à 37°C dans 1 mL de milieu LB sans antibiotique.

#### Sélection des clones recombinants

Des fractions de 100 µL et 1 mL du milieu de transformation sont étalées sur des boîtes de Pétri LB-agar contenant les antibiotiques de sélection. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C. Les clones recombinants isolés sont ensuite cultivés en milieu liquide pendant une nuit à 37°C, puis l'ADN plasmidique est extrait, purifié, digéré par des enzymes de restriction et analysé sur gel d'agarose.

### II.2.4 Mutagenèse dirigée par la technique de double PCR

Une première PCR est réalisée avec un oligonucléotide portant la mutation désirée et une seconde amorce s'hybridant à l'une des extrémités du gène. Le fragment d'ADN ainsi amplifié et portant la mutation est alors utilisé en tant qu'amorce dans une seconde réaction de PCR avec une autre amorce s'hybridant à l'autre extrémité du gène. Le gène portant la mutation désirée est ainsi amplifié dans son intégralité. Les réactions de PCR sont réalisées dans les conditions standards décrites section II.2.2.1. Pour la seconde réaction de PCR un volume de 5  $\mu$ L de PCR1 est utilisé.

### II.2.5 Séquençage de l'ADN

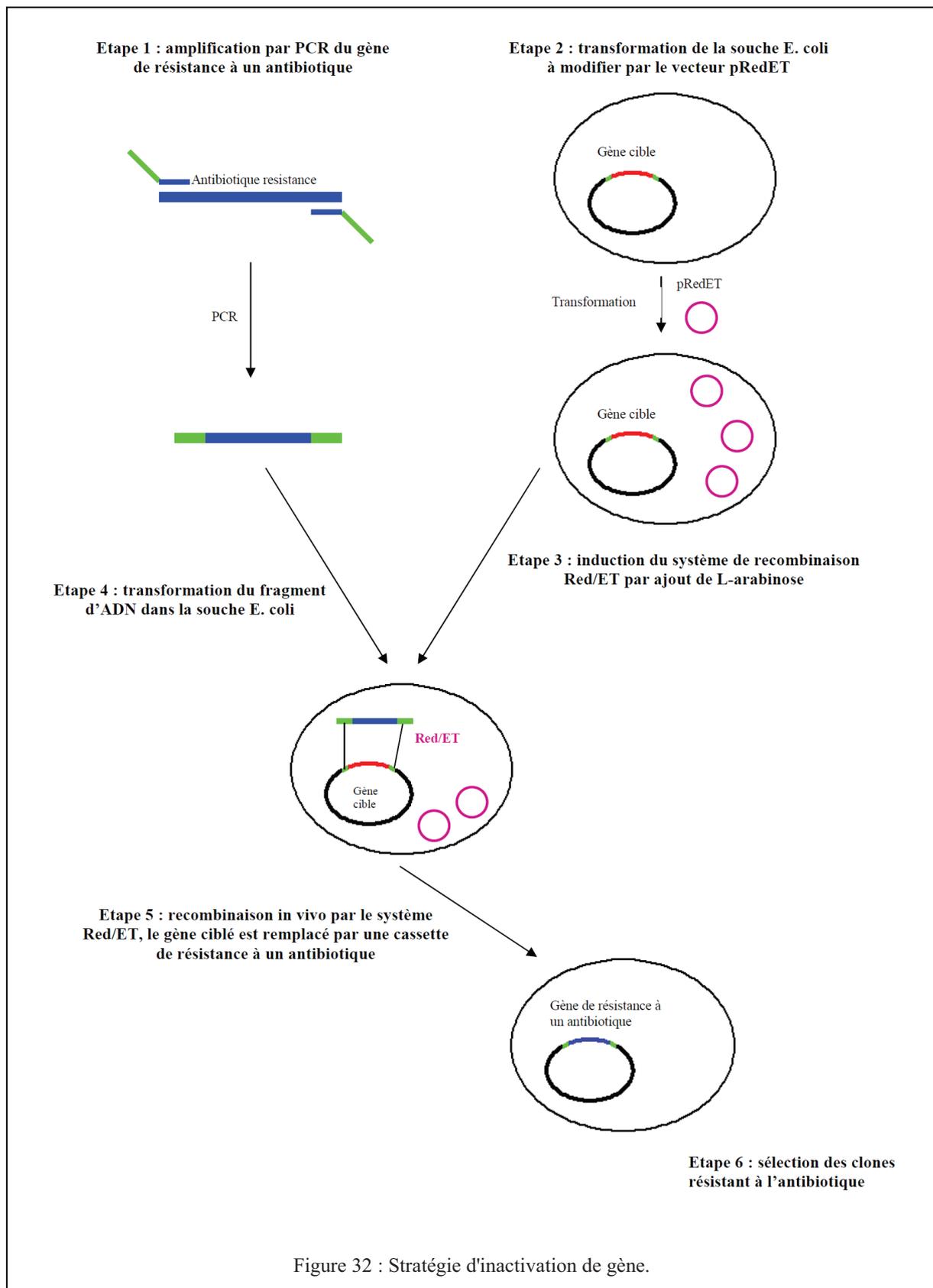
Chaque nouveau clonage est séquençé pour s'assurer de l'absence d'erreurs pouvant être introduites lors de l'amplification par PCR. Les réactions de séquençage sont effectuées par les sociétés Génome Express et GATC.

### II.2.6 Inactivation de gène

Les délétions de gènes d'*E. coli* sont réalisées à l'aide du kit « Quick and Easy *E. coli* Gene Deletion Kit by Red/ET Recombination » commercialisé par la société Gene Bridges.

#### II.2.6.1 Principe

Dans un premier temps, un fragment d'ADN codant pour une cassette de résistance à un antibiotique flanquée des extrémités 5' et 3' du gène ciblé est amplifié par PCR (Figure 32 étape 1). En parallèle, la souche d'*E. coli* à modifier est transformée par le plasmide pRedET (section II.2.3) exprimant le système de recombinaison Red/ET (Figure 32 étape 2). Après induction de l'expression du système de recombinaison Red/ET par addition de L-arabinose, la souche est électroporée par le produit PCR (Figure 32 étapes 3 et 4). Le système de recombinaison permet l'insertion de la cassette de résistance à l'antibiotique à la place du gène ciblé. Les clones résistants à l'antibiotique sont sélectionnés sur boîte de Pétri (Figure 32 étapes 5 et 6).



II.2.6.2 Préparation du fragment de recombinaison

Chaque oligonucléotide est constitué de 2 parties :

- une première partie homologue sur 50 pb à la région directement adjacente au gène à inactiver (soit 5', soit 3')
- une seconde partie homologue sur 23 pb à l'extrémité de la cassette de résistance (soit 5', soit 3')

	Amorce	Séquence de 5' vers 3'
1	H1- <i>ugd</i> -P1 (+)	TGTAAGTAACAAAAGACAATCAGGGCGTAAATAGCCCTGATAACAAGATG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
2	H2- <i>ugd</i> -P2 (-)	GATGCTAAAAACATCATGATTCACAGTTAAGTTAATTCTGAGAGCATGAAC ATATGAATATCCTCCTTAG
3	H1- <i>etk</i> -P1 (+)	TCAGGAATGGGCGAAGCGCCTCAGCCGTAATTTGAGTTTATAAAATACGG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
4	H2- <i>etk</i> -P2 (-)	AATGCGTAGACCGGAAAAGGCGTTCACGCCGCATCCGGCCACTTTCAGTTC ATATGAATATCCTCCTTAG

Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour l'inactivation des gènes. Les amorces, orientées 5'→3' sur la séquence codante sont notées (+) alors que les amorces antisens sont notées (-). **H1 et H2 (en rouge)** : Séquences homologues aux extrémités 3' et 5' du gène à inactiver ; **P1 et P2 (en bleu)** : Séquences homologues aux extrémités des gènes de résistance des plasmides pKD3 et pKD4.

Le protocole standard d'amplification d'ADN par PCR décrit en section II.2.2.1 est appliqué. La matrice utilisée est le plasmide pKD3 ou pKD4, portant respectivement le gène de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine (Datsenko and Wanner, 2000). Le produit PCR est ensuite purifié selon la méthode décrite en section II.2.1. La concentration finale en ADN doit être comprise entre 100 et 400 ng/μL.

II.2.6.3 Transformation de la souche à modifier avec le plasmide pRedET

Le vecteur pRedET est transformé dans la souche *E. coli JM83* par choc thermique. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 1 heure à 30°C, puis étalées sur boîtes de Pétri en présence de tétracycline et incubées une nuit à 30°C pour la sélection des clones recombinants.

#### II.2.6.4 Recombinaison du fragment de PCR

50 mL de milieu LB contenant de la tétracycline sont ensemencés à partir d'une pré-culture saturée de bactéries transformées par le plasmide pRedET. La croissance bactérienne est réalisée sous agitation à 30°C jusqu'à ce que la culture atteigne une  $A_{600}$  d'environ 0,3. Lorsque cette absorbance est atteinte, 2 mL de la culture sont alors prélevés pour servir de contrôle négatif non induit et réincubés sous agitation à 37°C, pendant 45 minutes. Le reste de la culture est additionné d'une solution de L-arabinose à une concentration finale de 3,5 mg/mL pour induire l'expression des protéines de recombinaison Red/ET et l'incubation est poursuivie sous agitation à 37°C, pendant 45 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C puis lavées 3 fois avec de l'eau glacée (20 mL, puis 10 mL, puis 1 mL) de manière à les rendre électrocompétentes. Elles sont finalement resuspendues dans 450  $\mu$ L d'eau glacée.

40  $\mu$ L de bactéries compétentes sont transformées par électroporation (1350 V, 10  $\mu$ F et 600  $\Omega$ ) avec 400-800 ng de produit PCR. 1 mL de SOC est ajouté immédiatement après le choc électrique et les cellules sont ensuite incubées sous agitation 3 heures à 37°C. Les bactéries sont alors étalées sur une boîte de Pétri contenant soit du chloramphénicol, soit de la kanamycine, selon la cassette de résistance utilisée lors de la PCR et incubée une nuit à 37°C afin de perdre le plasmide pRedET.

Après cette première sélection, une dizaine de clones résistants sont repiqués sur de nouvelles boîtes pour éliminer toute trace de bactéries non modifiées. Les colonies isolées ainsi obtenues peuvent être analysées par PCR pour vérifier l'insertion correcte du gène de résistance.

### II.2.7 Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

#### II.2.7.1 Préparation d'ARN total

Les préparations d'ARN sont faites à l'aide du kit « High Pure RNA Isolation Kit » commercialisé par la société Roche. L'étape d'incubation de la DNase sur la colonne est répétée deux fois. La préparation d'ARN est ensuite dosée en mesurant son absorbance à 260 nm et directement utilisée dans la réaction de transcription inverse (RT) ou conservée à -80°C.

### II.2.7.2 Réaction de reverse transcription (RT)

Le mélange réactionnel suivant est chauffé à 65°C pendant 5 minutes puis refroidi dans la glace :

- oligonucléotide : 2 pmole
- ARN total : entre 1 ng et 5 µg
- dNTP mix : 10 nmole chacun
- H<sub>2</sub>O : qsp 20 µL

4 µL de tampon 5X de composition Tris-HCl 250 mM pH 8,3 / KCl 375 mM / MgCl<sub>2</sub> 15 mM et 2 µL de DTT 0,1 M sont alors ajoutés et le mélange réactionnel est incubé à 42°C pendant 2 minutes.

1 µL (200 unités) de Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) est ajouté et le mélange est incubé à 42°C pendant 50 minutes. La réaction est arrêtée par inactivation de l'enzyme à 70°C pendant 15 minutes. 2 µL de cette solution sont alors utilisés comme matrice dans une réaction d'amplification par PCR du brin d'ADNc ainsi obtenu.

## II.3 Techniques de biochimie

### II.3.1 Surproduction de protéines recombinantes

De 50 à 500 mL de milieu LB, contenant les antibiotiques appropriés, sont ensemencés à une A<sub>600</sub> de 0,05 à partir d'une pré-culture saturée de bactéries (XL1-Blue, BL21 (DE3), ou BL21 pREP4-GroESL) transformées par les plasmides (pQE30, pET15b, pGEX-KT, pGEX(M), pUC18, ou pUC18-rcsa) exprimant les protéines d'intérêt. La croissance bactérienne est réalisée sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne une A<sub>600</sub> comprise entre 0,5 et 0,6.

Lorsque cette absorbance est atteinte, 1,5 mL de la culture sont alors prélevés, centrifugés à 13000 g pendant 1 minute et le culot obtenu est conservé dans la glace. La culture est alors additionnée d'IPTG à une concentration finale de 0,5 ou 1 mM et l'incubation est poursuivie sous agitation entre 20°C et 37°C, pendant 3 à 6 heures selon la protéine étudiée. Afin de vérifier la surproduction de la protéine d'intérêt, 500 µL de la culture bactérienne sont prélevés et centrifugés à 13000 g pendant 1 minute. Le reste de la culture est récolté par centrifugation à 6000 g à 4°C pendant 10 minutes et conservé à -80°C jusqu'à son

utilisation ultérieure (purification, préparation de vésicules de membranes internes enrichies en une protéine).

Les 2 échantillons prélevés (avant induction et après induction) sont repris par 300  $\mu$ L de tampon TE glacé de composition : Tris-HCl pH 8 25 mM / EDTA 1 mM. Les cellules sont ensuite ouvertes par sonication (1 fois 12 coups à efficacité 3 et puissance 30% : 1.12.3.30) et centrifugées à 4°C à 14 000 g pendant 10 minutes. La fraction soluble et le culot sont alors séparés, puis analysés par SDS-PAGE (section II.3.6).

### II.3.2 Préparation de vésicules de membranes internes

La préparation des vésicules de membranes internes d'*E. coli* est adaptée de la technique décrite par Dokter et al (1987). Une culture de 50 mL d'*E. coli* est centrifugée à 5000 g pendant 10 minutes. Le culot de bactéries est repris par 50 mL de tampon A de composition : saccharose 20% / LiCl 2,5% / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM à pH 7 / MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Après addition de 50 mg de lysozyme, le mélange est incubé à 30°C pendant 90 minutes. Les sphéropastes obtenus sont collectés par centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans 800  $\mu$ L de tampon A et la suspension est diluée 50 fois avec du tampon B glacé de composition : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM à pH 7 / MgSO<sub>4</sub> 1 mM. La solution est agitée vigoureusement, puis de la DNaseI et de la RNaseA sont ajoutées chacune à 20  $\mu$ g/mL final. Le mélange est alors incubé à 30°C pendant 30 minutes puis centrifugé à 40000 g pendant 15 minutes. Le culot est repris dans 40 mL de tampon C de composition : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM à pH 7 / MgSO<sub>4</sub> 10 mM et centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant obtenu est de nouveau centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes, puis à 40000 g pendant 15 minutes pour collecter les vésicules de membranes internes. Le culot est lavé 2 fois dans le tampon C puis les vésicules sont reprises dans 500  $\mu$ L à 1 mL de tampon E de composition : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM à pH 7 / NaCl 150 mM / EDTA 1 mM / inhibiteur de protéase « Complete » (Roche), et stockées à -80°C.

### II.3.3 Préparation d'un extrait total de protéines bactériennes

Les bactéries sont généralement récoltées en phase exponentielle de croissance et centrifugées à 6000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est repris dans un tampon approprié à la manipulation suivant l'extraction (tampon TE, tampon A-6His voir II.3.4, tampon A-GST voir II.3.5), contenant 10 mg/mL de lysozyme, 10 mg/mL de RNaseA et DNaseI.

Les cellules sont ouvertes par 3 étapes successives de sonication (2.30.3.30 puis 1.30.4.40). Une centrifugation est ensuite effectuée à 14 000 g pendant 30 minutes à 4°C pour séparer les protéines solubles des protéines membranaires présentes dans les débris cellulaires. Pour préparer des protéines membranaires, du Triton X-100 à la concentration finale de 1% est ajouté au lysat cellulaire après les étapes de sonication, et une incubation de 30 minutes à 4°C est réalisée.

#### II.3.4 Purification d'une protéine fusionnée à 6 résidus histidyles

Le culot bactérien obtenu après surproduction d'une protéine recombinante clonée dans le vecteur pQE30 ou pET15b est repris dans 5 mL de tampon A-6His de composition Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 / NaCl 150 mM / imidazole 10 mM / glycérol 10%. L'extrait protéique total est préparé comme décrit dans la section II.3.3.

Le surnageant obtenu est alors incubé sous agitation douce à 4°C pendant 45 minutes avec la résine Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose (Qiagen) préalablement rincée à l'eau distillée et équilibrée dans du tampon A'-6His de composition Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 / NaCl 150 mM / glycérol 10%. Les protéines non retenues sont éliminées par 4 rinçages successifs de la résine avec un tampon B-6His de composition Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 / NaCl 150 mM / imidazole 20 mM / glycérol 10%. L'élution de la protéine, est réalisée par 3 incubations successives de 5 minutes de la résine avec un tampon E-6His de composition Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 / NaCl 150 mM / imidazole 150 mM / glycérol 10%.

Après analyse des fractions d'élution par SDS-PAGE (voir section II.3.6), les fractions contenant la protéine d'intérêt purifiée à homogénéité sont dialysées pendant 1 nuit à 4°C contre un tampon D-6His de composition Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 / NaCl 100 mM / DTT 1 mM / MgCl<sub>2</sub> 1 mM / glycérol 10% (membrane Spectra/Por<sup>®</sup> de Spectrum<sup>®</sup>) puis conservées à -80 °C.

#### II.3.5 Purification d'une protéine fusionnée à la glutathion-S-tranférase

Le culot bactérien obtenu après surproduction d'une protéine recombinante clonée dans le vecteur pGEX-KT ou pGEX(M) est repris dans 5 mL de tampon A-GST de

composition PBS (phosphate de sodium 10 mM à pH 7,4 / NaCl 150 mM) / EDTA 1mM / glycérol 10 %. L'extrait protéique total est préparé comme décrit dans la section II.3.3.

Le surnageant obtenu est alors incubé sous agitation douce à 4°C pendant 4 à 12 heures avec la résine glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) préalablement équilibrée dans du tampon A-GST. Les protéines non retenues sont éliminées par 4 rinçages successifs de la résine avec du tampon A-GST. L'élution de la protéine recombinante est réalisée par 3 incubations successives de 5 minutes de la résine avec un tampon E-GST de composition PBS (phosphate de sodium 10 mM à pH 7,4 / NaCl 150 mM) / glutathion 10mM / EDTA 1mM / glycérol 10 %.

Après analyse des fractions d'élution par SDS-PAGE (voir section II.3.6), les fractions contenant la protéine d'intérêt purifiée à homogénéité sont dialysées pendant une nuit à 4°C contre un tampon D-GST de composition Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 / NaCl 150 mM /  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 mM / EDTA 1 mM / glycérol 10% (membrane Spectra/Por<sup>®</sup> de Spectrum<sup>®</sup>) puis conservées à -80°C.

Pour la purification de protéines membranaires, les tampons de lavage et d'élution contiennent du Triton X-100 à la concentration finale de 0,1%.

### II.3.6 Analyse des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

#### II.3.6.1 Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes

Les échantillons protéiques sont repris dans du tampon de charge 5 fois concentré de composition :  $\beta$ -mercaptoéthanol 750 mM / Tris-HCl 312,5 mM pH 6,8 / SDS 10 % / glycérol 50 % / bleu de bromophénol 0,05 %. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 5 min à 100°C pour compléter la dénaturation des protéines par le SDS et chargés sur un gel de polyacrylamide dont le pourcentage en Acrylamide/Bisacrylamide varie de 7,5 à 15%. La migration est réalisée dans le tampon TG-SDS de composition Tris-base 0,025 M / glycine 0,192 M / SDS 0,1%, à 80 V pendant 15 minutes puis à 200 V.

### II.3.6.2 Coloration des protéines

La révélation des protéines est effectuée par le bleu de Coomassie. Le gel de polyacrylamide est plongé dans le tampon de coloration de composition : éthanol 40% / acide acétique 10% / pastilles R250 Merck Coomassie (Roth) 1,5 g pour 100 mL / H<sub>2</sub>O 50%, pendant 30 minutes sous agitation, puis décoloré dans le tampon de décoloration de composition : éthanol 30% / acide acétique 10% / glycérol 1% / H<sub>2</sub>O 59%, pendant 40 minutes sous agitation.

### II.3.7 Analyse des protéines par électrophorèse en conditions natives (PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives se fait exactement de la même manière que celle décrite en section II.3.6.1 mais en absence de SDS dans le gel, dans le tampon de charge et dans le tampon de migration. L'étape d'incubation des échantillons à 100°C pendant 5 minutes est également supprimée.

### II.3.8 Analyse des protéines par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) est une technique permettant de déterminer le diamètre hydrodynamique de particules en solution.

Cette technique a été employée pour vérifier le bon repliement des protéines mutées et s'assurer que la différence observée au niveau de l'activité de la protéine mutée provenait bien de l'effet de la mutation et non d'un défaut de repliement généré par la mutation.

Les mesures de DLS ont été réalisées avec l'appareil Zetasizer Nano series (Malvern instruments).

### II.3.9 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976) par mesure de l'absorbance à 595 nm de différents volumes de l'échantillon protéique (de 2 à 10 µL) dilués dans 1mL du mélange H<sub>2</sub>O/réactif de Bradford (50/50). Une courbe étalon est réalisée

avec différentes concentrations connues de BSA (Bovine Serum Albumin). La concentration de la protéine d'intérêt est obtenue par comparaison à cette courbe étalon.

### II.3.10 Transfert des protéines sur membrane PVDF

Après séparation par SDS-PAGE (section II.3.6.1), les protéines sont transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Immobilon<sup>TM</sup>-P, MILLIPORE) sous l'influence d'un courant électrique de 2,5 mA/cm<sup>2</sup> de membrane, pendant 30 minutes. Le transfert a lieu dans le tampon de composition : Tris-HCl 25 mM pH 8,3 / glycine 190 mM / méthanol 20% / SDS 0,04%.

### II.3.11 Immunorévélation des protéines sur membrane de PVDF

Les protéines sont sélectivement révélées grâce à l'utilisation de différents anticorps spécifiques. Au laboratoire nous disposons des anticorps suivants :

- les **anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine** 4G10 Platinum (Millipore) et PY20 (Sigma) qui sont spécifiques des résidus tyrosyles phosphorylés. Ils sont respectivement utilisés au 1/1000 dans du TBS-Tween/ lait écrémé 3% et au 1/25000 dans du TBS-Tween/ BSA 1%. L'anticorps 4G10 nécessite d'être révélé par un anticorps secondaire anti-souris obtenu chez la chèvre (BioRad) et conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000). L'anticorps PY20 est directement couplé à la peroxydase.
- l'**anticorps « anti-Ugd »** est un anticorps polyclonal qui a été élaboré au laboratoire après immunisation de souris avec la protéine Ugd. Il est utilisé au 1/1400 dans du TBS-Tween/ BSA 1% et nécessite d'être révélé par un anticorps secondaire anti-souris obtenu chez la chèvre (BioRad) et conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000).
- l'**anticorps « anti-Wzc »** est un anticorps monoclonal qui a été élaboré au laboratoire après immunisation de souris avec la protéine Wzc. Il est utilisé au 1/500 dans du TBS-Tween/ BSA 1% et nécessite d'être révélé par un anticorps secondaire anti-souris obtenu chez la chèvre (BioRad) et conjugué à la peroxydase (dilution 1/5000).

Après transfert, la membrane est lavée trois fois pendant 10 min, sous agitation dans un tampon TBS-Tween (Tris-HCl 100 mM à pH 8,0, NaCl 150mM, Tween 0,05%). La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure sous agitation dans du TBS-Tween contenant

de la BSA 5% (BSA fat free Sigma) ou du lait écrémé 3%. Après 3 rinçages de 10 minutes de la membrane dans du tampon TBS-Tween, la membrane est incubée dans une solution de TBS-Tween BSA 1% (ou lait écrémé 3%) en présence de l'anticorps primaire pendant 1 heure sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois par du TBS-Tween puis à nouveau incubée dans du tampon TBS-Tween BSA 1% (ou lait écrémé 3%) en présence de l'anticorps secondaire anti-souris pendant 1 heure sous agitation. Elle est ensuite rincée trois fois par du tampon TBS-Tween. La révélation est alors effectuée en utilisant le kit « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate » (Pierce). Le signal émis est ensuite détecté par exposition de la membrane sur un film MS-1 (Kodak) pendant un temps variant de 10 secondes à 30 minutes.

### II.3.12 Test de phosphorylation *in vitro*

Les tests de phosphorylation sont généralement réalisés en présence d'ATP radioactif [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (activité spécifique 3000 Ci/mmol) selon le protocole décrit ci-dessous. Alternativement, ils sont réalisés en présence d'ATP non radioactif puis analysés sur gel d'électrophorèse en conditions natives (section II.3.7).

#### II.3.12.1 Phosphorylation des protéines

Les réactions de phosphorylation *in vitro* sont effectués dans le tampon de composition Tris-HCl 25 mM à pH 7 / MgCl<sub>2</sub> 5 mM / EDTA 1 mM / DTT 1 mM.

Le mélange réactionnel suivant est incubé de 30 secondes à 10 minutes à 37 °C.

- protéine à phosphoryler :	2 $\mu\text{g}$
- kinase :	entre 0,2 et 2 $\mu\text{g}$
- ATP non radioactif :	entre 0 et 1 mM
- [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (5 mCi/mL, 3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer)	1 $\mu\text{L}$
- tampon de phosphorylation 10X	2 $\mu\text{L}$
- H <sub>2</sub> O qsp	20 $\mu\text{L}$

La réaction est arrêtée par addition de 5  $\mu\text{L}$  de tampon de charge 5 fois concentré. Les protéines sont ensuite séparées par SDS-PAGE (section II.3.6.1).

### II.3.12.2 Traitement des gels par l'acide trichloroacétique

Après migration, les gels SDS-PAGE sont immergés dans de l'acide trichloroacétique 16 % à 95°C pendant 15 minutes. Ce traitement a pour but principalement d'éliminer les polyphosphates et d'hydrolyser les acides nucléiques phosphorylés. Seules les phosphosérines, les phosphothréonines et les phosphotyrosines résistent à ce traitement. Les gels sont ensuite rincés à l'eau, puis colorés au bleu de Coomassie (section II.3.6.2) et séchés.

### II.3.12.3 Autoradiographie

Les gels sont autoradiographiés entre 30 minutes et une nuit au contact d'un film BioMax MR-1 ou BioMax MS-1 (Kodak) à -80°C en présence d'un écran amplificateur adapté au rayonnement de l'isotope radioactif utilisé (un écran Biomax MS intensifying screen est utilisé pour les protéines marquées au <sup>32</sup>P).

### II.3.13 Comptage de la radioactivité en scintillation liquide

La bande de gel SDS-PAGE radioactive est découpée et dissoute dans un mélange de 200 µL d'acide perchlorique à 60% et 400 µL de peroxyde d'hydrogène à 30%. Le mélange est incubé 4 heures à 80°C. 10 mL de liquide à scintillation Ultima Gold XR (Packard Bioscience) sont mis en contact avec la solution radioactive dans un pot à scintillation et agités (dans un vortex) pendant 30 secondes. La radioactivité est ensuite comptée à l'aide du spectromètre à scintillation liquide Tri Carb 2100 TR (Packard).

### II.3.14 Déphosphorylation *in vitro*

Les réactions de déphosphorylation *in vitro* sont réalisées en incubant la protéine d'intérêt avec de la phosphatase alcaline extraite de l'intestin de veau (Roche) à 37°C entre 30 minutes et 3 heures. 80 µL de phosphatase alcaline sont utilisés pour déphosphoryler 2 mg de protéine.

### II.3.15 Test d'activité UDP-glucose déshydrogénase

La technique utilisée est inspirée de celle décrite par Pagni et al. (1999).

Ce test est réalisé dans des microplaques 96 puits. 2 µg de la protéine Ugd sont phosphorylés par la protéine Wzc comme décrit en section II.3.12.1 ou bien déphosphorylés dans les conditions décrites en section II.3.14 dans un volume de 20 µL. La réaction est

effectuée pendant 10 minutes sous agitation dans une chambre thermostatée à 37°C, puis additionnée de 230 µL d'un tampon de composition 100 mM Tris-HCl pH 9,0 / 100 mM NaCl / 2 mM DTT. 300 µL de ce même tampon contenant 10 mM de NAD<sup>+</sup> et 10 mM d'UDP-Glucose, préalablement incubé à 37°C et conservé à l'abri de la lumière sont finalement ajoutés pour démarrer la réaction enzymatique.

L'absorbance à 340 nm, mesurée pendant 10 minutes par un lecteur de microplaques 96 puits à chambre thermostatée à 37°C (Infinite M1000 Tecan), permet de mesurer la formation du NADH.

### **II.3.16 Méthodes de purification et d'analyse de l'acide colanique**

#### **II.3.16.1 Purification de l'acide colanique**

Le protocole de purification de l'acide colanique mis au point au laboratoire est inspiré de la technique décrite par Bergmaier et al. (2001). 50 mL de culture sontensemencés en culture sur la nuit. L'A<sub>600</sub> est mesurée et l'ensemble de la culture est chauffé à 100°C pendant 15 minutes pour dénaturer les enzymes susceptibles de dégrader les exopolysaccharides. Après retour à température ambiante, la culture est centrifugée à 13 200 g à 4°C pendant 30 minutes. 40 mL du surnageant sont ensuite précipités par addition de trois volumes d'éthanol glacial. Après une nuit de précipitation à 4°C, la solution est à nouveau centrifugée à 13 200 g à 4°C pendant 30 minutes. Le culot est dissous dans 5 mL d'eau stérile, puis dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 heures (membrane Spectra/Por<sup>®</sup> de Spectrum<sup>®</sup>). Les limites d'exclusion de la membrane utilisée sont comprises entre 6000 et 8000 Da. La solution est ensuite lyophilisée. Les peptides résiduels sont alors précipités par 5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique 10 % et centrifugés à nouveau à 13 200 g à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est dialysé, une seconde fois, pendant 5 jours contre de l'eau distillée, puis lyophilisé. L'acide colanique purifié est alors repris par 1 mL d'eau distillée puis conservé à -20°C.

#### **II.3.16.2 Dosage de l'acide colanique**

La concentration d'acide colanique est mesurée par la méthode décrite par Dische et Shettles (Dische and Shettles, 1951 ; Dische, 1955). Cette méthode est basée sur le dosage des méthyl-pentoses non dialysables. Le fucose, sucre spécifique de l'acide colanique, est un 6-désoxy-hexose dosé par cette méthode.

10 à 100  $\mu\text{L}$  de la préparation d'acide colanique sont dilués dans de l'eau distillée (q.s.p. 1 mL), puis 4,5 mL d'un mélange 6/1 d'acide sulfurique/ $\text{H}_2\text{O}$  est ajouté. La solution est ensuite chauffée à  $110^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes. L'absorbance de chaque échantillon est ensuite mesurée à 396 et 427 nm en présence et en absence de 100  $\mu\text{L}$  de chlorure de cystéine 3%. L'équation  $(A_{396} \text{ avec chlorure de cystéine} - A_{396} \text{ sans chlorure de cystéine}) - (A_{427} \text{ avec chlorure de cystéine} - A_{427} \text{ sans chlorure de cystéine})$ , permet de mesurer la concentration en fucose par comparaison avec une gamme étalon de fucose variant entre 5 et 100  $\mu\text{g}$ .

### II.3.16.3 Estimation de la taille du polymère d'acide colanique.

La taille du polymère d'acide colanique est analysée par SDS-PAGE. 10  $\mu\text{L}$  de solution purifiée d'acide colanique sont repris dans du tampon de charge 5 fois concentré et déposé sur un gel de polyacrylamide à 3,5% d'acrylamide/bisacrylamide. La migration est effectuée à 200 V et arrêtée 1 heure après que le bleu de bromophénol soit sorti du gel. Le gel est ensuite plongé dans le tampon de coloration de composition : bleu Alcian 0,25 g pour 100 mL / éthanol 25% / acide acétique 10% /  $\text{H}_2\text{O}$  65%. Le bleu Alcian est un colorant basique tétravalent se fixant sur les radicaux acides (Karlyshev and Wren, 2001). Après coloration, le gel est décoloré par la même solution ne contenant pas le colorant.

### II.3.17 Test de résistance à la polymyxine

Ce protocole est adapté de celui décrit pour la bactérie *S. typhimurium* par Groisman et al. (1997).

2 mL de milieu non inducteur MNI (voir section I.1.3) sontensemencés par une préculture saturée de bactéries et incubés une nuit sous agitation à  $37^\circ\text{C}$ . Les bactéries sont ensuite lavées 3 fois dans du milieu inducteur MI (voir section I.1.3) puis réensemencées au 1/100 dans 2 mL de ce milieu. Les bactéries sont cultivées sous agitation à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à  $A_{600}=0,3-0,5$ . Environ 100 000 bactéries sont alors récupérées puis incubées sous agitation en présence de différentes concentrations en polymyxine (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dans 1 mL de milieu MI pendant 1 heure à  $37^\circ\text{C}$ . Une culture témoin en absence de polymyxine est également réalisée. Des échantillons de 50  $\mu\text{L}$  de chaque culture sont alors étalés sur boîtes de gélose sans polymyxine. Les boîtes sont ensuite incubées une nuit à  $37^\circ\text{C}$ . On calcule le pourcentage de résistance des bactéries en déterminant le nombre de clones résistants pour chaque concentration de polymyxine par rapport au nombre de clones survivants dans ces mêmes conditions sans polymyxine.

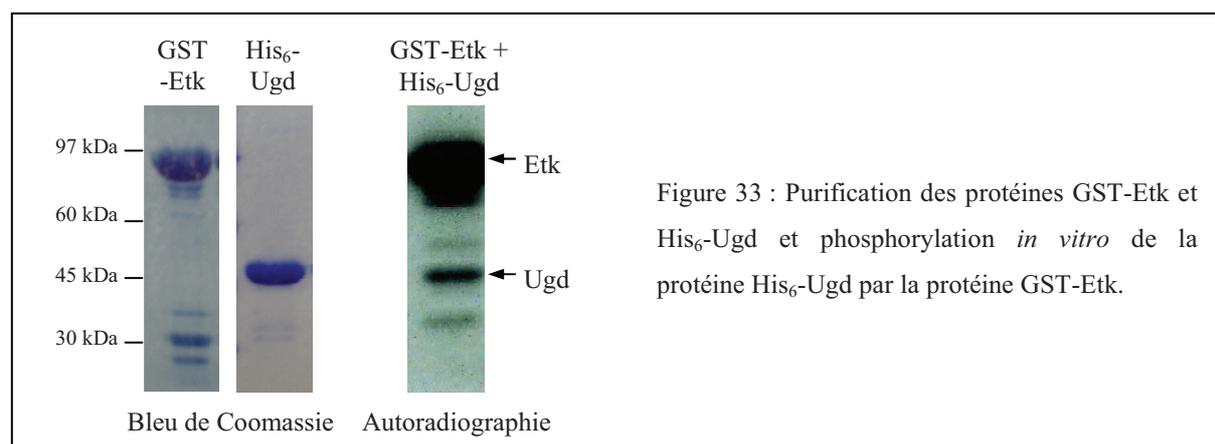
# **RESULTATS**

## I Caractérisation du rôle de la phosphorylation sur la tyrosine de la protéine Ugd chez *E. coli*

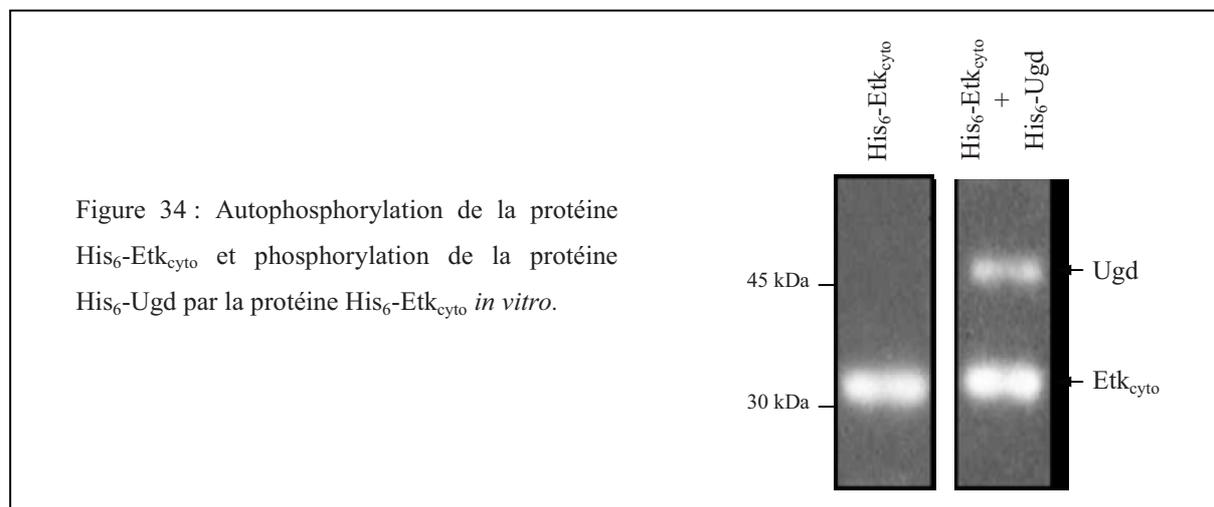
Comme nous l'avons vu dans l'exposé bibliographique, la protéine Ugd d'*E. coli* a été l'un des premiers substrats des BY-kinases à être identifié. En effet, il a été démontré *in vitro* que la BY-kinase Wzc<sub>ca</sub> d'*E. coli* K12 était capable de phosphoryler et d'activer cette enzyme (Grangeasse et al., 2003). L'UDP-acide glucuronique produit par Ugd est non seulement un élément précurseur de l'exopolysaccharide d'*E. coli*, l'acide colanique, mais il participe également à la synthèse du 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N), composé impliqué dans les phénomènes de résistance à la polymyxine. Par conséquent, il nous est apparu particulièrement intéressant de déterminer si la protéine Ugd est également un substrat de la BY-kinase Etk et si sa phosphorylation influence la synthèse de l'acide colanique et la résistance à la polymyxine.

### I.1 Phosphorylation *in vitro* de la protéine Ugd par la BY-kinase Etk

Les protéines Etk, fusionnée au niveau de son extrémité N-terminale à la GST (GST-Etk) et Ugd, fusionnée au niveau de son extrémité N-terminale à une étiquette 6 histidines (His<sub>6</sub>-Ugd) ont été surproduites et purifiées à homogénéité en une seule étape chromatographique (Matériels et méthodes II.3.5 et II.3.4 respectivement). La phosphorylation de la protéine His<sub>6</sub>-Ugd par la protéine GST-Etk a ensuite été testée en présence de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Après séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et autoradiographie, nous avons constaté que la protéine Ugd est phosphorylée par la protéine Etk (Fig. 33).



Nous avons également construit le plasmide pQe30-*Etk<sub>cyto</sub>* exprimant la partie cytoplasmique de la protéine Etk fusionnée au niveau de son extrémité N-terminale à une étiquette 6 histidines (His<sub>6</sub>-*Etk<sub>cyto</sub>*) dans le but de tester sa capacité à phosphoryler Ugd. Nous avons observé que la partie cytoplasmique d'Etk est suffisante pour développer une activité tyrosine-kinase et phosphoryler la protéine Ugd (Fig. 34).

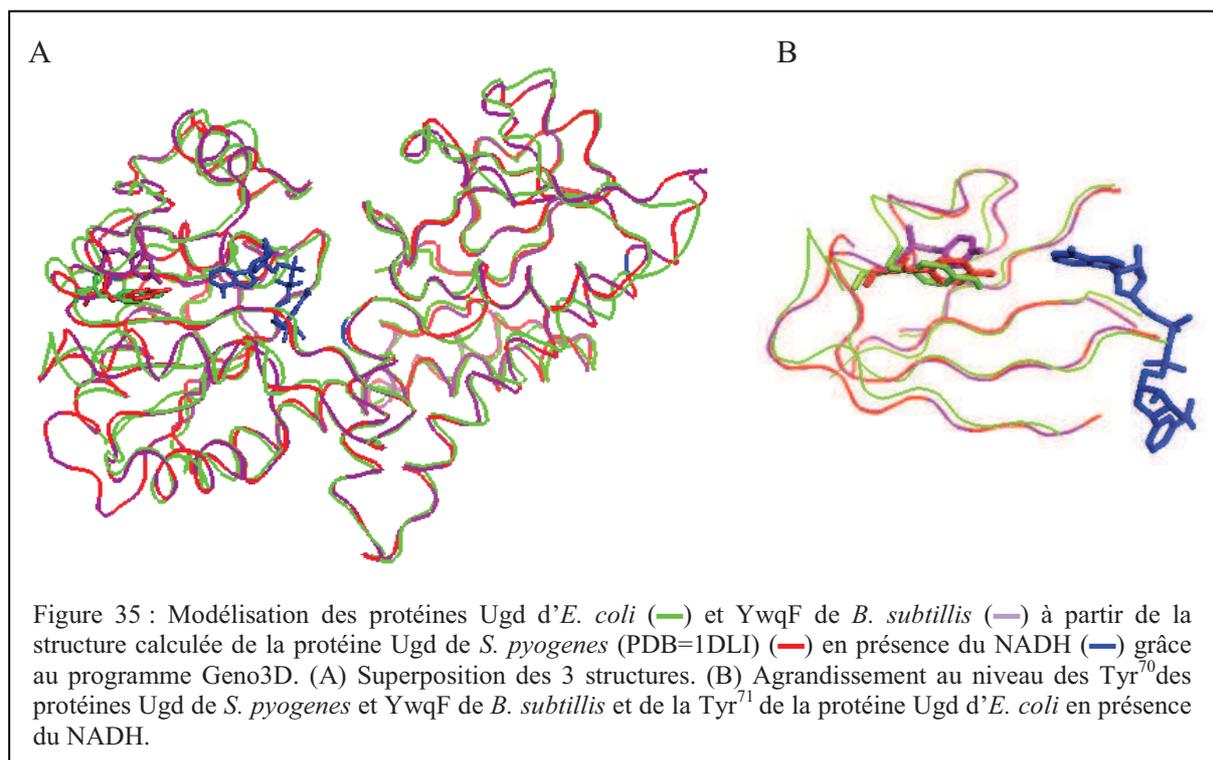


Les deux BY-kinases d'*E. coli*, Wzc et Etk, sont donc capables de phosphoryler la protéine Ugd *in vitro*.

## I.2 Identification *in vitro* du site de phosphorylation de la protéine Ugd

Au laboratoire, il avait été démontré par électrophorèse bidimensionnelle que la protéine Ugd était phosphorylée sur un seul résidu tyrosyle (Grangeasse et al., 2003). Sur la base d'alignements de séquences et de comparaisons structurales, 11 mutants de la protéine Ugd avaient été construits modifiant les tyrosines Tyr<sup>10</sup>, Tyr<sup>71</sup>, Tyr<sup>150</sup>, Tyr<sup>203</sup>, Tyr<sup>210</sup>, Tyr<sup>217</sup>, Tyr<sup>242</sup>, Tyr<sup>249</sup>, Tyr<sup>252</sup>, Tyr<sup>335</sup>, et Tyr<sup>380</sup> en phénylalanines dans le but de déterminer le site de phosphorylation d'Ugd. Malheureusement aucun d'entre eux n'avait conduit à une extinction, ni même à une diminution du signal de phosphorylation détecté en radioactivité.

L'analyse du phosphoprotéome de *B. subtilis* par spectrométrie de masse a montré que, chez cette bactérie, l'UDP-glucose déshydrogénase Ugd<sub>BS</sub> (YwqF) est phosphorylée sur la Tyr<sup>70</sup> (Macek et al., 2007). Nous avons alors généré un modèle tridimensionnel des deux protéines, basé sur la structure de la protéine Ugd de *S. pyogenes* (code PDB : 1DLI) en utilisant le programme Geno3D (Combet et al., 2002) (Fig. 35).

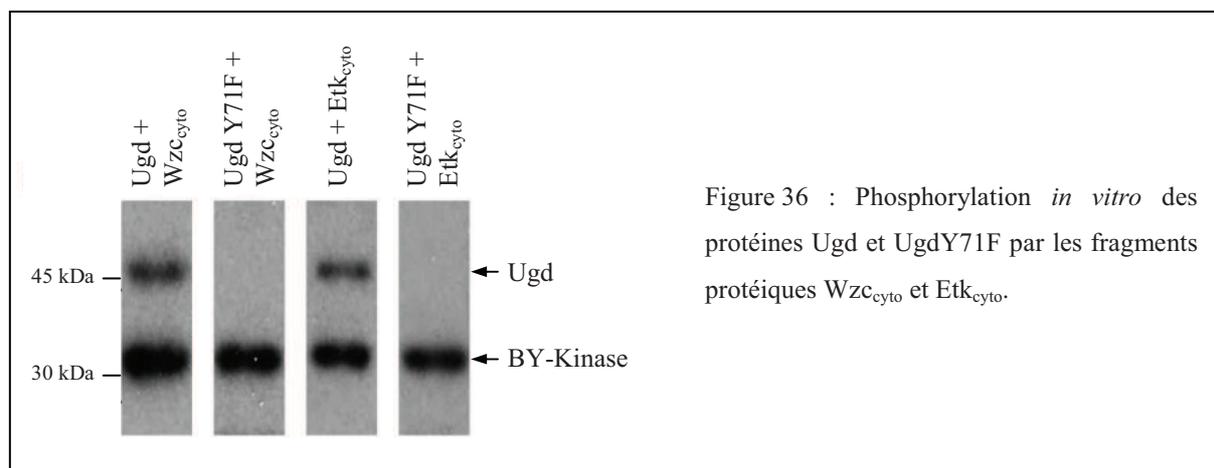


Ce modèle montre que la Tyr<sup>71</sup> d'Ugd occupe une position très semblable à la Tyr<sup>70</sup> d'Ugd<sub>BS</sub>. Elles sont toutes les deux situées au niveau de la poche catalytique de l'enzyme, à proximité de la molécule de NAD<sup>+</sup>. Cette observation conduit à penser que le site de phosphorylation d'Ugd est la Tyr<sup>71</sup>. Or, la mutation de ce résidu avait déjà été réalisée et testée mais ne causait aucun changement dans l'intensité du signal de phosphorylation. Nous avons donc décidé de reprendre l'analyse de la protéine Ugd Y71F en modifiant notre protocole de phosphorylation *in vitro*.

La protéine Ugd Y71F fusionnée au niveau de son extrémité N-terminale à une étiquette 6 histidines (His<sub>6</sub>-Ugd Y71F) a donc été surproduite et purifiée à homogénéité. Nous avons réalisé des mesures de DLS afin de s'assurer que la mutation de la Tyr<sup>71</sup> ne modifiait pas le repliement de la protéine. Le rayon hydrodynamique mesuré pour Ugd Y71F est le même que celui obtenu pour Ugd : 62 ± 3 Å, confirmant que la mutation n'affecte pas la structure globale de la protéine.

Nous avons ensuite effectué de nouveaux tests de phosphorylation de ce mutant avec les BY-kinases Wzc<sub>cyto</sub> et Etk<sub>cyto</sub>, en modifiant les conditions de façon à éviter d'éventuels phénomènes de phosphorylation artificielle pouvant se produire *in vitro* sur certaines tyrosines très accessibles. Nous avons ainsi pu observer une extinction du signal de phosphorylation de la protéine Ugd Y71F tout en maintenant le signal sur Ugd en incubant 2 µg d'Ugd ou d'Ugd Y71F avec 20 ng de Wzc<sub>cyto</sub> ou d'Etk<sub>cyto</sub> en présence de 5 µCi de [γ-

$^{32}$ P]ATP et 50  $\mu$ M d'ATP non radioactif pendant 2 minutes à 37°C (Fig. 36). Nous pouvons donc conclure de ces expériences que la Tyr<sup>71</sup> est un site de phosphorylation de la protéine Ugd, commun aux deux BY-kinases Wzc et Etk. Cependant, étant donné les difficultés rencontrées pour mettre en évidence ce site de phosphorylation, nous ne pouvons pas exclure qu'il existe d'autres sites de phosphorylation de la protéine Ugd.



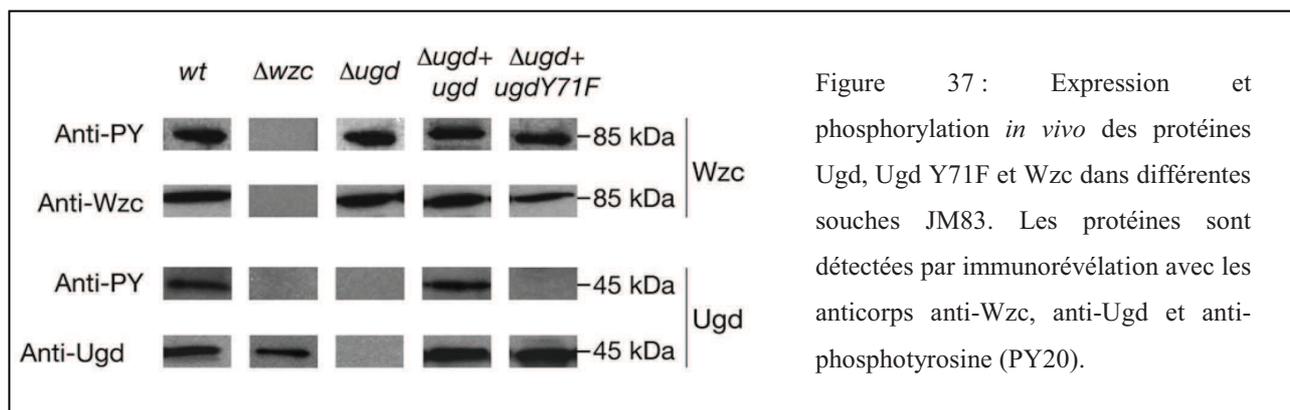
### I.3 Phosphorylation *in vivo* de la protéine Ugd par Wzc ou Etk en fonction des conditions de culture

Nous avons voulu vérifier que la phosphorylation d'Ugd observée *in vitro* sur la Tyr<sup>71</sup> pouvait être retrouvée *in vivo*.

Pour cela, nous avons construit la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* dans laquelle le gène *ugd* a été remplacé par la cassette de résistance à la kanamycine du vecteur pKD4. Nous avons également construit les vecteurs pUC-*ugd-rcsA* et pUC-*ugdY71F-rcsA* que nous avons ensuite introduits dans la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>*. Le plasmide pUC-*rcsA* induisant l'expression de l'opéron de biosynthèse de l'acide colanique a également été introduit dans la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>*. Cette dernière souche ainsi que les souches JM83 (pUC-*rcsA*) et JM83 *wzc::kan<sup>R</sup>* (pUC-*rcsA*) préalablement construites au laboratoire ont été utilisées comme contrôles. Nous avons préparé un extrait total de protéines à partir d'une culture de chacune de ces souches et nous avons contrôlé l'expression et la phosphorylation des protéines Ugd et Wzc par immunorévélation en utilisant les anticorps anti-Ugd, anti-Wzc et anti-phosphotyrosine (Fig. 37).

Nous avons observé que la BY-kinase Wzc<sub>ca</sub> est exprimée dans nos conditions de culture et qu'elle est active puisqu'elle est également révélée par l'anticorps PY20. De plus,

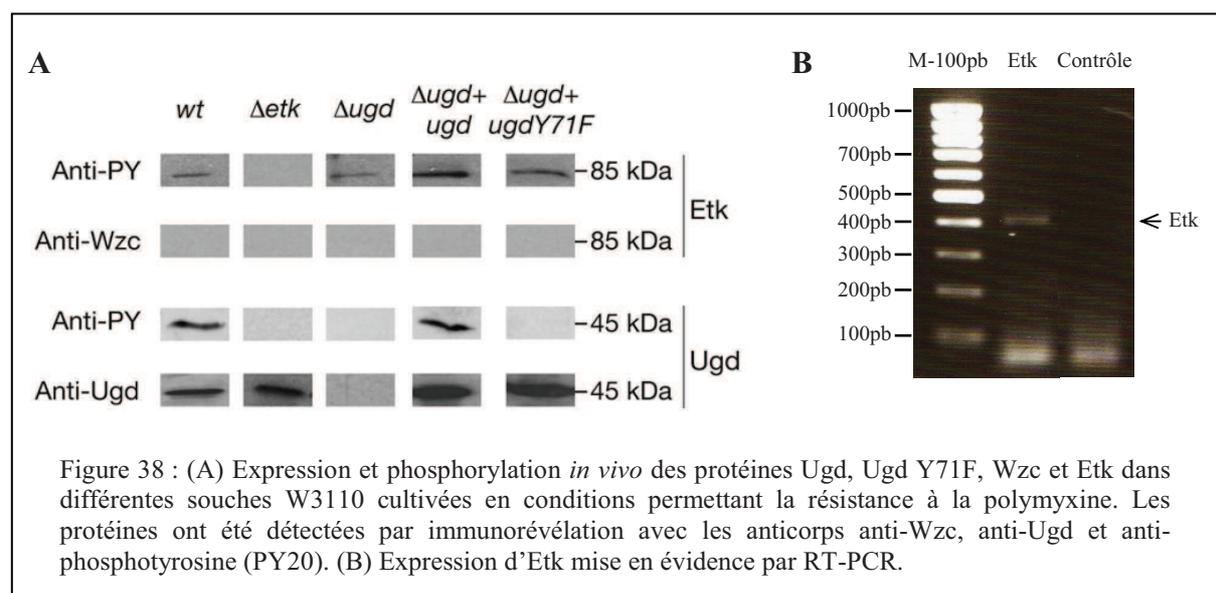
nous avons constaté que, dans ces conditions, la protéine Ugd est également exprimée et phosphorylée *in vivo* par la BY-kinase  $Wzc_{ca}$ . En effet, le signal de phosphorylation d'Ugd n'est pas détecté dans la souche JM83  $wzc::kan^R$  (pUC-*rcsA*) n'exprimant pas  $Wzc_{ca}$ . Enfin, nous confirmons que la Tyr<sup>71</sup> est bien le site de phosphorylation de la protéine Ugd par  $Wzc_{ca}$  puisqu'avec la souche JM83  $ugd::kan^R$  (pUC-*ugdY71F-rcsA*) aucun signal de phosphorylation au niveau d'Ugd n'est détecté bien que la protéine soit correctement exprimée (Fig. 37).



En parallèle, nous avons également construit les vecteurs pUC-*ugd* et pUC-*ugdY71F* que nous avons introduits dans la souche W3110  $ugd::kan^R$  précédemment construite au laboratoire. Les souches W3110, W3110  $etk::kan^R$  et W3110  $ugd::kan^R$  déjà présentes au laboratoire ont été utilisées comme contrôles. L'ensemble ces souches ont été cultivées dans des conditions de culture induisant la résistance d'*E. coli* à la polymyxine. Dans ces conditions, il a été décrit que la BY-kinase Etk est exprimée et qu'à l'inverse la BY-kinase  $Wzc$  ne l'est pas. Nous avons préparé un extrait total de protéines à partir de chacune des ces cultures et contrôlé l'expression et la phosphorylation des protéines Ugd et Etk par immunorévélation en utilisant les anticorps anti-Ugd, anti-Wzc et anti-phosphotyrosine (Fig. 38 A).

Nous avons, tout d'abord, remarqué que  $Wzc_{ca}$  n'est effectivement pas exprimée dans nos conditions de culture. En revanche nous observons un signal de phosphorylation aux alentours de 85 kDa qui disparaît dans la souche W3110  $etk::kan^R$ . Ceci suggère que ce signal correspond à celui de la BY-kinase Etk. Pour confirmer cette proposition nous avons réalisé une RT-PCR à partir d'une préparation d'ARN de la souche W3110 cultivée en conditions de résistance à la polymyxine. Nous avons utilisé l'amorce 44 pour réaliser la réaction de transcription inverse et les amorces 45 et 46 pour la PCR (taille attendue : 404pb). Cette expérience a démontré que le gène *etk* est bien exprimé dans nos conditions de culture (Fig. 38 B).

D'autre part, nous avons vérifié que la protéine Ugd est elle aussi exprimée dans les conditions de culture utilisées. Nous avons également observé que la protéine Ugd est phosphorylée *in vivo* par la BY-kinase Etk. En effet, un signal de phosphorylation sur la protéine Ugd est détecté dans la souche sauvage. Or, dans cette souche, seule la BY-kinase Etk est exprimée. De plus, ce signal disparaît dans la souche W3110 *etk::kan<sup>R</sup>* n'exprimant pas Etk. Enfin, nous confirmons que la Tyr<sup>71</sup> est bien le site de phosphorylation de la protéine Ugd par Etk puisqu'aucun signal de phosphorylation au niveau d'Ugd n'est détecté dans la souche W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugdY71F*) bien que la protéine soit correctement exprimée.



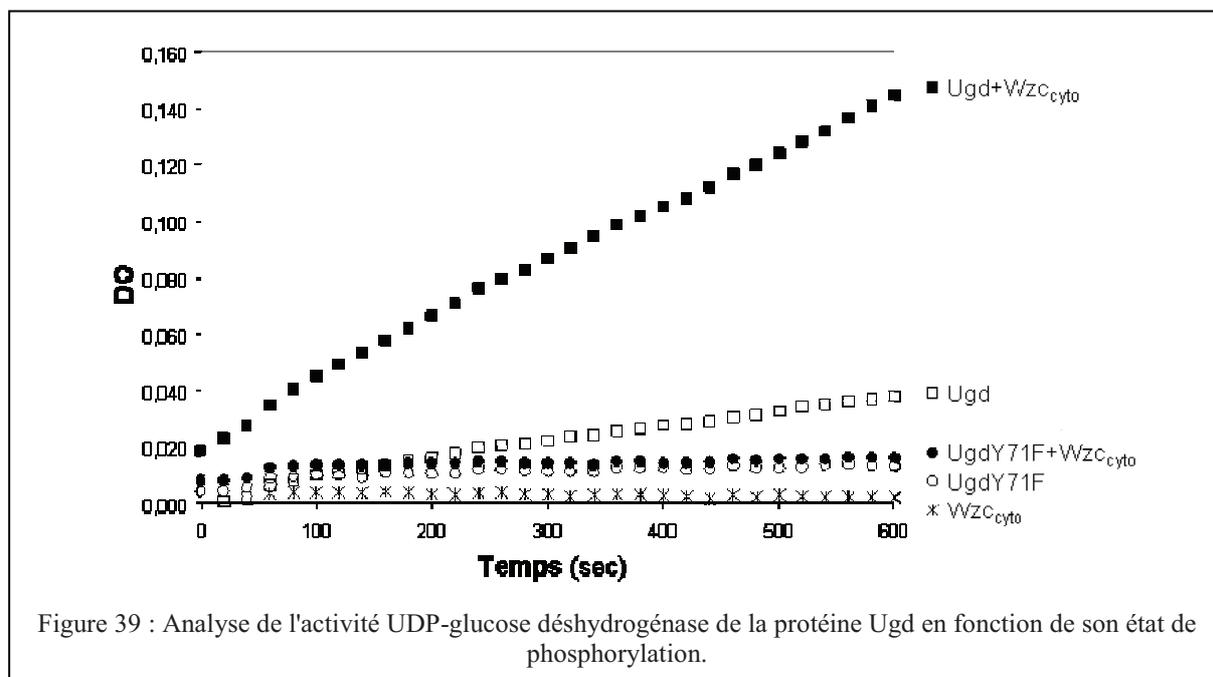
Nous avons donc montré que selon les conditions de culture utilisées, la protéine Ugd pouvait être phosphorylée *in vivo* sur le même site de phosphorylation, la Tyr<sup>71</sup>, soit par la BY-kinase Wzc<sub>ca</sub>, soit par la BY-kinase Etk. Ceci constitue le premier exemple d'une protéine bactérienne phosphorylée par deux tyrosine-kinases différentes.

## I.4 Influence de la phosphorylation de la protéine Ugd sur son activité UDP-glucose déshydrogénase

Des résultats précédemment obtenus au laboratoire avaient montré que la phosphorylation de la protéine Ugd augmentait son activité déshydrogénase (Grangeasse et al., 2003). Nous avons voulu vérifier que la Tyr<sup>71</sup> est bien le site de phosphorylation responsable de l'activation d'Ugd.

Nous avons donc déterminé l'activité UDP-glucose déshydrogénase *in vitro* des protéines Ugd et UgdY71F en présence ou en absence de la protéine Wzc<sub>cyto</sub> en suivant la formation de NADH par mesure de l'absorbance du milieu réactionnel à 340 nm. En effet, la réaction d'oxydation de l'UDP-glucose en UDP-acide glucuronique par Ugd implique la réduction concomitante de deux molécules de NAD<sup>+</sup> en NADH.

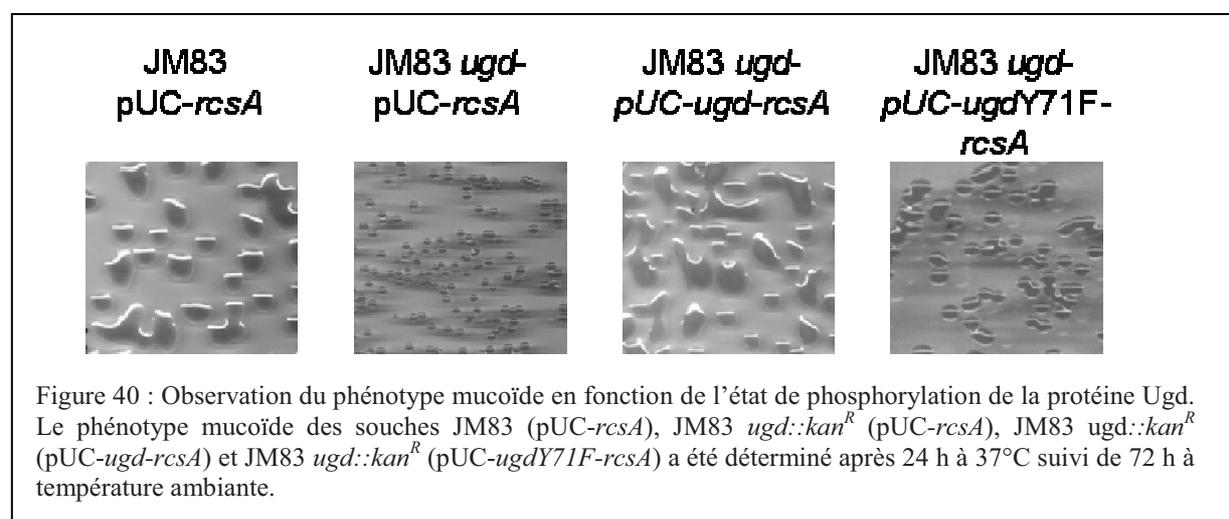
Comme attendu, Ugd possède une faible activité basale qui est augmentée d'environ 6 fois par phosphorylation (Fig. 39). A l'inverse, la protéine Ugd Y71F présente une activité déshydrogénase quasi nulle et indépendante de la présence ou non de la protéine Wzc<sub>cyto</sub>. Ceci suggère que la protéine Ugd purifiée a été partiellement phosphorylée *in vivo* lui conférant ainsi cette faible activité, tandis que la mutation de la Tyr<sup>71</sup> mime une protéine complètement déphosphorylée et inactive. Nous pouvons donc conclure que l'activité déshydrogénase de la protéine Ugd est régulée positivement par la phosphorylation d'un unique site, la Tyr<sup>71</sup>.



## 1.5 Influence de la phosphorylation de la protéine Ugd dans la production d'acide colanique

Nous avons vu dans l'exposé bibliographique que l'UDP-acide glucuronique synthétisé par Ugd est un précurseur de la sous-unité d'acide colanique. Nous venons d'établir que l'activité déshydrogénase d'Ugd est régulée par phosphorylation sur la Tyr<sup>71</sup>. Nous avons donc supposé que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup> par Wzc<sub>ca</sub> pouvait influencer la biosynthèse de l'acide colanique.

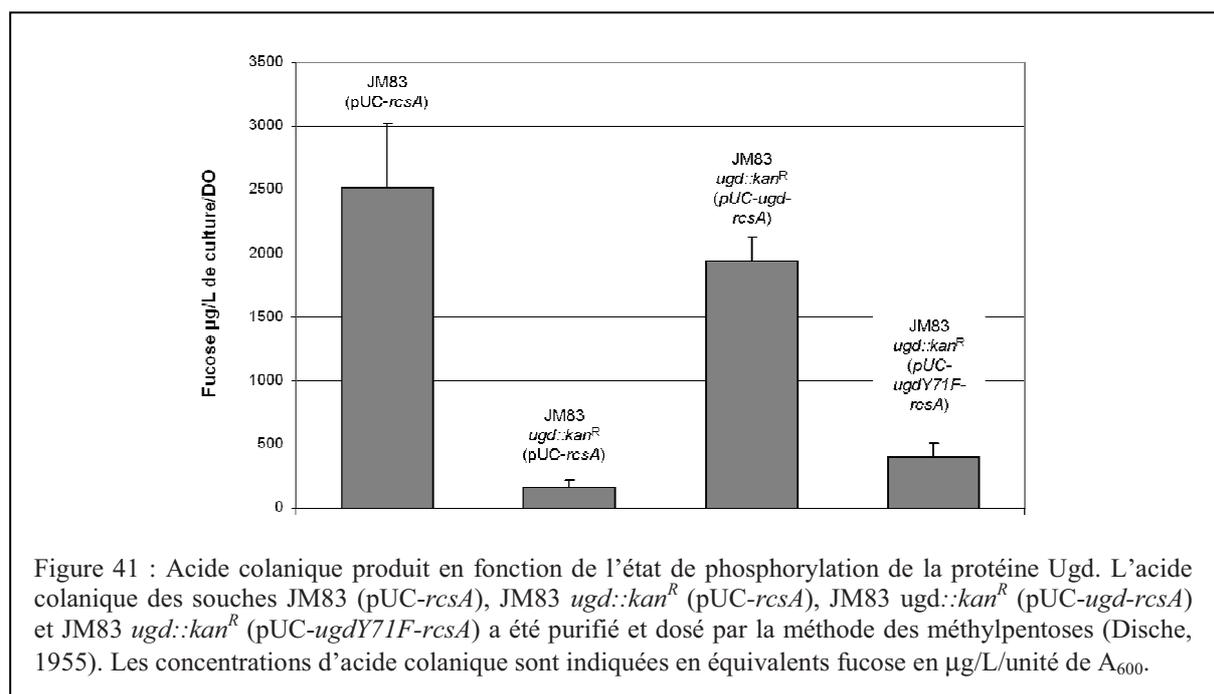
Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord observé l'aspect de différentes colonies d'*E. coli* sur boîte de LB-agar (Fig. 40). En effet, les souches produisant de l'acide colanique présentent un phénotype mucoïde qui est facilement décelable sur boîte de LB-agar par l'aspect gras et brillant des colonies. La souche sauvage JM83 (pUC-*rcsA*) exprimant la protéine RcsA forme de gros clones possédant un aspect brillant et visqueux caractéristique du phénotype mucoïde engendré par la synthèse d'acide colanique. La souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*rcsA*), inactivée au niveau du gène *ugd* et exprimant la protéine RcsA, présente, quant à elle, un caractère non-mucoïde. Les clones sont beaucoup plus petits, d'aspect sec et mat. Nous avons observé que le phénotype mucoïde est rétabli lorsque la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* est complétée par le plasmide pUC-*ugd-rcsA* exprimant à la fois Ugd et RcsA. Par contre, l'introduction du plasmide pUC-*ugdY71F-rcsA* exprimant RcsA et la protéine Ugd mutée au niveau de sa Tyr<sup>71</sup> ne permet pas de restaurer efficacement la synthèse de l'acide colanique de la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>*. Cependant, il est intéressant de noter que ces clones deviennent tout de même plus gros que les clones de la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* après 72 heures de culture, suggérant qu'une faible activité du mutant UgdY71F subsiste.



### I.5.1 Dosage de l'acide colanique produit en fonction de la phosphorylation de la protéine Ugd

Afin de confirmer cette observation visuelle, nous avons purifié et dosé l'acide colanique produit par ces différentes souches (Fig. 41). Nous pouvons remarquer que les souches JM83 pUC-*rcsA* et JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugd-rcsA*) synthétisent des quantités importantes d'exopolysaccharides. En effet, 2500 et 1900 µg équivalents fucose/L de

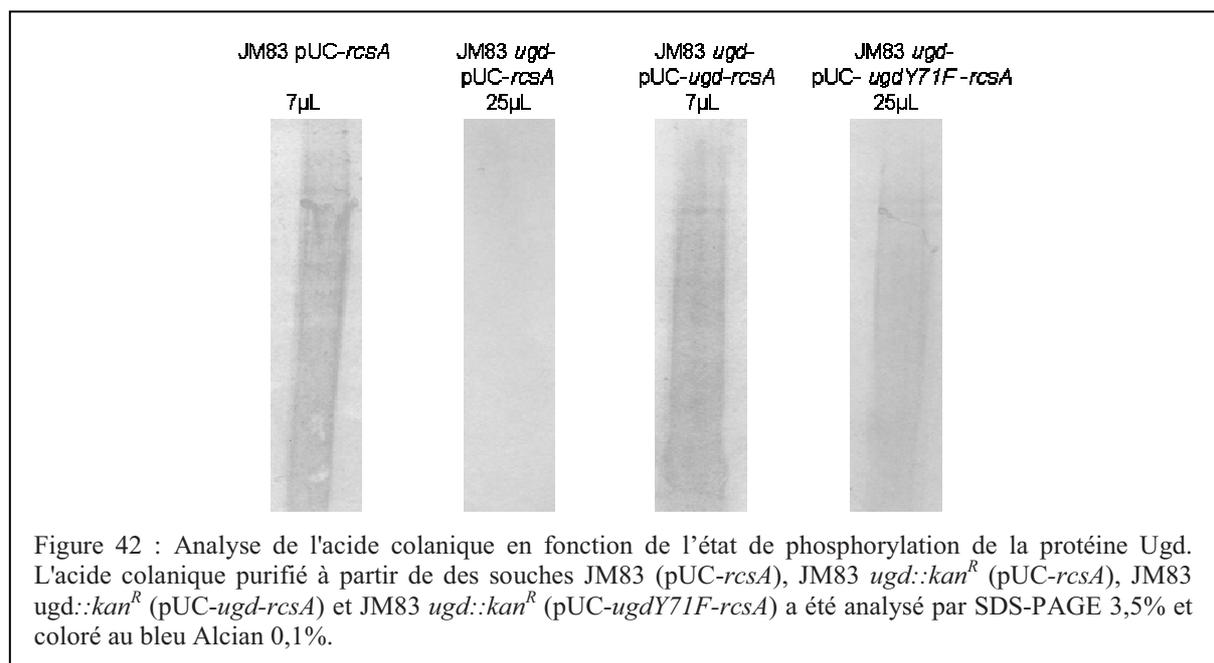
culture/unité de  $A_{600}$  ont respectivement été obtenus. A l'inverse, la souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* ne synthétise quasiment plus d'acide colanique (environ 10 fois moins). Les valeurs mesurées sont en accord avec les phénotypes mucoïdes et non mucoïdes des souches correspondantes observés sur les boîtes de LB-agar. La souche JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugdY71F-rcsA*) produit un peu plus d'acide colanique que la souche non complémentée, mais la valeur reste faible. En effet, cette souche produit 400  $\mu\text{g}$  équivalents fucose/L de culture/unité de  $A_{600}$  d'acide colanique. La phosphorylation de la protéine Ugd sur la Tyr<sup>71</sup> influence donc positivement la quantité d'acide colanique produit.



### I.5.2 Estimation de la taille de l'acide colanique produit en fonction de la phosphorylation de la protéine Ugd

Certains travaux décrivent que la quantité d'UDP-acide glucuronique intracellulaire peut influencer la taille des polymères capsulaires (Ventura et al., 2006). Afin de vérifier si, chez *E. coli*, la taille du polymère d'acide colanique est également influencée par la quantité d'UDP-acide glucuronique produit, nous avons analysé les préparations d'acide colanique purifié sur gel SDS-PAGE 3,5% coloré au bleu Alcian (Fig. 42) (Min and Cowman, 1986). Cette analyse révèle une hétérogénéité comparable de la taille de l'acide colanique produit par les souches JM83 (pUC-*rcsA*), JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugd-rcsA*) et JM83 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugdY71F-rcsA*). Nous pouvons donc conclure que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup>

influence la quantité d'acide colanique produit mais ne semble pas modifier pas la taille du polymère synthétisé.



La BY-kinase Wzc<sub>ca</sub> intervient donc dans deux étapes de la biosynthèse de l'acide colanique. Une première étape que l'on pourrait qualifier de précoce et qui consiste à phosphoryler la protéine Ugd sur la Tyr<sup>71</sup> dans le but de favoriser la synthèse de la sous-unité d'acide colanique. Puis, une seconde étape, plus tardive, dans laquelle l'état de phosphorylation de Wzc elle-même semble intervenir directement pour réguler l'assemblage et l'export du polymère synthétisé.

## 1.6 Influence de la phosphorylation de la protéine Ugd sur la résistance à la polymyxine B

Nous avons vu dans l'exposé bibliographique que l'UDP-acide glucuronique synthétisé par Ugd est un précurseur du L-Ara-4N, composé impliqué dans le développement de la résistance des bactéries à certains peptides antimicrobiens cationiques dont la polymyxine B, par modification du groupement phosphate du lipide A du LPS. De plus, nous savons qu'Etk influence la capacité de résistance d'*E. coli* à la polymyxine B (Lacour et al., 2006) et nous venons d'établir que l'activité déshydrogénase d'Ugd est stimulée par phosphorylation sur la Tyr<sup>71</sup>. Nous pouvons donc supposer que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup> par Etk influence la capacité de résistance d'*E. coli* à la polymyxine.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la capacité de résistance à la polymyxine B de la souche W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugdY71F*) à celle des souches W3110, W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* et W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugd*) cultivées en conditions de résistance à la polymyxine (Fig. 43). Nous avons observé que la souche W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* ne développe qu'une très faible résistance, même pour une concentration de 2,5 µg/mL de polymyxine B. Cette observation est en accord avec les résultats précédemment publiés (Lacour et al., 2006). La complémentation de la souche W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* par le vecteur pUC-*ugd*, restaure un niveau de survie à la polymyxine comparable à celui de la souche W3110 en présence de 5 µg/mL de polymyxine (environ 25%) et même supérieur en présence de 2,5 µg/mL de polymyxine (environ 40% contre 30%). Cette observation valide la fonctionnalité de notre essai. A partir de là, nous avons mesuré la résistance à la polymyxine de la souche W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugdY71F*). Nous avons obtenu des niveaux de résistance intermédiaires, de 2 à 3 fois inférieurs à ceux de la souche W3110 *ugd::kan<sup>R</sup>* (pUC-*ugd*) (19% et 8% de résistance à 2,5 et 5 µg/mL de polymyxine B). L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure que la phosphorylation de la protéine Ugd sur la Tyr<sup>71</sup> par la BY-kinase Etk régule la résistance à la polymyxine B d'*E. coli*. Ces expériences contribuent à expliquer le rôle d'Etk observé précédemment dans ce processus (Lacour et al., 2006).

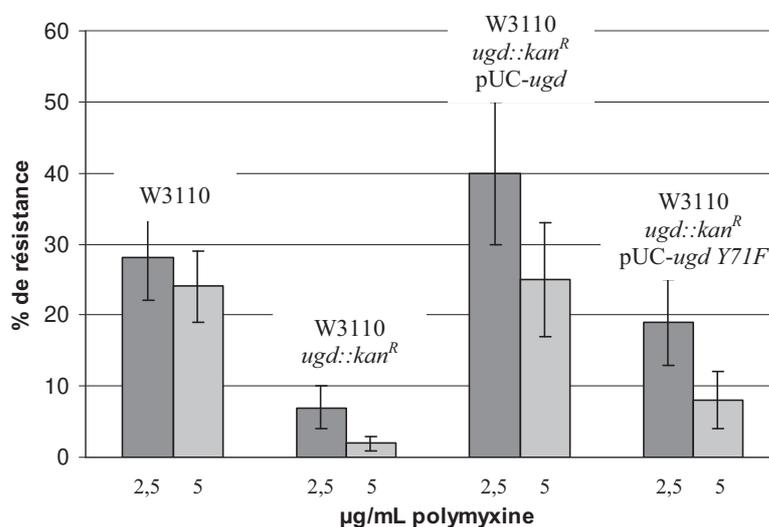


Figure 43 : Résistance à la polymyxine B en fonction de l'état de phosphorylation de la protéine Ugd. Les moyennes de résistance sont obtenues en déterminant le nombre de colonies par boîte et exprimé en % du nombre de colonies de la boîte témoin ne contenant pas de polymyxine.

## II Caractérisation biochimique et structurale de la BY-kinase A1<sub>Ct</sub>B2 de *S. aureus*

Nous avons obtenu, en collaboration avec l'équipe de cristallographie dirigée par Sylvie Nessler (LEBS, Gif-sur-Yvette), la première structure cristallographique d'une tyrosine-kinase bactérienne, la chimère A1<sub>Ct</sub>B2 de *S. aureus*, sous ses formes active et inactive. Nous avons, à partir de ces deux structures, réalisé différentes analyses biochimiques afin de comprendre le mécanisme d'autophosphorylation intermoléculaire de B2, de déterminer le mode d'activation de B2 par A1, et de vérifier la pertinence de l'état d'oligomérisation observé.

### II.1 Description de la structure cristallographique de A1<sub>Ct</sub>B2

La structure cristallographique de la protéine chimère A1<sub>Ct</sub>B2 de *S. aureus* a été obtenue à une résolution de 1,8 Å (code PDB : 3BFV) (Fig. 44). Elle révèle que la protéine est organisée sous forme de monomère et possède un repliement particulier de type  $\alpha/\beta$  caractéristique du domaine de fixation des nucléotides des protéines à P-loop. Dans la structure obtenue, le domaine N-terminal comprenant l'étiquette 6 histidines et les résidus 194 à 196 de A1, ainsi que le domaine C-terminal (résidus 215 à 230) comprenant le tyrosine cluster de B2 ne présentent pas de densité électronique bien définie.

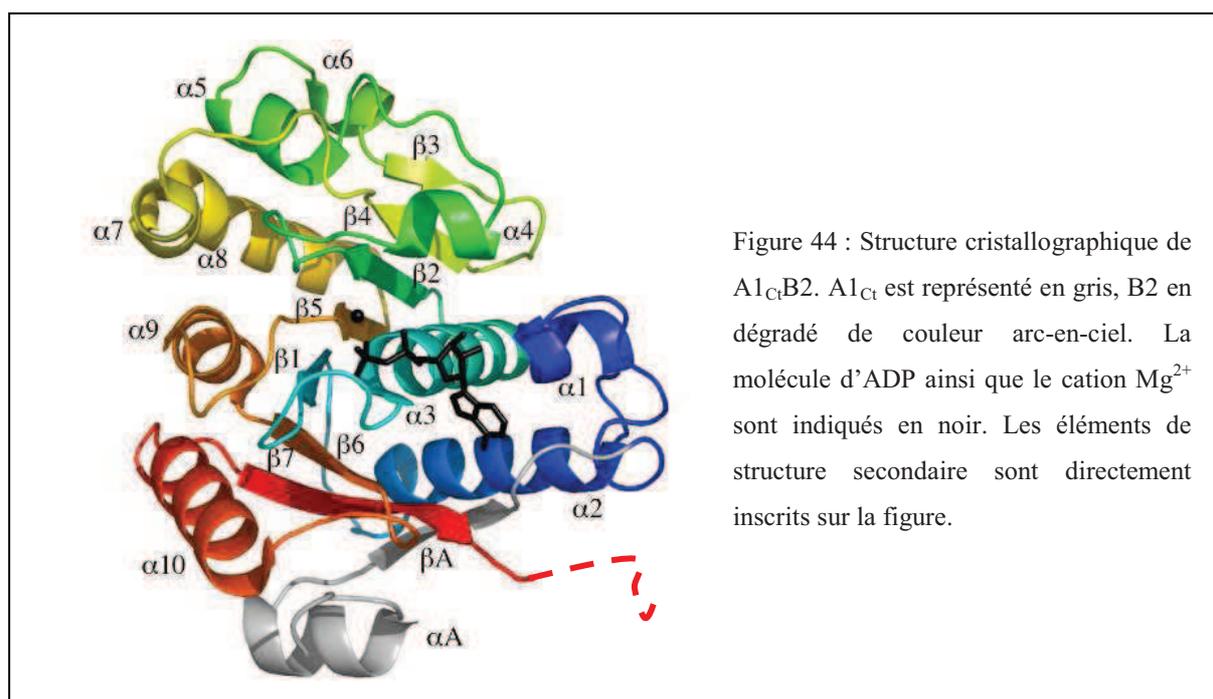
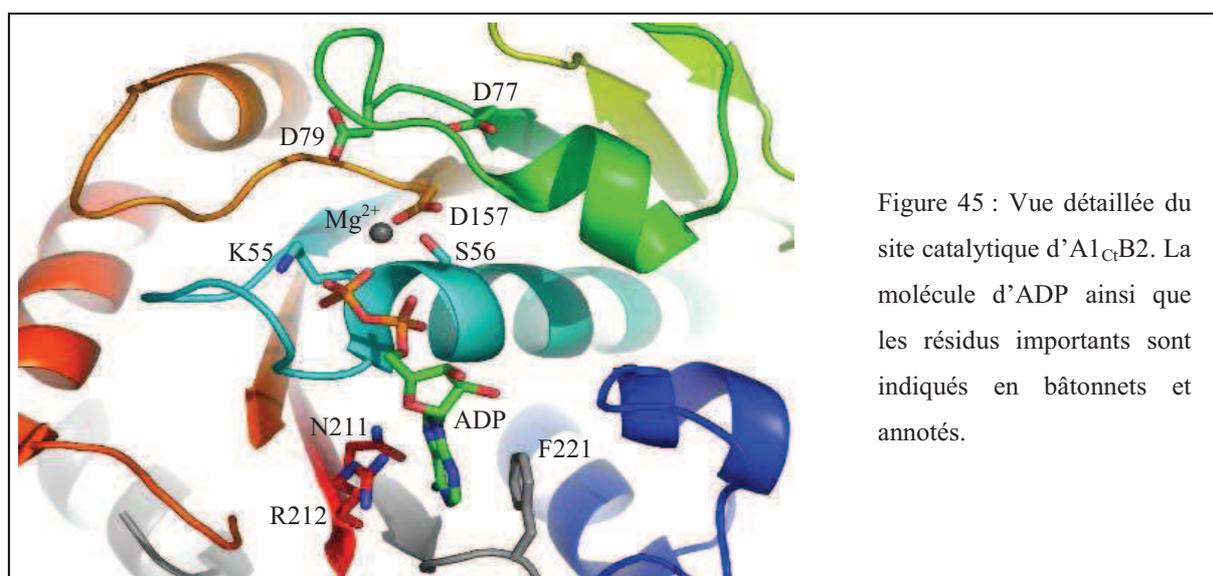


Figure 44 : Structure cristallographique de A1<sub>Ct</sub>B2. A1<sub>Ct</sub> est représenté en gris, B2 en dégradé de couleur arc-en-ciel. La molécule d'ADP ainsi que le cation Mg<sup>2+</sup> sont indiqués en noir. Les éléments de structure secondaire sont directement inscrits sur la figure.

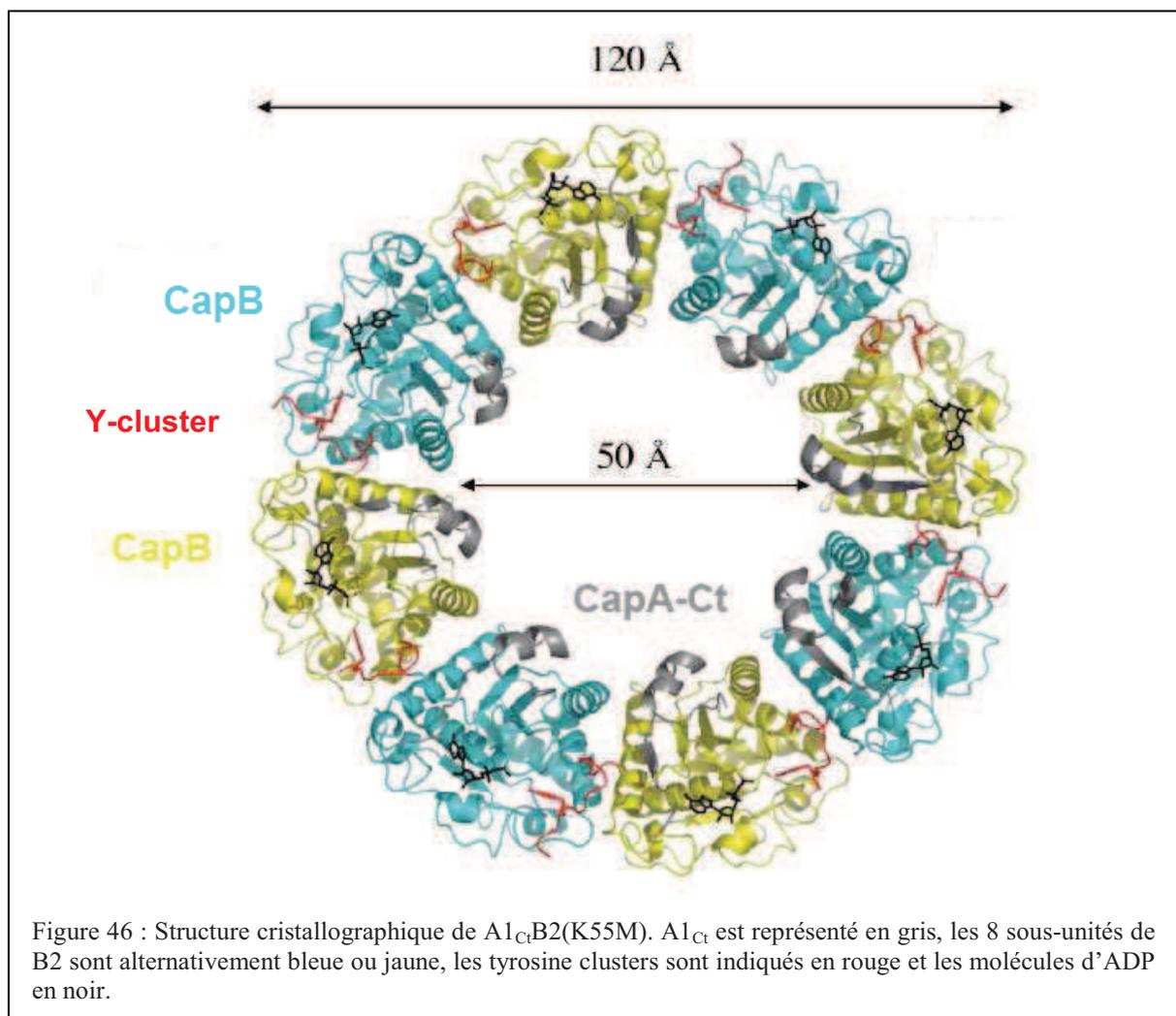
La protéine B2 est constituée d'un feuillet  $\beta$  central composé de 7 brins ( $\beta$ 1-7), entouré d'un côté de 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ 1-4) et de l'autre de 6 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ 5-10). La boucle reliant le brin  $\beta$ 1 à l'hélice  $\alpha$ 3 constitue le motif de fixation des phosphates appelé P-loop, formé par les aminoacides du Walker A ( $E^{49}APGAGKS^{56}$ ). Le fragment cytoplasmique de A1 est composé d'une hélice  $\alpha$  ( $\alpha$ A) interagissant avec l'hélice  $\alpha$ 10 de B2 et d'un brin  $\beta$  ( $\beta$ A) interagissant avec le brin  $\beta$ 7 de B2 et complétant le feuillet central  $\beta$  de la protéine. Les zones de contact entre  $A1_{Ct}$  et B2 représentent une surface totale de  $3000 \text{ \AA}^2$  et sont constituées essentiellement de résidus hydrophobes, expliquant pourquoi la chimère  $A1_{Ct}B2$  est plus soluble que la protéine B2 seule.

La structure obtenue contient un ion  $Mg^{2+}$  et une molécule d'ADP résultant sans doute de l'hydrolyse de l'ATP présent dans la solution de cristallisation (Fig. 44). Les interactions typiques entre le groupement phosphate de l'ADP et la P-loop sont observées. L'ADP est également stabilisé par interaction de l'atome d'oxygène 4 de son ribose avec l'Arg<sup>212</sup> de B2 et l'interaction des atomes d'azote 6 et 7 de son cycle adénine avec la chaîne latérale de l'Asn<sup>211</sup>. L'ion  $Mg^{2+}$  est totalement chélaté par la chaîne latérale de la Ser<sup>56</sup>, le phosphate  $\beta$  de l'ADP et quatre molécules d'eau étant elles-mêmes stabilisées par un réseau d'interaction faisant intervenir les trois acides aspartiques conservés, Asp<sup>77</sup> et Asp<sup>79</sup> du Walker B1 et Asp<sup>157</sup> du Walker B2 (Fig. 45).



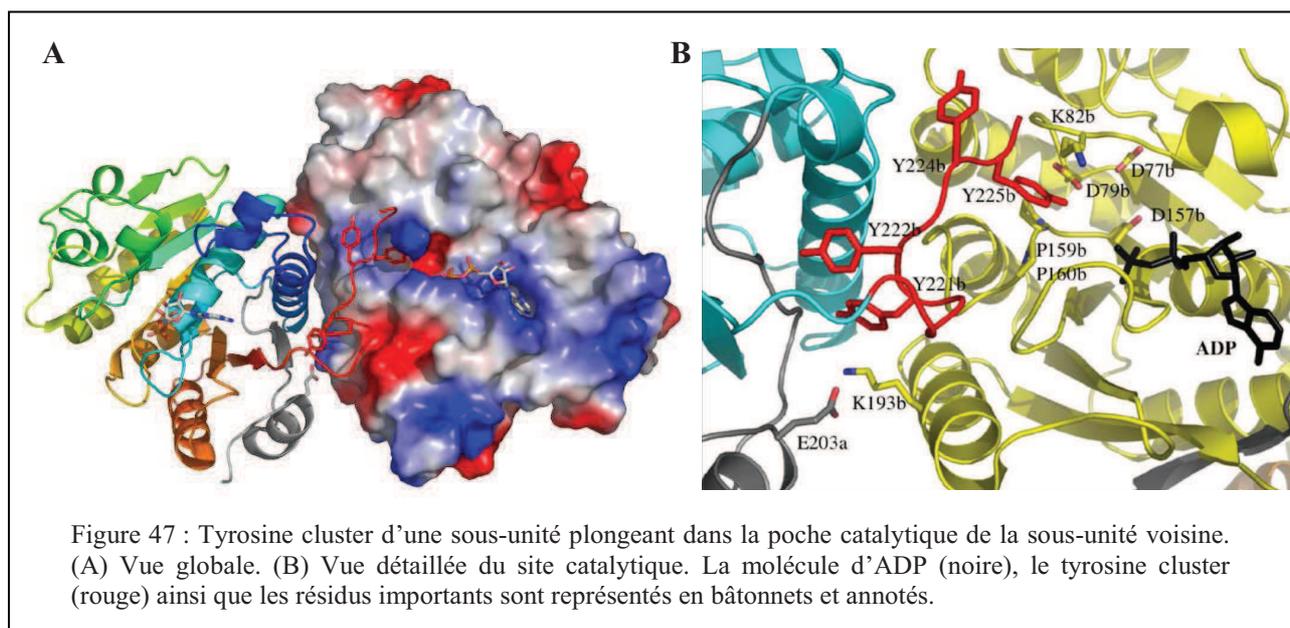
## II.2 Description de la structure cristallographique de $A1_{Ct}B2(K55M)$

La structure cristallographique de la forme inactive et non phosphorylée de la protéine  $A1_{Ct}B2$  mutée sur la lysine de son Walker A ( $A1_{Ct}B2(K55M)$ ) a également été obtenue à une résolution de 2,6 Å. Les sous-unités de cette structure adoptent un repliement similaire à celui de la protéine  $A1_{Ct}B2$  avec un rmsd de 0,67 Å sur un total de 241 résidus alignés. La différence majeure entre les deux structures réside dans leur structure quaternaire. En effet, la protéine  $A1_{Ct}B2(K55M)$  s'associe en octamère pour former un anneau (Fig. 46). Dans cette configuration, le tyrosine cluster forme une longue boucle flexible plongeant dans la poche catalytique de la sous-unité voisine.



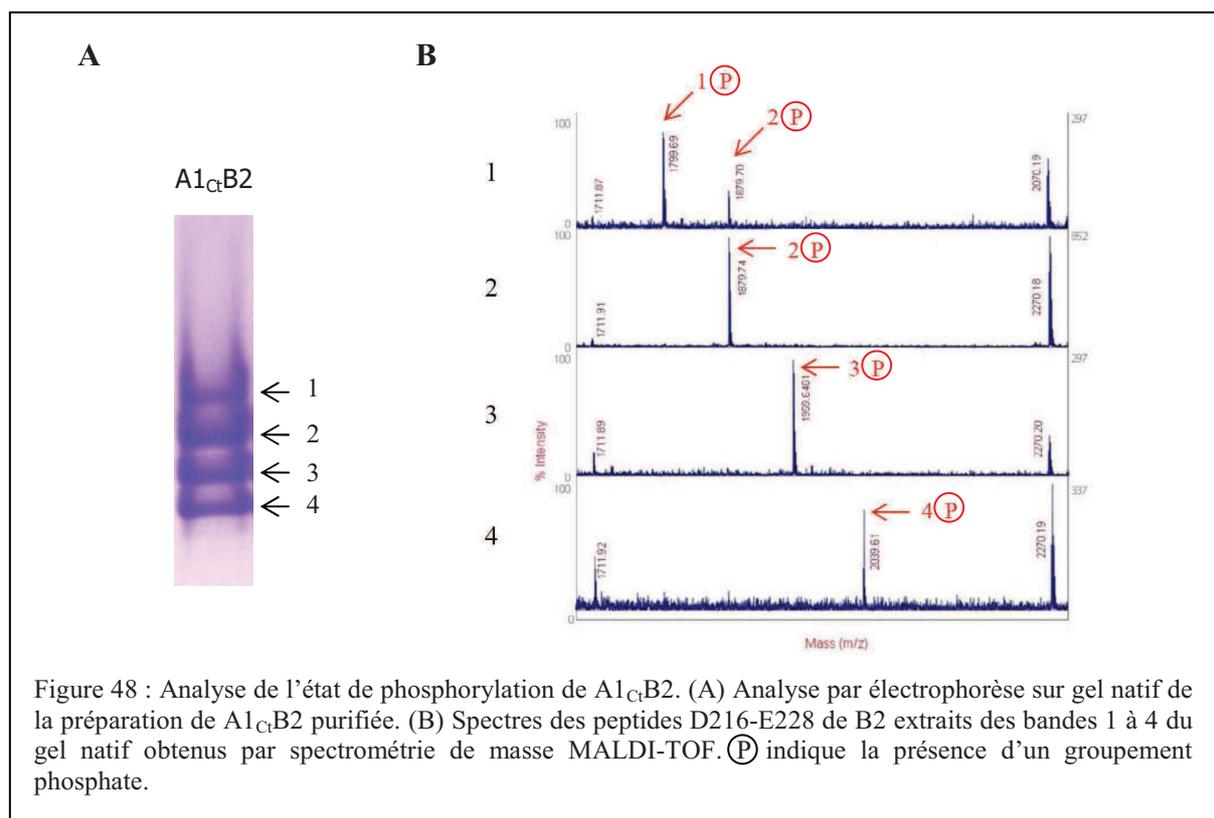
## II.3 Etude du mécanisme d'autophosphorylation intermoléculaire

Dans la structure d'A1<sub>Ct</sub>B2(K55M), nous pouvons voir précisément la dernière tyrosine du tyrosine cluster (Tyr<sup>225</sup>) dans la poche catalytique du monomère voisin (Fig. 47 A). Elle y est maintenue par des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales de la Lys<sup>82</sup> et des deux prolines du Walker B2 (Pro<sup>159</sup> et Pro<sup>160</sup>) (Fig. 47 B). Le groupement hydroxyle de la Tyr<sup>225</sup> pointe vers le groupement phosphate β de l'ADP situé à une distance de 4,8 Å. Nous avons donc estimé que la distance entre le groupement hydroxyle de la Tyr<sup>225</sup> et le groupement phosphate γ d'une molécule d'ATP serait réduite à 2,84 Å. Enfin, nous pouvons remarquer que l'Asp<sup>79</sup> du Walker B1 est idéalement positionné pour déprotonner le groupement hydroxyle de la Tyr<sup>225</sup> et ainsi catalyser sa phosphorylation. Cette organisation de la protéine en octamère permet donc d'expliquer le mécanisme de phosphorylation intermoléculaire des BY-kinases.

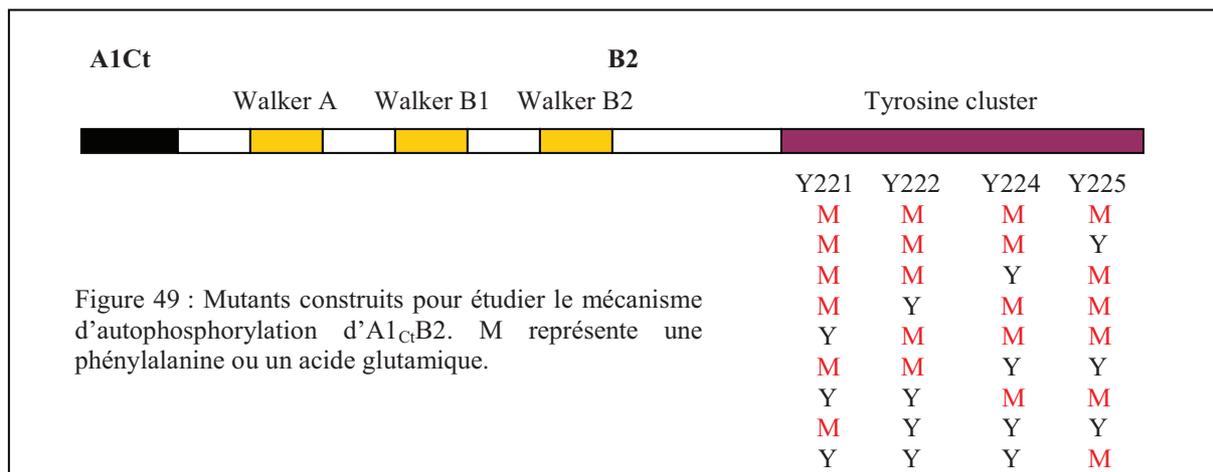


Le tyrosine cluster formant une boucle flexible, il peut être envisagé que les autres tyrosines prennent la place de la Tyr<sup>225</sup> pour être phosphorylées. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la préparation de A1<sub>Ct</sub>B2 purifiée, utilisée en cristallisation, par électrophorèse sur gel natif (Fig. 48 A). Cette analyse a révélé la présence de 4 formes de la protéine A1<sub>Ct</sub>B2 correspondant potentiellement à 4 états de phosphorylation différents. L'analyse des quatre bandes issues du gel natif par spectrométrie de masse MALDI-TOF a confirmé qu'il s'agissait bien de quatre états de phosphorylation différents puisque les quatre

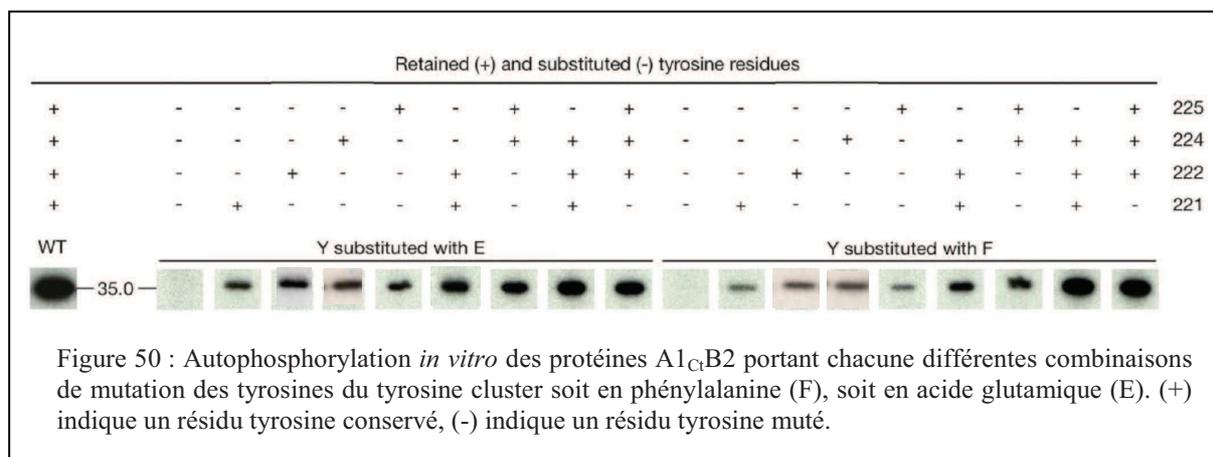
bandes du gel natif correspondent à la protéine portant respectivement un seul groupement phosphate ( $m/z$  1799,7), deux groupements phosphate ( $m/z$  1879,7), trois groupements phosphate ( $m/z$  1959,6) et quatre groupements phosphate ( $m/z$  2039,6) au niveau du tyrosine cluster (Fig. 48 B). On peut observer une légère contamination du premier échantillon par le deuxième conduisant à la détection d'une faible quantité de deux groupements phosphate sur le spectre de la première bande.



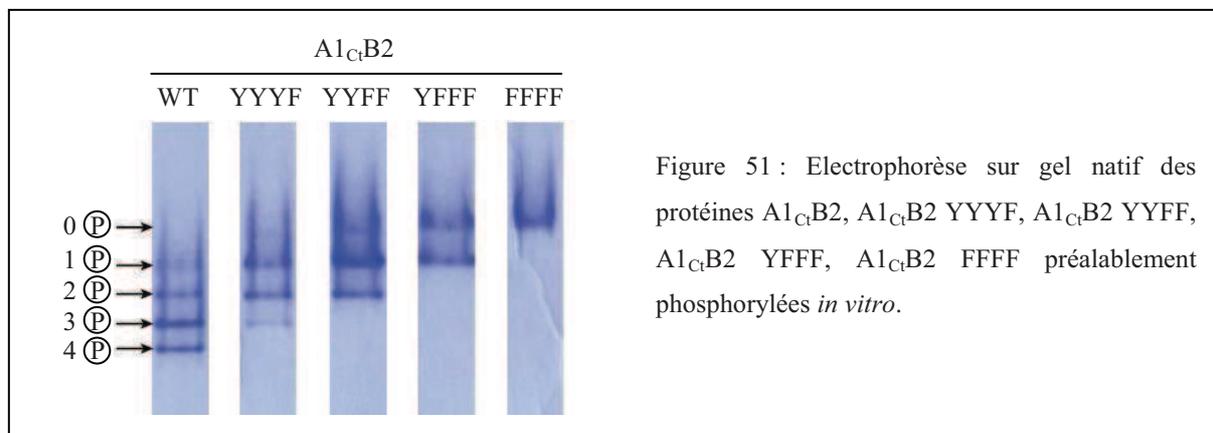
Nous pouvons conclure de ces analyses que la protéine A1<sub>Ct</sub>B2 sous sa forme monomérique est phosphorylée de façon hétérogène au niveau de son tyrosine cluster aussi bien sur 1 seule que sur deux, trois ou même quatre tyrosines. Cependant, ces analyses suscitent une interrogation sur le mécanisme précis de phosphorylation intermoléculaire : se fait-il de façon ordonnée en suivant un schéma particulier consistant, par exemple, en la phosphorylation initiale de la Tyr<sup>225</sup> qui libère ensuite la poche catalytique et permet la phosphorylation des tyrosines suivantes en respectant un ordre précis ou se fait-il plus simplement de façon aléatoire ? Pour répondre à cette interrogation, nous avons construit 18 mutants de la protéine A1<sub>Ct</sub>B2 portant chacun différentes combinaisons de mutation des tyrosines du tyrosine cluster soit en phénylalanine pour mimer une tyrosine non phosphorylée, soit en acide glutamique pour mimer une tyrosine phosphorylée (Fig. 49).



Ces mutants ont été surproduits et purifiés à homogénéité, puis leur capacité à s'autophosphoryler a été testée en présence de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  et analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et autoradiographie. Nous pouvons constater que toutes les combinaisons de mutation de trois tyrosines en phénylalanine conduisent à la phosphorylation de la tyrosine restante. Ceci indique que chaque tyrosine est phosphorylable de façon indépendante de la phosphorylation des autres. De plus, le signal semble identique pour chacun de ces mutants suggérant que les quatre tyrosines sont phosphorylées de manière équivalente, et qu'en particulier la Tyr<sup>225</sup> qui est retrouvée dans la poche catalytique de la structure cristallographique n'est pas plus facilement phosphorylable que les autres. Nous pouvons donc considérer que la position du tyrosine cluster dans la structure de la forme inactive A1<sub>Ct</sub>B2(K55M) que nous avons obtenue ne représente que l'une des 4 positions possibles. Nous pouvons également remarquer que le signal de phosphorylation est proportionnel au nombre de tyrosines présentes ce qui confirme que toutes les tyrosines semblent phosphorylables indépendamment de la phosphorylation des autres (Fig. 50).



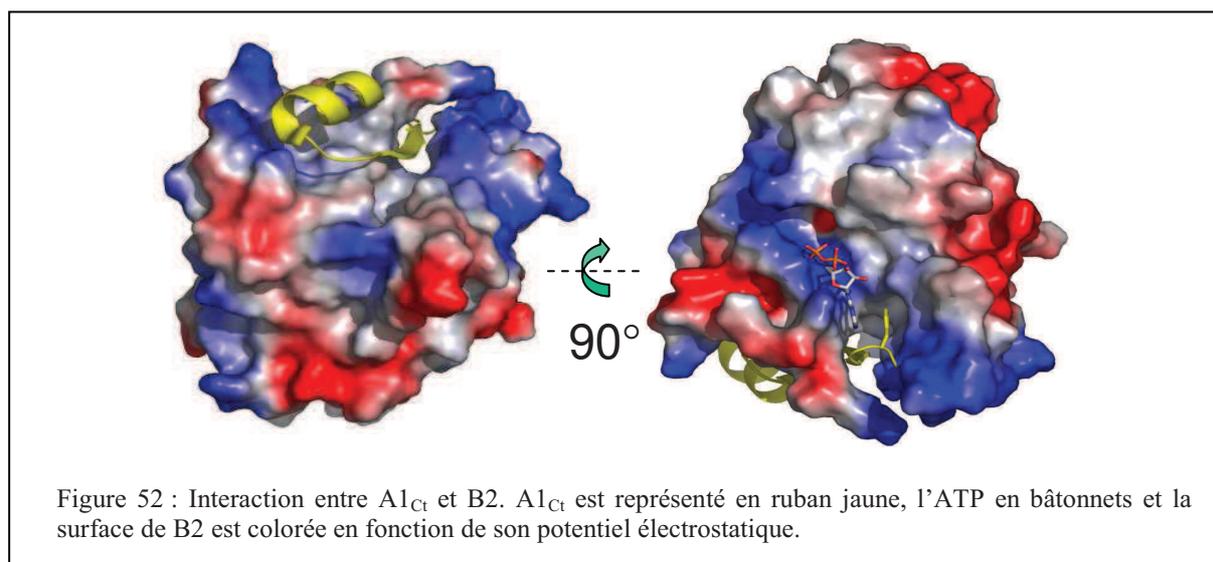
Une analyse du profil de phosphorylation de ces mutants par électrophorèse sur gel natif nous a permis de nous assurer que la mutation d'une ou plusieurs tyrosines n'affecte effectivement pas la phosphorylation des autres (Fig. 51).



Nous pouvons conclure de cette analyse par mutagenèse dirigée que toutes les tyrosines du tyrosine cluster sont phosphorylables de manière équivalente, sans ordre préférentiel et indépendamment de la phosphorylation des autres tyrosines.

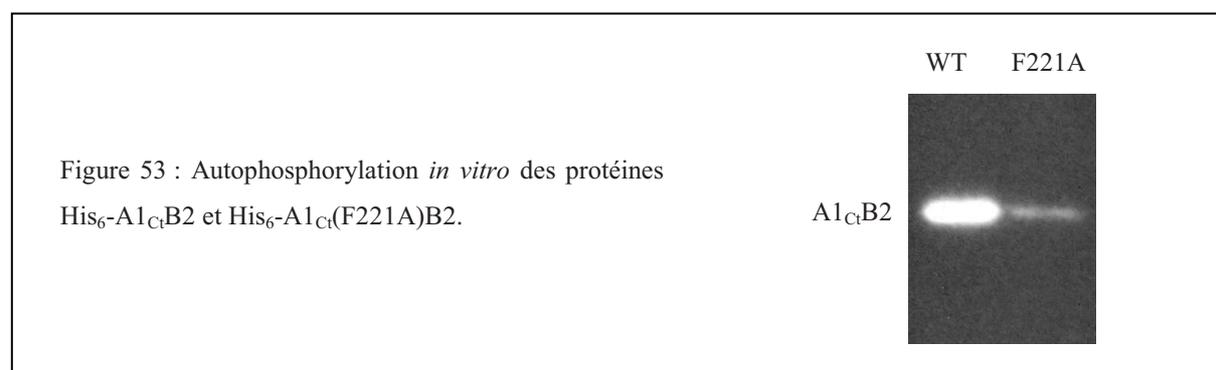
## II.4 Etude du mécanisme d'activation de B2 par A1

La structure du monomère de A1<sub>Ct</sub>B2 montre que le peptide correspondant à l'extrémité C-terminale cytoplasmique de A1 « entrelace » B2 et semble compléter la poche de fixation de l'ATP (Fig. 52).



Plus précisément, on s'aperçoit que la Phe<sup>221</sup> de A1<sub>Ct</sub> semble impliquée dans la stabilisation de l'ATP en participant à une interaction hydrophobe classique de type  $\pi$  stacking avec le noyau adénine de l'ATP. Ainsi l'adénine est « prise en sandwich » entre la

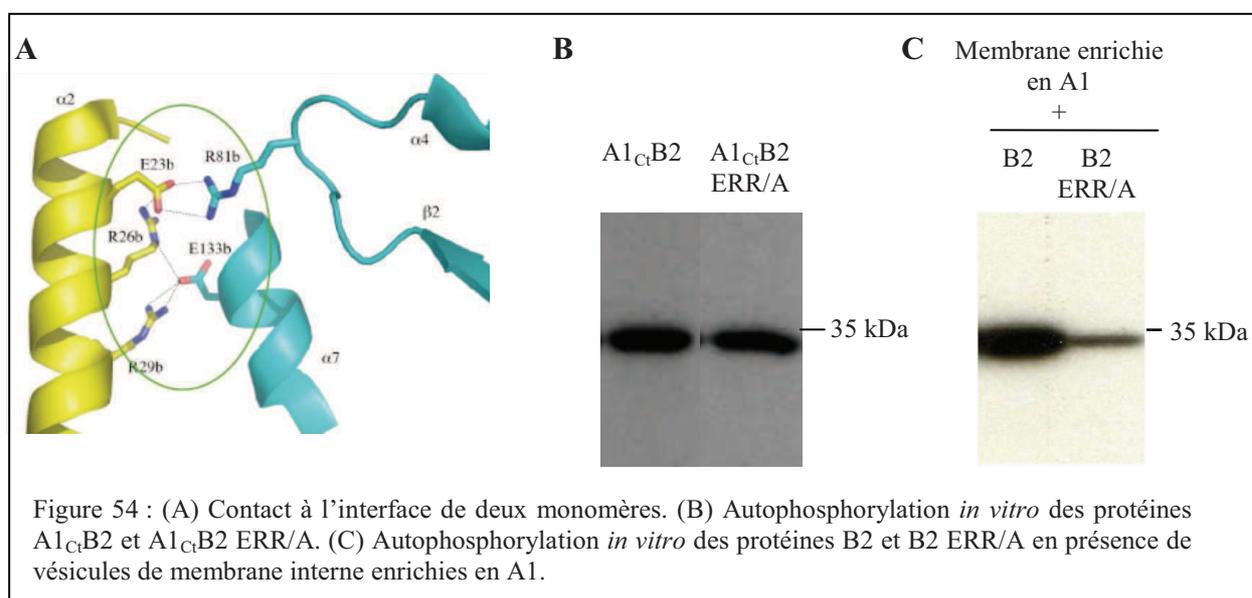
Phe<sup>221</sup> de A1<sub>Ct</sub> et l'Arg<sup>212</sup> de B2 (Fig. 45). Pour vérifier cette observation, nous avons construit le mutant A1<sub>Ct</sub>(F221A)B2 et nous avons comparé son activité autokinase à celle de la protéine A1<sub>Ct</sub>B2. Nous avons constaté que la protéine A1<sub>Ct</sub>(F221A)B2 est nettement moins phosphorylée que la protéine A1<sub>Ct</sub>B2 (Fig. 53). Ceci indique que la Phe<sup>221</sup> de A1<sub>Ct</sub> joue effectivement un rôle important dans le mécanisme catalytique de la protéine A1<sub>Ct</sub>B2 et valide la stabilisation de l'ATP par la Phe<sup>221</sup> de A1<sub>Ct</sub> dans la poche catalytique de B2 mise en évidence par l'analyse de la structure cristallographique. Ceci est en accord avec l'étude précédente (Soulat et al., 2006) qui avait démontré que l'effet activateur de A1 sur l'activité kinase de B2 était dû à une augmentation de l'affinité de B2 pour l'ATP suite à son interaction avec A1.



## II.5 Pertinence biologique de l'octamère

Au sein de l'octamère, deux zones de contact principales sont observées entre deux monomères. Comme nous l'avons déjà évoqué, la première est constituée par l'interaction du tyrosine cluster d'une sous-unité avec la poche catalytique de la sous-unité adjacente. La seconde se trouve à l'interface de deux monomères entre l'hélice  $\alpha 2$  d'une sous-unité et l'hélice  $\alpha 7$  et la boucle  $\beta 2$ - $\alpha 4$  de la sous-unité voisine (Fig. 46). Ces zones de contact représentent respectivement 44% et 50% de la surface totale de contact entre 2 monomères qui est évaluée à environ 2000 Å<sup>2</sup>. Cette valeur est suffisamment élevée pour être considérée comme représentative d'interactions biologiquement importantes (Lo Conte et al., 1999). Le fragment A1<sub>Ct</sub> n'est pas directement impliqué dans les contacts de l'octamère, à l'exception d'une interaction spécifique entre le résidu Glu<sup>203</sup> de l'hélice  $\alpha A$  de A1<sub>Ct</sub> et la Lys<sup>193</sup> de l'hélice  $\alpha 10$  de la sous-unité de B2 adjacente (Fig. 47 B). Ces résidus avaient déjà été mis en évidence dans une étude précédente (Soulat et al., 2006) par comparaison de la structure secondaire de B2 avec celle de MinD. Il avait notamment été démontré que la mutation de ces deux résidus diminuait l'activité kinase de B2.

En ce qui concerne la seconde surface de contact à l'interface entre deux monomères, on s'aperçoit qu'elle met plus précisément en jeu des liaisons hydrogène entre les résidus Glu<sup>23</sup>, Arg<sup>26</sup> et Arg<sup>29</sup> de l'hélice  $\alpha 2$  d'une sous-unité et les résidus Arg<sup>81</sup> et Glu<sup>133</sup> de la boucle  $\beta 2$ - $\alpha 4$  et de l'hélice  $\alpha 7$  respectivement de la sous-unité voisine (Fig. 54 A). Etant donné que l'octamérisation de A1<sub>Ct</sub>B2 semble expliquer son autophosphorylation intermoléculaire, nous avons voulu vérifier l'importance de ces résidus dans la capacité d'autophosphorylation de la protéine. Pour cela nous avons construit le mutant A1<sub>Ct</sub>B2 ERR/A que nous avons surproduit et purifié à homogénéité. Nous avons ensuite comparé son activité autokinase à celle de la protéine A1<sub>Ct</sub>B2. De façon surprenante, nous avons constaté qu'il n'y a quasiment pas de différence entre le mutant et la protéine sauvage (Fig. 54 B). Nous avons recommencé l'expérience en nous rapprochant des conditions rencontrées *in vivo* en n'utilisant non plus la chimère A1<sub>Ct</sub>B2 mais les deux protéines entières et distinctes A1 et B2 et en maintenant la protéine A1 dans la membrane interne. Nous avons donc construit le mutant B2 ERR/A que nous avons surproduit et purifié à homogénéité, de même que la protéine B2. En parallèle nous avons préparé des vésicules de membrane interne enrichies en protéine A1. Nous avons ensuite réalisé un test de phosphorylation en incubant les protéines B2 ou B2 ERR/A avec une préparation de vésicules de membrane interne enrichie en A1 en présence de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]. De cette manière, nous avons remarqué une différence significative entre l'autophosphorylation de B2 et celle de B2 ERR/A. En effet, le comptage en scintillation de la radioactivité portée par les deux protéines indique que le signal d'autophosphorylation de B2 ERR/A ne représente que 16% de celui de la protéine sauvage (Fig. 54 C). Dans ces conditions, il semble que les résidus Glu<sup>23</sup>, Arg<sup>26</sup> et Arg<sup>29</sup> de B2 soient nécessaires à l'interphosphorylation de la protéine ce qui soutient l'existence de l'octamère *in vivo*.



Des alignements de séquences de diverses BY-kinases ont démontré que les résidus Glu<sup>23</sup>, Arg<sup>26</sup>, Arg<sup>29</sup>, Arg<sup>81</sup> et Glu<sup>133</sup>, impliqués dans le contact de deux monomères au sein de la configuration octamérique, sont très conservés parmi les BY-kinases (Fig. 55).

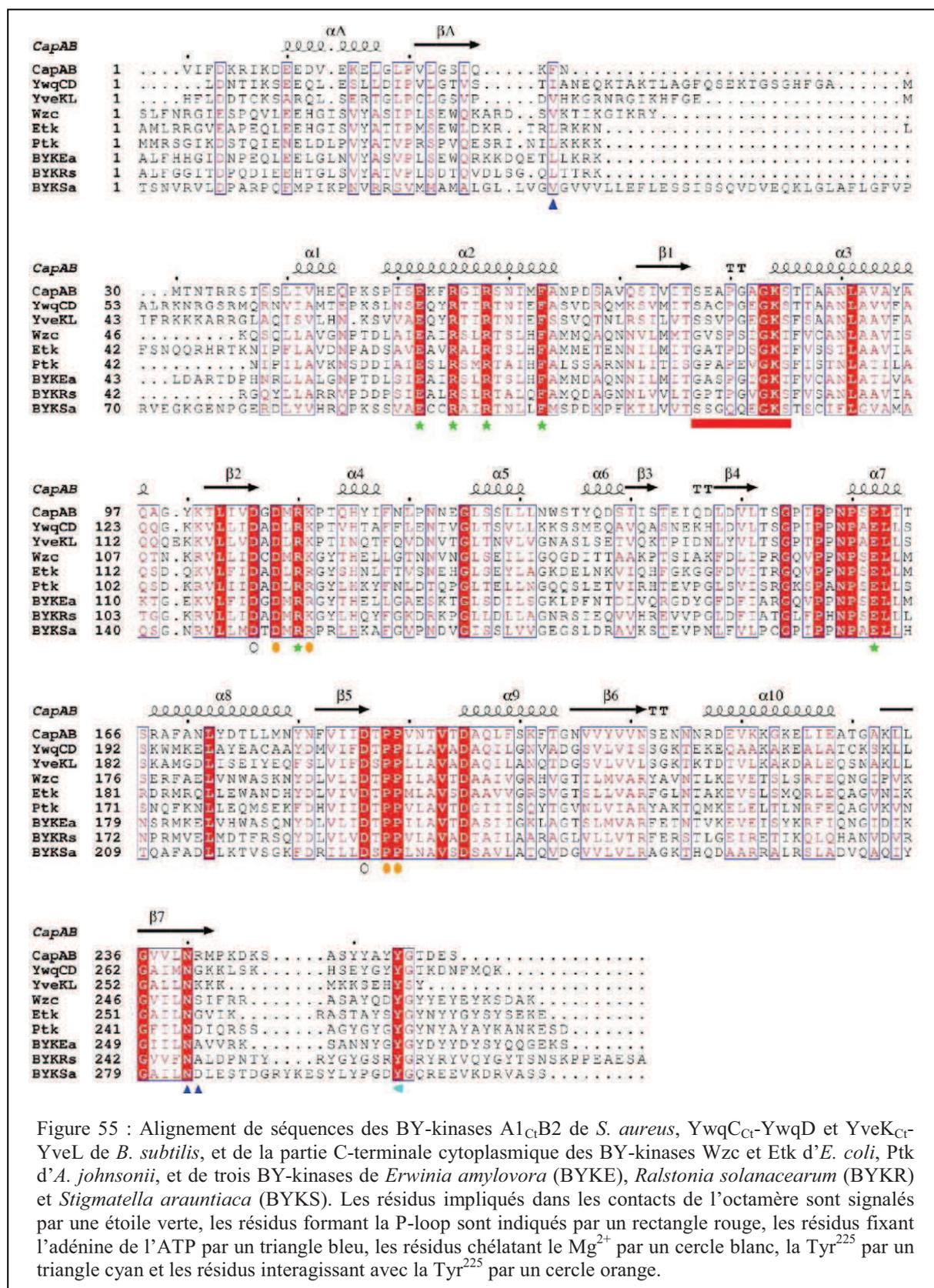


Figure 55 : Alignement de séquences des BY-kinases A1<sub>Ct</sub>B2 de *S. aureus*, YwqC<sub>Ct</sub>-YwqD et YveK<sub>Ct</sub>-YveL de *B. subtilis*, et de la partie C-terminale cytoplasmique des BY-kinases Wzc et Etk d'*E. coli*, Ptk d'*A. johnsonii*, et de trois BY-kinases de *Erwinia amylovora* (BYKE), *Ralstonia solanacearum* (BYKR) et *Stigmatella araumtiaca* (BYKS). Les résidus impliqués dans les contacts de l'octamère sont signalés par une étoile verte, les résidus formant le P-loop sont indiqués par un rectangle rouge, les résidus fixant l'adénine de l'ATP par un triangle bleu, les résidus chélatant le Mg<sup>2+</sup> par un cercle blanc, la Tyr<sup>225</sup> par un triangle orange et les résidus interagissant avec la Tyr<sup>225</sup> par un cercle orange.

Cette observation indique que l'organisation en octamère doit être un mode d'organisation ubiquitaire des BY-kinases et suggère un rôle fonctionnel important de l'octamère.

### III Etude structurale et fonctionnelle de la BY-kinase

#### Wzc<sub>ca</sub> d'*E. coli*

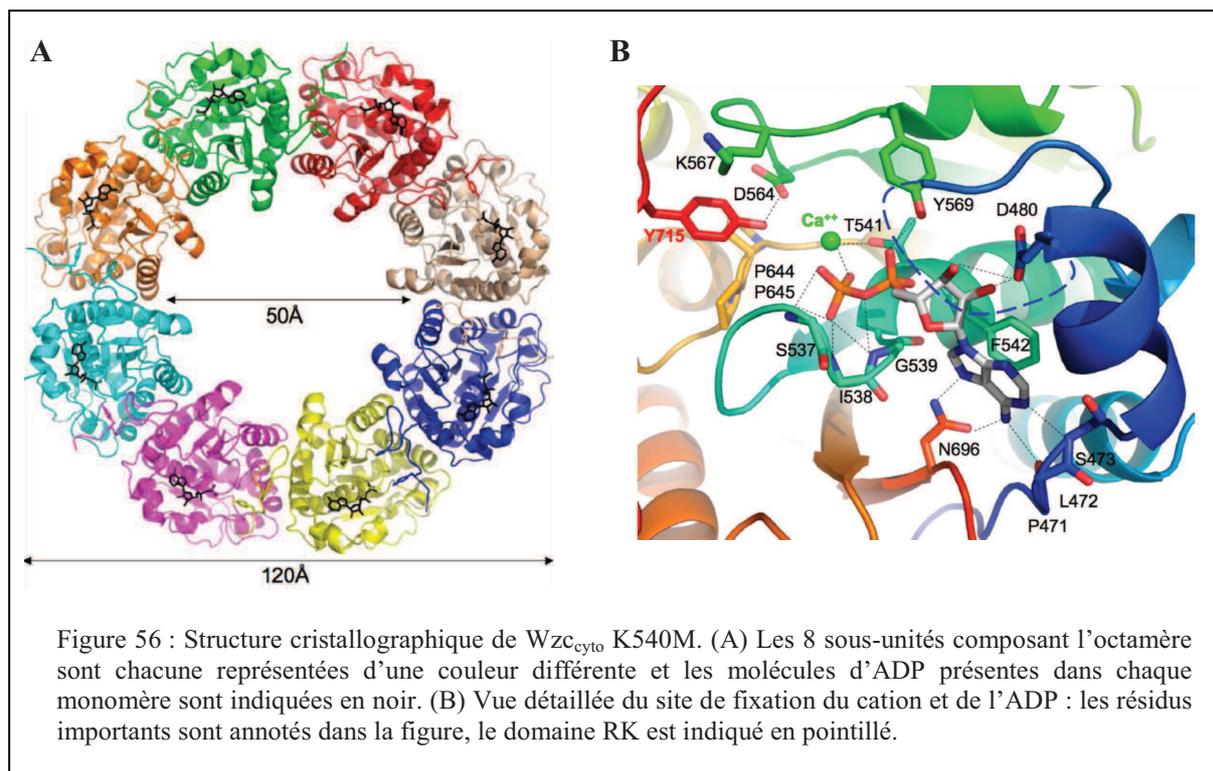
Nous avons obtenu, en collaboration avec l'équipe de cristallographie dirigée par Sylvie Nessler (LEBS, Gif-sur-Yvette), la structure cristallographique du domaine cytoplasmique de la tyrosine kinase Wzc<sub>ca</sub> d'*E. coli* K12, mutée au niveau de la lysine catalytique de son motif A de Walker (K540M). L'analyse de cette structure nous a permis de définir l'état d'oligomérisation de la protéine Wzc<sub>ca</sub>, de comprendre son mécanisme d'autophosphorylation en revisitant la pertinence de la phosphorylation de la tyrosine interne Tyr<sup>569</sup>, et de proposer un rôle pour le domaine RK, riche en arginine et en lysine, retrouvé uniquement chez les BY-kinases des protéobactéries.

#### III.1 Description de la structure cristallographique de Wzc<sub>cyto</sub> K540M

La structure cristallographique de la partie cytoplasmique de la protéine Wzc<sub>ca</sub> d'*E. coli* K12, portant la mutation K540M a été obtenue à une résolution de 3,2 Å (code PDB : 3LA6). Elle révèle que la protéine Wzc<sub>cyto</sub> sous sa forme inactive et par conséquent non phosphorylée, est organisée sous forme d'octamère, formant un anneau de diamètre interne 50 Å et de diamètre externe 120Å (Fig. 56 A), tout comme la BY-kinase A1<sub>Ct</sub>B2(K55M) de *S. aureus* (2VED). Les huit sous-unités monomériques de Wzc<sub>cyto</sub> K540M possèdent un repliement identique, de type  $\alpha/\beta$  caractéristique du domaine de fixation des nucléotides des protéines à P-loop, très comparable à ceux des deux premières structures de BY-kinases décrites A1<sub>Ct</sub>B2 de *S. aureus* (3BFV) et Etk<sub>cyto</sub> d'*E. coli* (3CIO). En revanche, une partie du domaine RK (résidus 482 à 493) ne présente pas de densité électronique bien définie.

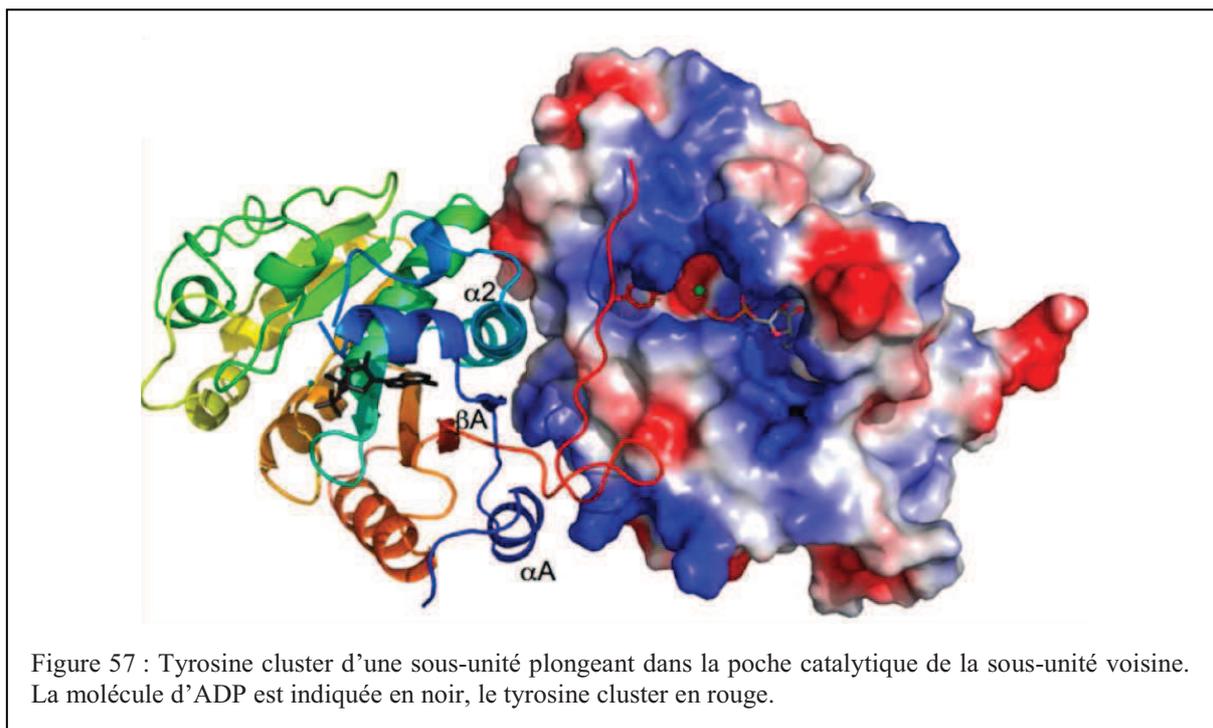
Dans la structure obtenue, chaque monomère contient un cation, probablement un ion Ca<sup>2+</sup> présent en plus forte concentration dans la solution de cristallisation que les ions Mg<sup>2+</sup>, et une molécule d'ADP également présente dans la solution de cristallisation (Fig. 56 B). Le cation interagit avec le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la Thr<sup>541</sup> du Walker A

et le phosphate  $\beta$  de l'ADP qui est lui-même maintenu par les interactions typiques de ce groupement phosphate avec les atomes d'azote des chaînes principales des résidus Ser<sup>537</sup>, Ile<sup>538</sup> et Gly<sup>539</sup> du Walker A. L'ADP est également stabilisé par interaction des atomes d'azote de son cycle adénine avec la chaîne latérale du résidu Asn<sup>696</sup> et les chaînes principales des résidus Pro<sup>471</sup> et Ser<sup>473</sup>, ainsi que par une interaction hydrophobe de type  $\pi$  stacking de son cycle adénine avec la chaîne latérale du résidu Phe<sup>542</sup>.



### III.2 Etude du mécanisme d'autophosphorylation de Wzc<sub>cyto</sub>

Dans la structure obtenue, le tyrosine cluster de chaque sous-unité forme une longue boucle flexible plongeant dans la poche catalytique de la sous-unité voisine. Comme dans le cas d' A1<sub>C</sub>B2(K55M), nous pouvons remarquer que la dernière tyrosine du tyrosine cluster, la Tyr<sup>715</sup>, est située à proximité de la molécule d'ADP (Fig. 57). Elle est maintenue dans cette position par des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales de la Lys<sup>567</sup>, d'une part et des deux prolines du Walker B2 (Pro<sup>644</sup> et Pro<sup>645</sup>), d'autre part. Nous pouvons également remarquer que l'Asp<sup>564</sup> du Walker B1 est idéalement placé pour déprotonner le groupement hydroxyle de la Tyr<sup>715</sup> et ainsi catalyser sa phosphorylation (Fig. 56 B).

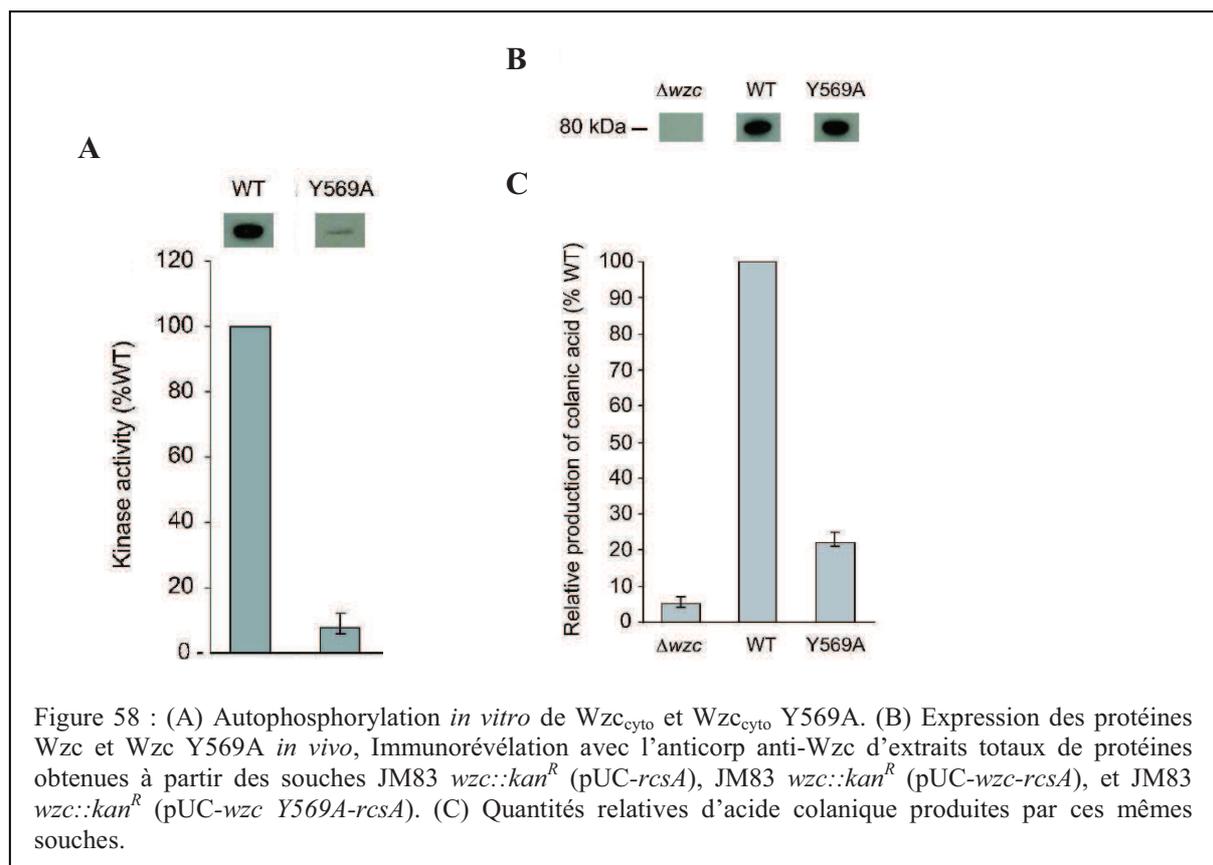


Une étude précédente avait démontré que les résidus Tyr<sup>708</sup>, Tyr<sup>710</sup>, Tyr<sup>711</sup>, Tyr<sup>713</sup> et Tyr<sup>715</sup> du tyrosine cluster étaient phosphorylés (Grangeasse et al., 2002). Ceci est en accord avec la structure obtenue, puisque de simples changements conformationnels permis par la flexibilité de la boucle du tyrosine cluster suffisent pour placer chacune de ces tyrosines dans la position de la Tyr<sup>715</sup> au niveau du site catalytique. En revanche, la phosphorylation de la première tyrosine du tyrosine cluster, la Tyr<sup>705</sup>, apparaît extrêmement difficile car elle demanderait un changement conformationnel considérable. Ceci est également en adéquation avec l'étude citée précédemment dans laquelle les auteurs n'avaient pas mis en évidence la phosphorylation de cette tyrosine. Ainsi, l'oligomérisation de Wzc en octamère permet, comme dans le cas d' A1<sub>Ct</sub>B2, d'expliquer le mécanisme de phosphorylation intermoléculaire de son tyrosine cluster.

En revanche, la structure obtenue ne permet pas d'expliquer la première étape de phosphorylation intramoléculaire de la protéine Wzc sur la Tyr<sup>569</sup> précédemment observée et décrite comme activant la protéine (Grangeasse et al., 2002). En effet, la Tyr<sup>569</sup> est bien située à proximité de la molécule d'ADP mais n'est pas dans une position convenable pour sa phosphorylation selon le mécanisme typique de transfert du phosphate  $\gamma$  de l'ATP par les kinases à P-loop (Hartmann et al., 2006). En effet, dans ce mécanisme l'atome receveur du

groupement phosphate doit être aligné avec l'atome de phosphore du groupement phosphate  $\gamma$  et l'atome d'oxygène reliant les groupements phosphate  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP. Pour placer la Tyr<sup>569</sup> dans une position compatible avec son intraphosphorylation, il faudrait lui faire subir un changement conformationnel important qui impliquerait de modifier la position des résidus catalytiques Asp<sup>562</sup> et Asp<sup>564</sup> du motif B1 de Walker, endommageant la poche catalytique et conduisant vraisemblablement à la perte de l'activité kinase de la protéine (Soulat et al., 2007). De la même manière, un changement dans l'orientation de la molécule d'ATP pour permettre la phosphorylation de la Tyr<sup>569</sup> ne paraît pas envisageable (Smith and Rayment, 1996). Au vu de cette structure, il semble donc que la Tyr<sup>569</sup> ne soit pas phosphorylable.

Pourtant, l'étude faite à partir de la structure d'Etk a indiqué que l'équivalent de la Tyr<sup>569</sup>, la Tyr<sup>574</sup>, est phosphorylée (Lee et al., 2008). Les auteurs ont de plus proposé un mécanisme expliquant l'activation de la protéine par cette phosphorylation (Lee and Jia, 2009 ; Lu et al., 2009). Nous avons donc réalisé différentes expériences pour déterminer si le mécanisme d'activation proposé pour Etk pouvait être adapté à Wzc. Nous avons, tout d'abord, vérifié l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de la Tyr<sup>569</sup> pourrait induire la libération du site catalytique et activer la fonction kinase de la protéine. Pour cela nous avons produit et purifié la protéine Wzc<sub>cyto</sub> Y569A. Nous avons ensuite comparé son activité autokinase à celle de la protéine Wzc<sub>cyto</sub> en réalisant un test de phosphorylation en présence de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, autoradiographie, et comptage en scintillation, nous avons constaté que ce mutant possède une activité kinase très faible, ne représentant que 10% de celle de la protéine sauvage (Fig. 58 A). Ce résultat est surprenant car la mutation Y569A mime un site actif libre et devait selon l'hypothèse de Lee et al. (2009) conduire à une activité kinase comparable à celle de la protéine sauvage. Nous avons également vérifié l'influence de cette mutation en mesurant la quantité d'acide colanique produit par une souche d'*E. coli* inactivée au niveau du gène *wzc* et exprimant une copie épisomale du gène *wzc* Y569A. Comme dans le cas de l'activité kinase, nous pouvons remarquer que la production d'acide colanique est fortement altérée par la mutation Y569A (Fig. 58 B et C), confirmant que dans le cas de Wzc, la protéine n'est pas activée par rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>569</sup> pour libérer le site catalytique comme proposé pour Etk.

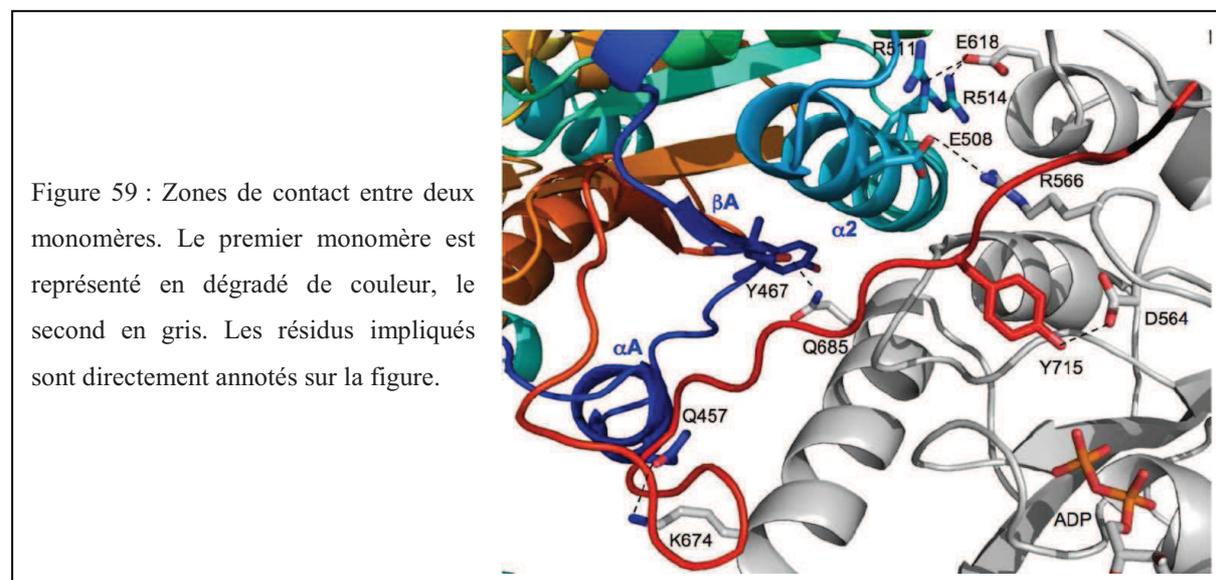


La Tyr<sup>569</sup>, bien que non phosphorylable, est néanmoins importante pour l'activité kinase de Wzc ainsi que pour la production d'acide colanique. En examinant la structure de Wzc, nous avons remarqué que la Tyr<sup>569</sup> peut effectivement jouer un rôle dans l'activité kinase de Wzc. En effet, une liaison hydrogène peut être établie entre le groupement hydroxyle de la Tyr<sup>569</sup> et le groupement phosphate  $\alpha$  de l'ADP participant ainsi à sa stabilisation dans la poche catalytique. Pour confirmer cette observation, l'équipe de Sylvie Nessler a comparé l'affinité des protéines Wzc<sub>cyto</sub> et Wzc<sub>cyto</sub> Y569F pour le mant-ADP. Il s'est avéré que le mutant Wzc<sub>cyto</sub> Y569F possède une affinité pour l'ADP cinq fois inférieure à celle de la protéine sauvage, confirmant ainsi le rôle crucial de l'interaction de la Tyr<sup>569</sup> avec le phosphate  $\alpha$  de l'ADP dans la fixation de celui-ci, et par conséquent, sur l'activité kinase de la protéine et la phosphorylation intermoléculaire de son tyrosine cluster. Ceci conduit à une réinterprétation des résultats obtenus auparavant, à savoir que la très faible phosphorylation observée pour la protéine Wzc<sub>cyto</sub> dépourvue de son tyrosine cluster ne correspond pas à une réelle phosphorylation de la Tyr<sup>569</sup> mais plutôt à une phosphorylation artificielle, biologiquement non significative. L'activité kinase extrêmement réduite observée pour le mutant Wzc<sub>cyto</sub> Y569F ne serait pas due à l'absence de phosphorylation de la

Tyr<sup>569</sup> mais plutôt à une modification de l'affinité de la protéine pour l'ATP en raison de l'impossibilité de créer une liaison hydrogène.

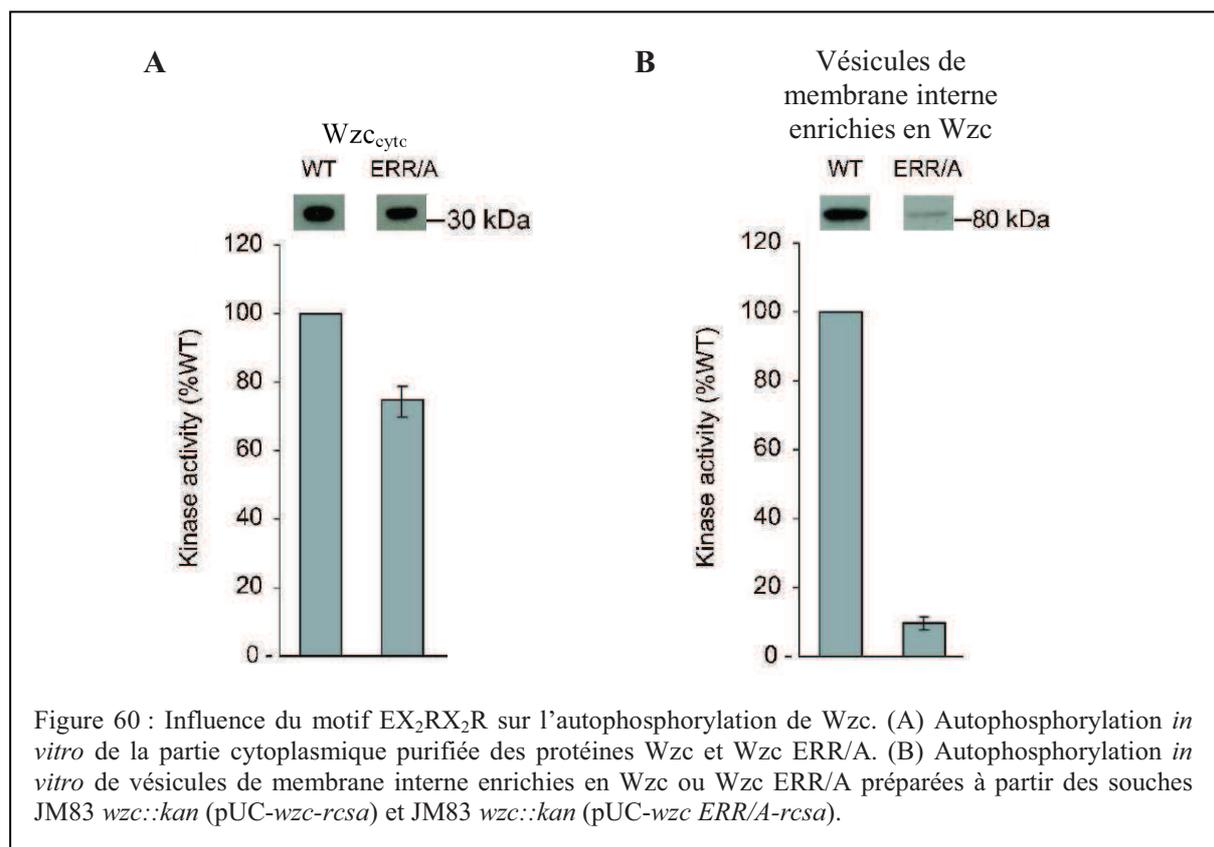
### III.3 Pertinence physiologique de l'octamère

L'octamère est principalement maintenu grâce à trois zones de contact : la première est constituée par l'interaction du tyrosine cluster d'une sous-unité avec la poche catalytique de la sous-unité adjacente, la seconde implique le motif E<sup>508</sup>X<sub>2</sub>RX<sub>2</sub>R<sup>514</sup> de l'hélice  $\alpha 2$  d'un monomère avec les résidus Glu<sup>618</sup> de l'hélice  $\alpha 7$  et Arg<sup>566</sup> de la boucle  $\beta 2$ - $\alpha 4$  du monomère voisin déjà mise en évidence dans la structure de A1<sub>Ct</sub>B2, et la troisième, moins importante, implique notamment les interactions entre les résidus Gln<sup>457</sup> de l'hélice  $\alpha A$  et Tyr<sup>467</sup> du brin  $\beta A$  d'une sous-unité avec respectivement les résidus Lys<sup>674</sup> et Gln<sup>685</sup> de l'hélice  $\alpha 10$  de la sous-unité adjacente (Fig. 59). La surface totale de ces zones de contact est évaluée à environ 2700 Å<sup>2</sup>. Cette valeur est représentative d'interactions biologiques (Lo Conte et al., 1999).

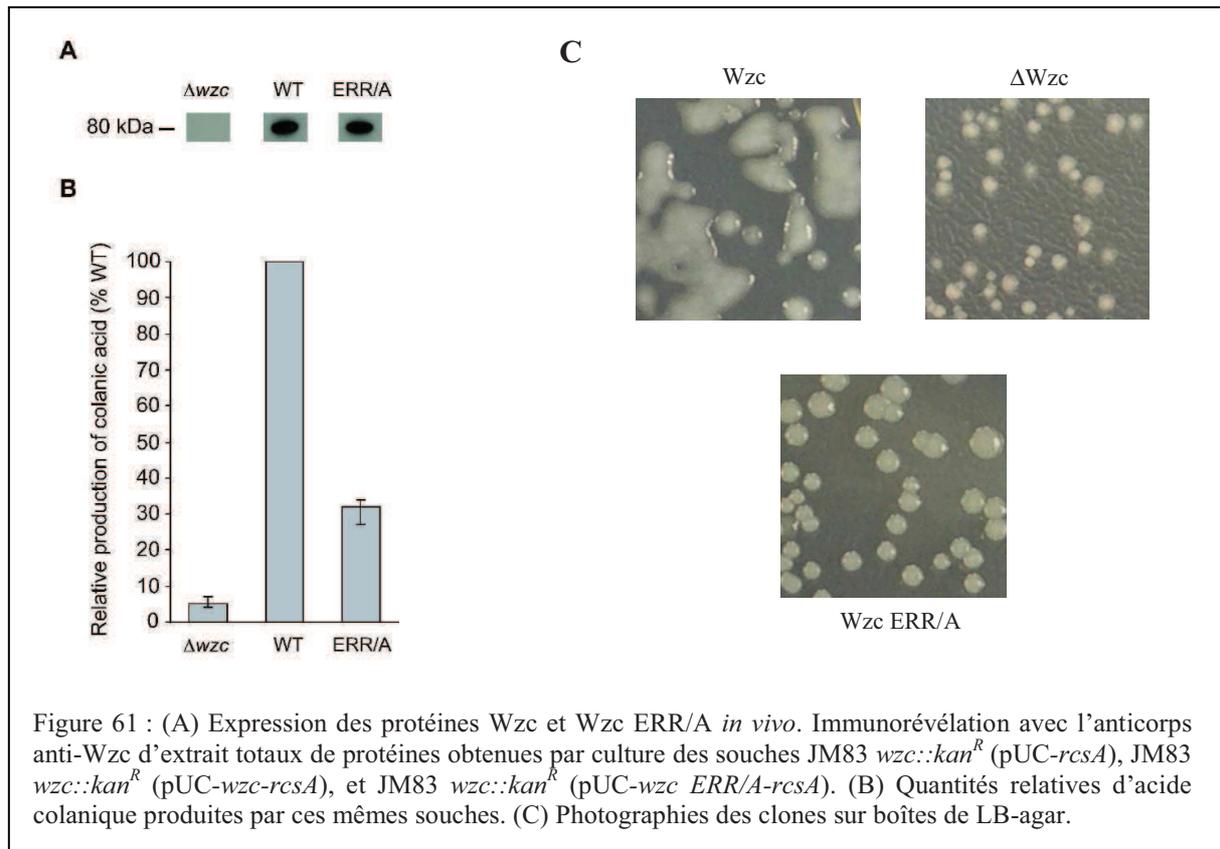


Nous avons voulu déterminer l'influence de l'octamérisation de Wzc sur sa capacité d'autophosphorylation. Pour cela, nous avons construit le mutant Wzc<sub>cyto</sub> ERR/A que nous avons purifié et testé en phosphorylation en présence de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et autoradiographie, nous avons constaté que la différence d'autophosphorylation entre le mutant et la protéine sauvage était assez faible, 25% seulement (Fig. 60 A). Nous avons donc recommencé l'expérience en nous rapprochant des conditions rencontrées *in vivo*, en n'utilisant non plus la partie cytoplasmique purifiée de la protéine mais

la protéine entière incluse dans des vésicules de membrane interne. Nous pouvons, dans ce cas, remarquer une différence significative entre l'autophosphorylation de Wzc et celle de Wzc ERR/A (Fig. 60 B). En effet, la phosphorylation de Wzc ERR/A ne représente que 9% de la phosphorylation de la protéine sauvage. Comme pour A1<sub>Ct</sub>B2, le motif EX<sub>2</sub>RX<sub>2</sub>R de Wzc est donc important pour l'interphosphorylation de la protéine. Ceci conforte l'existence de l'octamère *in vivo* et lui prédit un rôle physiologiquement important.



Afin de préciser le rôle fonctionnel de l'octamère, nous avons étudié l'importance du motif EX<sub>2</sub>RX<sub>2</sub>R dans la production d'acide colanique. Pour cela, nous avons purifié et dosé l'acide colanique produit par les souches JM83 *wzc::kan*<sup>R</sup> (pUC-*wzc-rcsA*) et JM83 *wzc::kan*<sup>R</sup> (pUC-*wzc ERR/A-rcsA*). Nous pouvons remarquer que la souche exprimant la protéine Wzc mutée au niveau du motif EX<sub>2</sub>RX<sub>2</sub>R synthétise environ trois fois moins d'acide colanique que la souche sauvage (Fig. 61). Ceci démontre que l'association de la protéine Wzc en octamère est importante pour la biosynthèse de l'acide colanique.



### III.4 Etude de la fonction du domaine RK de Wzc

La densité électronique correspondant à la région du domaine RK, constitué des résidus 473 à 496, n'est pas bien définie, ce qui conduit à penser que le domaine RK forme une boucle très flexible. L'alignement des séquences primaires des protéines Wzc et A1<sub>Ct</sub>B2 montre que le domaine RK de Wzc est situé exactement à l'intersection entre le domaine C-terminal de A1 et le domaine N-terminal de B2 (Fig 62).

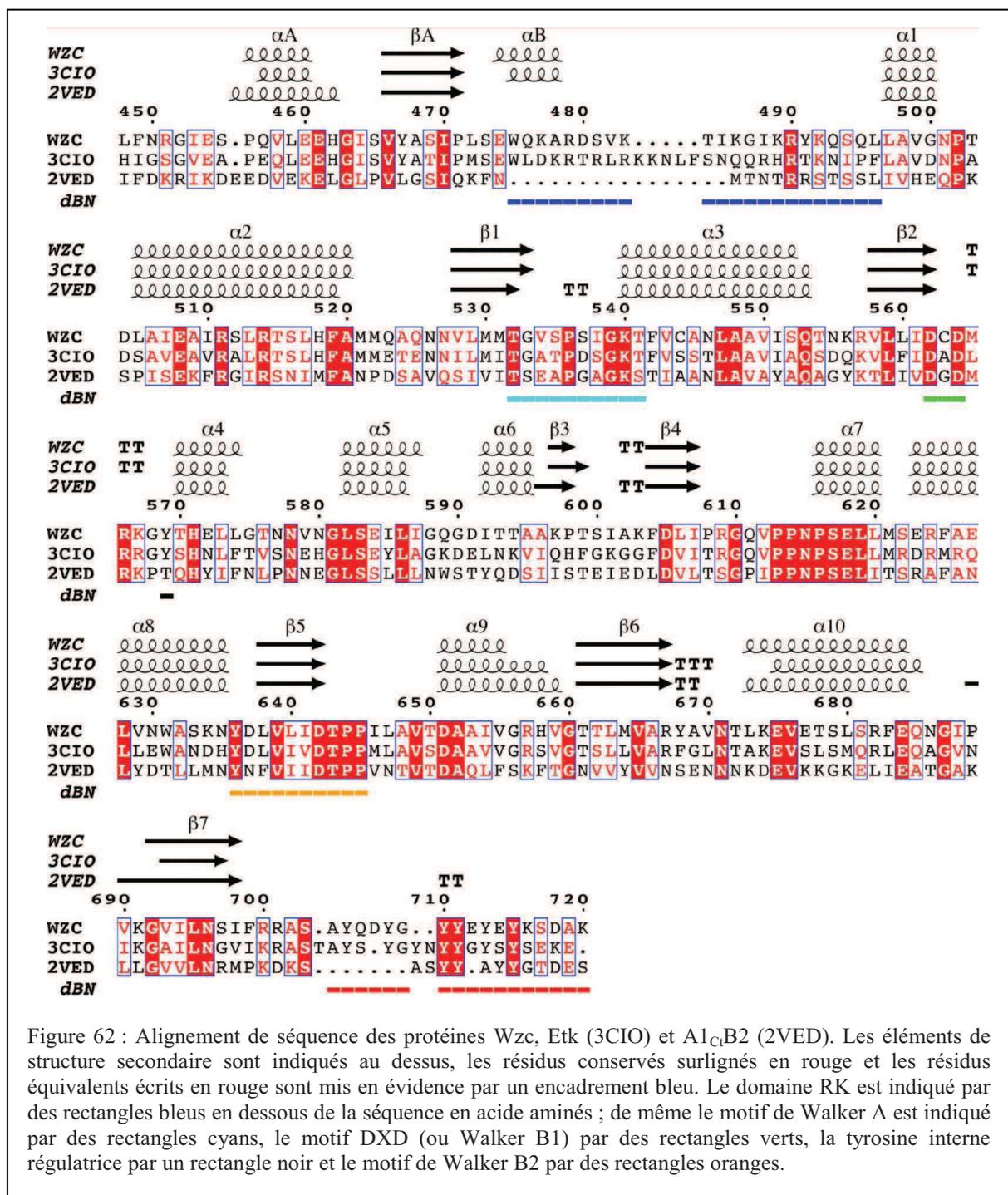
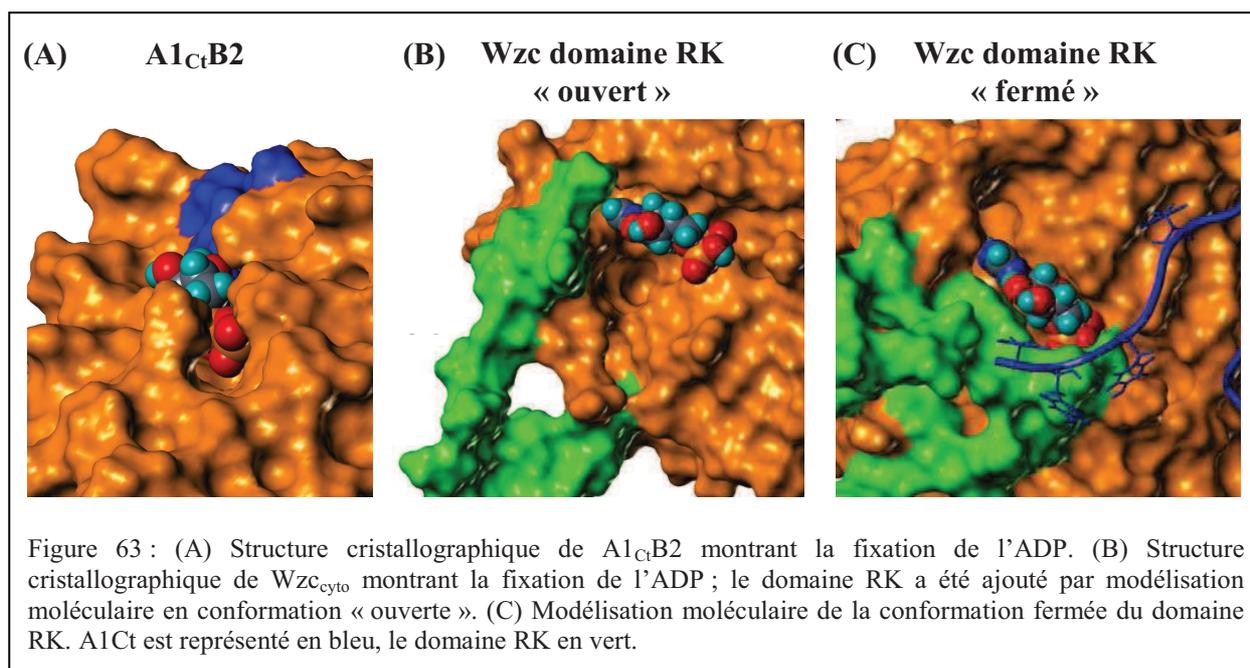


Figure 62 : Alignement de séquence des protéines Wzc, Etk (3CIO) et A1<sub>Ct</sub>B2 (2VED). Les éléments de structure secondaire sont indiqués au dessus, les résidus conservés surlignés en rouge et les résidus équivalents écrits en rouge sont mis en évidence par un encadrement bleu. Le domaine RK est indiqué par des rectangles bleus en dessous de la séquence en acide aminés ; de même le motif de Walker A est indiqué par des rectangles cyans, le motif DXD (ou Walker B1) par des rectangles verts, la tyrosine interne régulatrice par un rectangle noir et le motif de Walker B2 par des rectangles oranges.

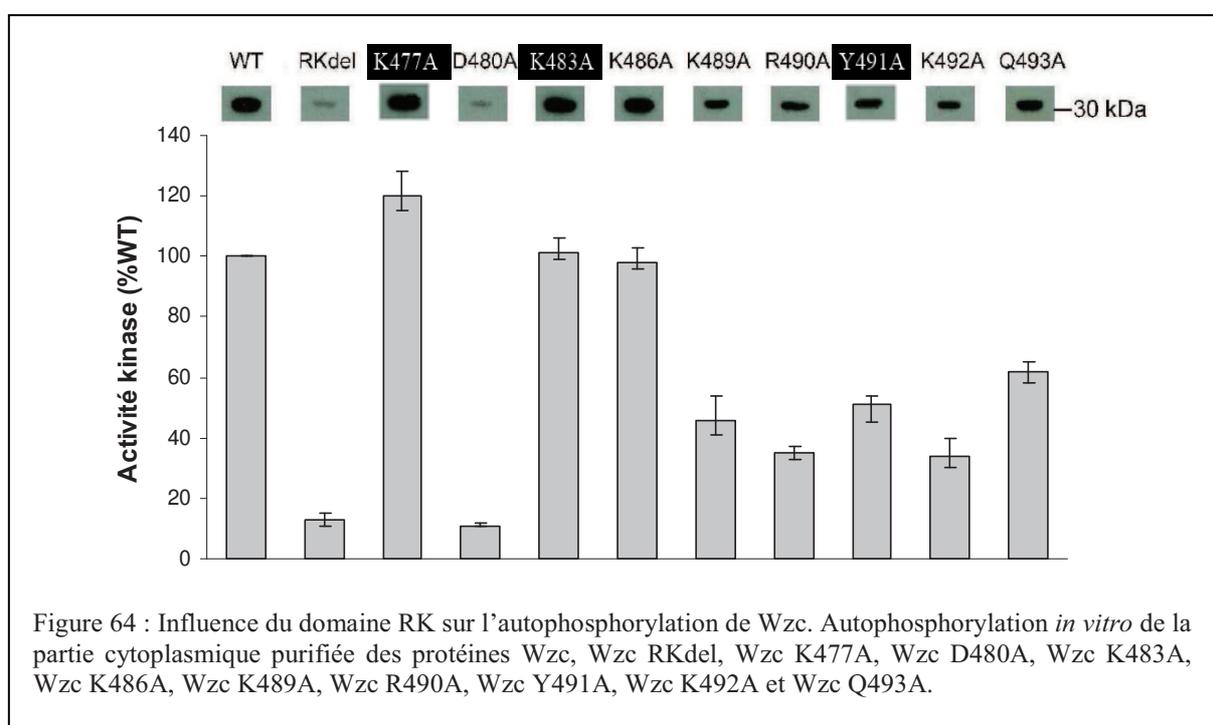
En comparant les poches catalytiques d'A1<sub>Ct</sub>B2 et Wzc, nous nous sommes aperçus que dans le cas d'A1<sub>Ct</sub>B2, la molécule d'ADP est très enfouie dans la structure et paraît extrêmement bien maintenue, alors que dans le cas de Wzc avec le domaine RK en position « ouverte », la structure est beaucoup plus « aérée » autour de la molécule d'ADP qui paraît donc beaucoup plus libre (Fig. 63 A et B). A partir de cette observation et compte tenu de l'emplacement du domaine RK dans la séquence de Wzc, nous avons émis l'hypothèse que, de la même manière que A1<sub>Ct</sub> active B2 en complétant la poche de fixation de l'ATP, la

boucle flexible constituant le domaine RK pourrait être rabattue contre le corps de la protéine pour stabiliser l'ATP dans la poche catalytique et ainsi réguler l'activité kinase de Wzc. Nous avons alors placé par modélisation moléculaire le domaine RK dans une position « fermée », le ramenant vers la molécule d'ADP de façon à obtenir une configuration dans laquelle l'ADP semble aussi bien maintenu que dans le cas d'A1<sub>Ct</sub>B2 (Fig. 63 C). Ce changement de conformation est stable lors d'une dynamique moléculaire réalisée pendant 10 ns.



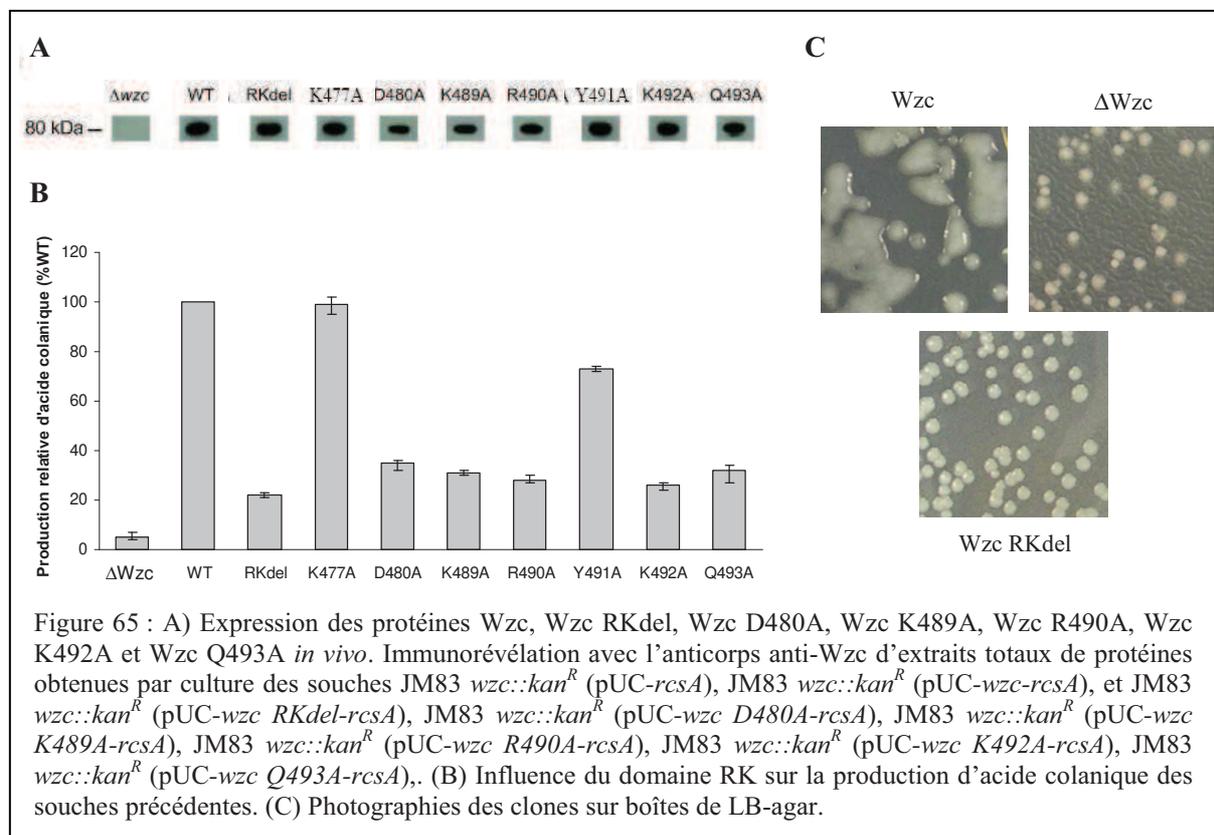
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons produit, dans un premier temps, la protéine Wzc<sub>cyto</sub> RKdel correspondant à la protéine Wzc<sub>cyto</sub> dépourvue de son domaine RK. Nous avons purifié cette protéine à homogénéité et avons testé sa capacité à s'autophosphoryler. L'analyse de ce test par SDS-PAGE et autoradiographie a révélé que le domaine RK est effectivement impliqué dans l'activité kinase de la protéine. En effet, une diminution de 87% de l'activité kinase de Wzc est observée avec la délétion de ce domaine (Fig. 64). Nous avons, dans un second temps, réalisé des mutations ponctuelles de différents acides aminés composant le domaine RK (Lys<sup>477</sup>, Asp<sup>480</sup>, Lys<sup>483</sup>, Lys<sup>486</sup>, Arg<sup>490</sup>, Tyr<sup>491</sup>, Lys<sup>492</sup>, et Gln<sup>493</sup>) en alanine pour déterminer plus précisément quels résidus sont impliqués dans la fixation de l'ATP. Chacun de ces mutants a été surproduit, purifié à homogénéité et sa capacité d'autophosphorylation a été testée (Fig. 64). Cette analyse montre que le résidu Asp<sup>480</sup> a un effet crucial sur l'activité kinase de Wzc. En effet, sa mutation provoque une perte d'activité kinase d'environ 90%. En examinant la structure de Wzc, nous pouvons observer que ce résidu Asp<sup>480</sup> interagit avec les groupements hydroxyles du ribose de la molécule d'ADP et

participe ainsi à sa fixation (Fig. 56 B). A l'inverse, la mutation des résidus Lys<sup>477</sup>, Lys<sup>483</sup> et Lys<sup>486</sup> n'a aucun effet sur l'activité autokinase de Wzc. Lors de la mutation des résidus Lys<sup>489</sup>, Arg<sup>490</sup>, Tyr<sup>491</sup>, Lys<sup>492</sup>, et Gln<sup>493</sup> nous obtenons une situation intermédiaire dans laquelle l'activité kinase de ces mutants est entre 1,5 fois et 3 fois plus faible que celle de la protéine sauvage. La structure obtenue ne fournissant pas d'information sur la position de ces acides aminés et par conséquent sur leur rôle précis, nous ne pouvons que proposer que ces résidus soient impliqués dans la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP ou encore qu'ils interagissent avec le tyrosine cluster de la sous-unité voisine pour le stabiliser dans une position idéale à sa phosphorylation.



Nous avons également étudié l'influence du domaine RK dans la production d'acide colanique de la souche JM83 *wzc::kan<sup>R</sup>* complétée par différents vecteurs exprimant les versions mutées de la protéine Wzc (Wzc RKdel, Wzc K477A, Wzc D480A, Wzc K489A, Wzc R490A, Wzc Y491A, Wzc K492A et Wzc Q493A). De façon surprenante, alors que les résidus Lys<sup>489</sup>, Arg<sup>490</sup>, Lys<sup>492</sup>, et Gln<sup>493</sup> n'avaient qu'une influence moyenne sur l'activité kinase de la protéine, ils ont, cette fois, un effet comparable à celui du résidu Asp<sup>480</sup>, à savoir une réduction d'environ 70% de la production d'acide colanique (Fig. 65). La mutation Y491A ne diminue que très peu la quantité d'acide colanique produit (27%) alors qu'elle avait une influence sur la phosphorylation comparable à celle des résidus

précédents. Le mutant Wzc RKdel est celui qui conduit à la plus faible production d'acide colanique, soit 22% de la quantité d'acide colanique produit par la souche sauvage. A l'inverse, le mutant K477A n'a pas d'influence sur la production d'acide colanique de la même manière qu'il n'avait pas d'influence sur l'activité kinase de Wzc.



L'ensemble de ces observations suggère que le domaine RK puisse agir comme un domaine régulateur de la protéine Wzc, notamment au niveau de son activité kinase par l'intermédiaire de l'interaction du résidu Asp<sup>480</sup> avec le ribose de la molécule d'ATP, mais également par l'intermédiaire des résidus Lys<sup>489</sup>, Arg<sup>490</sup>, Tyr<sup>491</sup>, Lys<sup>492</sup>, et Gln<sup>493</sup> qui affectent plus faiblement l'activité kinase de Wzc mais semblent impliqués dans d'autres interactions importantes pour permettre la production d'acide colanique. Le domaine RK pourrait, par exemple, servir de site de reconnaissance aux substrats de phosphorylation ou de site d'ancrage pour les protéines partenaires du complexe d'assemblage et d'export des polysaccharides extracellulaires.

**DISCUSSION**

**&**

**CONCLUSION**

Dans la première partie de ce travail, nous avons caractérisé le rôle physiologique de la phosphorylation sur la tyrosine de la protéine Ugd, une UDP-glucose déshydrogénase, par les BY-kinases Wzc et Etk d'*E. coli*. Nous avons, tout d'abord, démontré que la Tyr<sup>71</sup> de la protéine Ugd est un site commun de phosphorylation par les BY-kinases Wzc et Etk aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cette observation constitue le premier exemple d'une protéine bactérienne phosphorylée au niveau de la tyrosine par deux BY-kinases différentes. Nous avons également montré que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup> augmente son activité déshydrogénase *in vitro*. Pour comprendre ce mécanisme d'activation par phosphorylation, nous avons réalisé deux modèles tridimensionnels de la protéine Ugd d'*E. coli* K12 à partir des structures existantes de l'UDP-glucose déshydrogénase de *Streptococcus pyogenes* (1DLI) et de la GDP-mannose déshydrogénase de *P. aeruginosa* (1MV8). Ces deux modèles conduisent à deux hypothèses différentes. La modélisation faite à partir de la structure de la GDP-mannose déshydrogénase de *P. aeruginosa* (1MV8) nous permet de supposer que la phosphorylation de la Tyr<sup>71</sup> influencerait l'accessibilité du site catalytique. En effet, la tyrosine non phosphorylée ferait une sorte de clapet bloquant l'accès du NAD<sup>+</sup> au site actif. La phosphorylation de cette tyrosine pourrait induire une rotation de sa chaîne latérale et rendre ainsi le site catalytique accessible au substrat. Ce mécanisme a déjà été proposé pour la protéine Ugd de *B. subtilis* (Mijakovic et al., 2004). Le modèle obtenu à partir de la structure de l'UDP-glucose déshydrogénase de *S. pyogenes* (1DLI) ne présente pas ce blocage du site actif. En revanche, il montre que la phosphorylation de la Tyr<sup>71</sup> influencerait plutôt l'interaction de la protéine avec le NAD<sup>+</sup>, pouvant ainsi modifier son potentiel d'oxydo-réduction de sorte à favoriser la réaction. Il faudrait maintenant vérifier ces deux hypothèses.

Nous avons ensuite établi que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup>, spécifiquement réalisée par la BY-kinase Wzc, augmente la quantité d'acide colanique produit par *E. coli* K12. En revanche, contrairement à ce qui avait été observé chez *S. pneumoniae* (Ventura et al., 2006), l'activation d'Ugd par phosphorylation, bien qu'augmentant la quantité d'UDP-acide glucuronique disponible dans la cellule, ne modifie pas la taille de l'acide colanique produit. Il peut cependant être envisagé que, chez *E. coli*, la phosphorylation de la protéine Ugd influence la taille d'autres polysaccharides. En effet, l'UDP-acide glucuronique est également un précurseur de la capsule de groupe 4 (G4C) par exemple chez d'autres souches d'*E. coli* (Fig. 66).

D'autre part, nous avons démontré que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup>, spécifiquement accomplie par la BY-kinase Etk, favorise la résistance de la bactérie à la polymyxine. Cette observation soulève premièrement la question de la régulation de l'expression d'*etk* chez *E. coli* K12. En effet, le gène *etk*, situé dans l'opéron *ymc*, a été décrit comme n'étant pas exprimé chez *E. coli* K12 dans des conditions standards de culture, probablement en raison de la présence d'une séquence d'insertion IS1 au niveau de sa région promotrice (Peleg et al., 2005). Or, nos résultats montrent que, dans des conditions de culture particulières, la protéine Etk est exprimée et est essentielle pour la résistance d'*E. coli* K12 à la polymyxine. De la même manière, une autre étude indique qu'une souche *E. coli* K12 inactivée sur le gène *etk* présente une réponse aux chocs thermiques altérée (Klein et al., 2003). Ceci indique qu'il existe un mécanisme particulier permettant d'initier l'expression d'*etk* malgré la séquence d'insertion. Dans les conditions de culture permettant la résistance à la polymyxine, les systèmes à deux composants, PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB, sont exprimés et connus pour induire l'expression des gènes responsables de la synthèse du L-Ara-4N (comme l'opéron *arn* et le gène *ugd*). La protéine Etk étant exprimée dans ces conditions, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces deux systèmes à deux composants contrôlent également l'expression de l'opéron *ymc*. Il serait intéressant de déterminer le mécanisme précis de la régulation de l'expression de cet opéron.

Le fait que l'expression de la BY-kinase Wzc ne permette pas de rétablir la résistance à la polymyxine d'une bactérie inactivée sur le gène *etk* indique également qu'au-delà de leur homologie et de leur capacité commune à activer Ugd par phosphorylation, les BY-kinases Wzc et Etk possèdent chacune des particularités leur permettant d'assurer des rôles distincts dans la régulation de la physiologie d'*E. coli*. Wzc et Etk peuvent se distinguer par leur aptitude à interagir spécifiquement avec des partenaires propres à la production d'acide colanique ou à la résistance à la polymyxine, par leur capacité à phosphoryler spécifiquement d'autres substrats impliqués dans l'un ou l'autre de ces deux processus, ou encore par leur faculté à détecter et à répondre à des signaux extérieurs différents conduisant à l'expression particulière de l'un des deux phénotypes. Par exemple, il a récemment été démontré chez *K. pneumoniae* que Wzc phosphorylait une seconde protéine impliquée dans la biosynthèse des polysaccharides capsulaires, la protéine WcaJ (Lin et al., 2009). Il serait intéressant de tester si cette protéine est aussi phosphorylée par Etk, ou s'il s'agit d'un substrat spécifique de Wzc.

Pour illustrer la première partie de ce travail, nous proposons un schéma récapitulatif montrant que la phosphorylation d'Ugd est au carrefour de deux voies métaboliques distinctes (Fig. 66). En effet, nous avons établi que la phosphorylation d'Ugd sur la Tyr<sup>71</sup>, spécifiquement réalisée par la BY-kinase Wzc, participe à la régulation de la quantité d'acide colanique produit par *E. coli*, tandis que la phosphorylation d'Ugd, également sur la Tyr<sup>71</sup>, mais spécifiquement accomplie par la BY-kinase Etk, influence la capacité de la bactérie à résister à la polymyxine. Ce schéma fait également apparaître que la BY-kinase Wzc intervient dans deux étapes de la biosynthèse de l'acide colanique. Une étape précoce qui consiste en l'activation de la protéine Ugd par phosphorylation dans le but de favoriser la synthèse de la sous-unité d'acide colanique, puis, une seconde étape, plus tardive, dans laquelle l'état de phosphorylation de Wzc elle-même semble intervenir directement pour réguler l'assemblage et l'export du polymère. Cette analyse peut être étendue à d'autres bactéries, comme par exemple *Streptococcus thermophilus*, chez qui la protéine EpsE, une UDP-glycosyl-transférase impliquée dans la production de son exopolysaccharide, a été décrite comme phosphorylée par la BY-kinase EpsD (Minic et al., 2007). L'UDP-acide glucuronique synthétisé par Ugd étant également impliqué dans la biosynthèse de certaines capsules de groupe IV produites par des souches pathogènes d'*E. coli* (Goldhar et al., 1980) et nécessitant la présence d'Etk pour leur export (Ilan et al., 1999; Peleg et al., 2005), nous avons également fait figurer sur ce schéma une régulation possible de la production de ces capsules par phosphorylation de la protéine Ugd. De façon similaire, la biosynthèse du M<sub>LPS</sub> d'*E. coli* K12, une isoforme du LPS à laquelle sont fixées des sous-unités d'acide colanique (Meredith et al., 2007) pourrait être influencée par la phosphorylation d'Ugd.

Ce travail contribue à la caractérisation du rôle biologique de la phosphorylation des protéines bactériennes sur la tyrosine et illustre le vaste rôle que peut jouer cette modification dans la régulation de la physiologie bactérienne. Les BY-kinases apparaissent désormais comme des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux antibiotiques. Le fait que les BY-kinases ne ressemblent pas aux tyrosine-kinases d'origine eucaryote en fait des cibles d'autant plus privilégiées. En effet, un antibiotique ciblant les BY-kinases devrait présenter des risques d'effets secondaires sur l'organisme-hôte très limités.

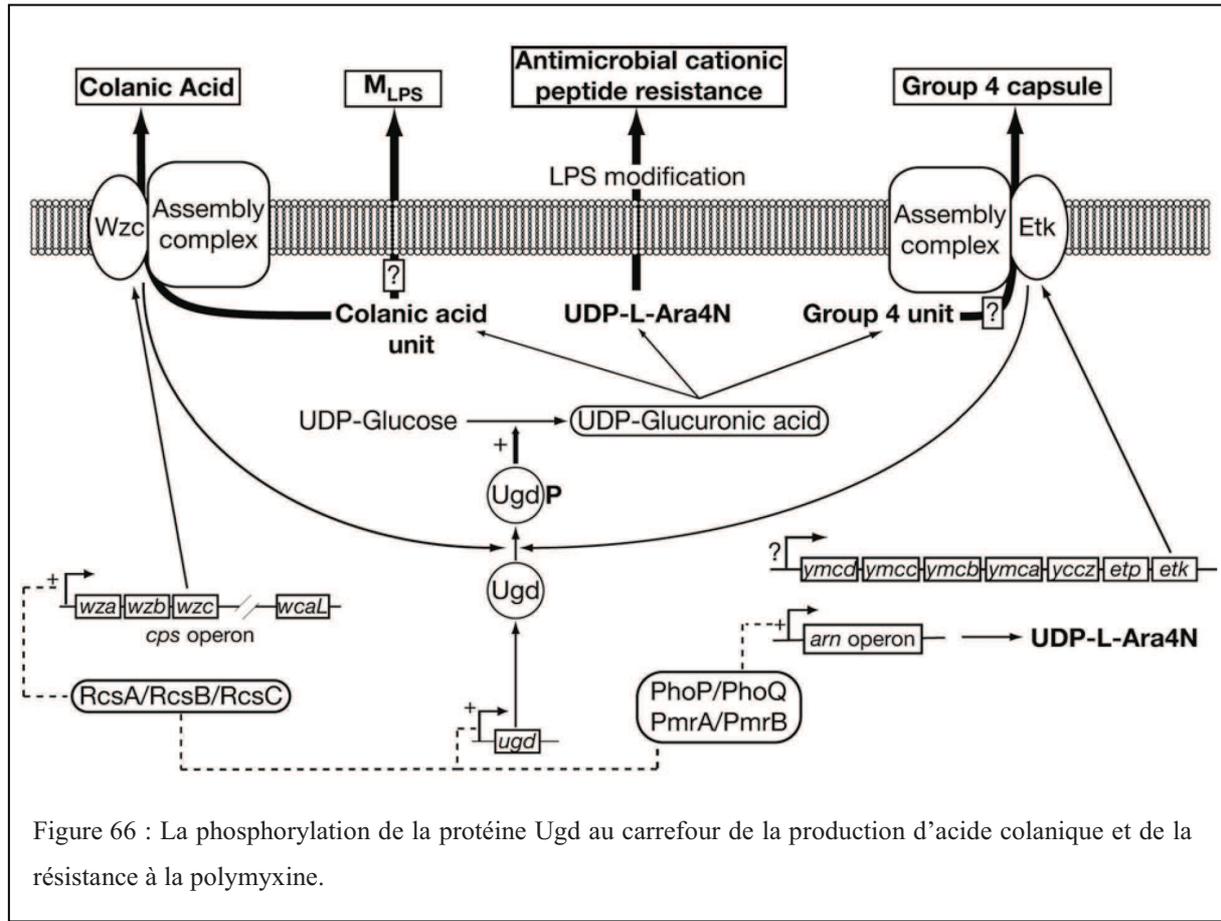


Figure 66 : La phosphorylation de la protéine Ugd au carrefour de la production d'acide colanique et de la résistance à la polymyxine.

A partir de là, la caractérisation structurale et fonctionnelle des BY-kinases est nécessaire pour l'élaboration de molécules inhibant spécifiquement leur activité. C'est ce à quoi nous nous sommes attachés dans la deuxième et la troisième partie de ce travail. En effet, les analyses des structures cristallographiques des domaines catalytiques des BY-kinases Wzc et A1<sub>Ct</sub>B2 nous ont permis d'améliorer les connaissances du mécanisme catalytique de ces enzymes.

En particulier, nous avons déterminé le mode d'activation de B2 par A1 en démontrant que la partie C-terminale de A1 complétait la poche de fixation de l'ATP et, plus précisément, que la Phe<sup>221</sup> de A1<sub>Ct</sub> était impliquée dans la stabilisation de l'ATP par une interaction hydrophobe de type  $\pi$ -stacking. Cette interaction est d'ailleurs retrouvée dans la structure de Wzc par l'intermédiaire du résidu Phe<sup>542</sup>. Nous avons également approfondi l'étude du mécanisme d'autophosphorylation intermoléculaire de B2 par mutagenèse dirigée et démontré que toutes les tyrosines du tyrosine cluster sont phosphorylables de manière équivalente, sans ordre préférentiel et indépendamment de la phosphorylation des autres tyrosines. En ce qui

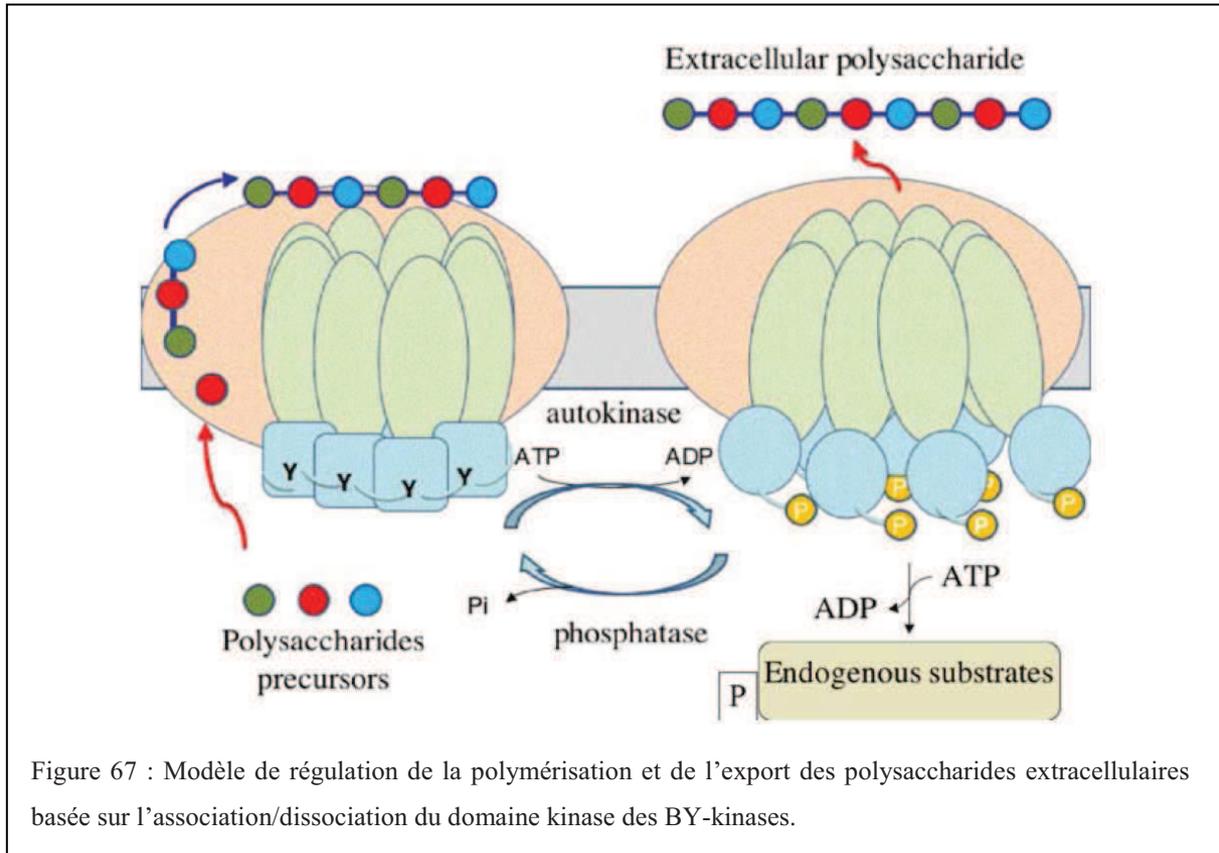
concerne l'activation de Wzc, nos travaux montrent que l'autophosphorylation intermoléculaire des tyrosines de son tyrosine cluster ne dépend pas d'une première étape d'activation de la protéine par phosphorylation d'une tyrosine interne selon un mécanisme intramoléculaire comme proposé précédemment (Grangeasse et al., 2002). En revanche, la structure indique que cette tyrosine, bien que non phosphorylable, joue effectivement un rôle régulateur dans l'activité kinase de la protéine en établissant une liaison hydrogène avec le groupement phosphate  $\alpha$  de l'ATP. Elle participe ainsi à la stabilisation de l'ATP dans la poche catalytique et, par conséquent, influence l'activité kinase de la protéine et la phosphorylation intermoléculaire de son tyrosine cluster. Cette analyse s'oppose au modèle d'activation d'Etk par rotation de la chaîne latérale de la Tyr<sup>574</sup> phosphorylée vers le résidu Arg<sup>614</sup> proposé par Lee et al. (2008). En effet, pour étayer leur modèle, ces auteurs avaient démontré que la mutation du résidu Arg<sup>614</sup> en alanine diminuait considérablement l'activité kinase d'Etk. Or, en analysant précisément les deux structures, nous pouvons remarquer que l'Arg<sup>614</sup> (ou Arg<sup>609</sup> pour Wzc) établit une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la liaison peptidique entre les résidus Gly<sup>573</sup> et Tyr<sup>574</sup> (ou Gly<sup>568</sup> et Tyr<sup>569</sup> pour Wzc). Cette interaction est très probablement importante pour le positionnement de la Tyr<sup>574</sup> (Tyr<sup>569</sup> pour Wzc) et son interaction subséquente avec le phosphate  $\alpha$  de l'ATP, expliquant ainsi la diminution d'activité du mutant Etk R614A indépendamment de la phosphorylation de la Tyr<sup>574</sup>. Nous proposons donc un mécanisme commun d'autophosphorylation des BY-kinases des firmicutes et des protéobactéries, exclusivement au niveau de leur tyrosine cluster et en une unique étape de phosphorylation intermoléculaire.

Enfin, nous avons étudié l'importance du domaine RK, spécifique des BY-kinases des protéobactéries, dans l'autophosphorylation de Wzc et la régulation de la biosynthèse de l'acide colanique. En particulier, nous avons démontré que le résidu Asp<sup>480</sup> participe à la stabilisation de la molécule d'ATP par interaction avec les groupements hydroxyles de son ribose et joue ainsi un rôle crucial dans l'activité kinase de la protéine. A partir de là, nous pouvons proposer que les BY-kinases des protéobactéries et des firmicutes sont activées de façon comparable, soit par le domaine RK, soit par le peptide cytoplasmique de la protéine membranaire activatrice, qui complètent la poche de fixation de l'ATP. D'autre part, l'ensemble du domaine RK de Wzc semble jouer un rôle dans la régulation de la production d'acide colanique. De part son exposition à la périphérie de l'octamère, nous pouvons suggérer que ce domaine interagisse avec d'autres protéines du complexe d'assemblage des polysaccharides extracellulaires ou encore qu'il puisse être impliqué dans l'interaction avec

les substrats des BY-kinases. Afin de préciser la fonction du domaine RK, il serait intéressant d'étudier son rôle dans la phosphorylation des substrats tels qu'Ugd par exemple. Chez les BY-kinases des firmicutes le domaine RK n'est pas retrouvé. Cependant, nous pouvons suggérer que l'absence de ce domaine est compensée par l'indépendance des domaines activateur et kinase de ces enzymes, ce qui offre au domaine kinase la possibilité d'interagir avec différentes protéines activatrices.

Nous avons également mis en évidence que, sous leur forme non phosphorylée, A1<sub>Ct</sub>B2 et Wzc adoptent une conformation octamérique en forme d'anneau extrêmement comparable. Dans cette configuration, nous pouvons voir le tyrosine cluster d'une sous-unité plonger dans la poche catalytique de la sous-unité voisine. L'autophosphorylation intermoléculaire des BY-kinases sur leur tyrosine cluster s'opère donc selon un mécanisme commun aux protéobactéries et aux firmicutes basé sur l'octamérisation de la protéine. Nous avons également mis en évidence l'implication du motif EX<sub>2</sub>RX<sub>2</sub>R, dans l'association des deux BY-kinases en octamère. Au delà du rôle crucial que joue ce motif dans l'autophosphorylation des protéines Wzc et A1<sub>Ct</sub>B2, nous avons démontré, dans le cas de Wzc, qu'il était également nécessaire à la biosynthèse de l'acide colanique. Ce motif étant très conservé au sein de la famille des BY-kinases, nous pouvons supposer que toutes les BY-kinases adoptent cette conformation octamérique et que, de façon générale, l'octamérisation participe à la régulation de la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires. La forme phosphorylée des protéines A1<sub>Ct</sub>B2 et Etk cristallisant sous forme de monomère nous conduit à supposer que le mécanisme d'autophosphorylation intermoléculaire du tyrosine cluster des BY-kinases pourrait réguler l'association/dissociation de l'octamère. Il a auparavant été suggéré qu'un processus cyclique de phosphorylation/déphosphorylation des BY-kinases par des phosphotyrosine phosphatases régulerait la production des polysaccharides extracellulaires (Obadia et al., 2007). Or, la phosphorylation/déphosphorylation étant conjuguée à une association/dissociation des domaines cytoplasmiques des BY-kinases, nous pouvons également proposer qu'au-delà d'une implication *per se* de l'octamère dans la production des polysaccharides extracellulaires, son association/dissociation cyclique serait également un évènement important de la régulation de cette voie de biosynthèse. Ceci est d'ailleurs soutenu par le fait que les mutations inhibant l'activité kinase de Wzc, bloquant a priori la protéine dans sa forme octamérique (Obadia et al., 2007) conduisent de la même manière que la mutation du motif EX<sub>2</sub>RX<sub>2</sub>R bloquant la protéine sous sa forme dissociée, à une nette diminution de la production d'acide colanique.

A partir de ces nouvelles données, nous pouvons reconsidérer le rôle des BY-kinases dans la machinerie d'assemblage des polysaccharides extracellulaires de type Wzy-dépendant et proposer un nouveau modèle permettant d'expliquer le rôle régulateur des BY-kinases dans la production des polysaccharides extracellulaires et, plus particulièrement, dans leur export (Fig. 67). En effet, le fait que Wzc puisse s'assembler en octamère de façon à former un anneau permet d'envisager la possibilité que Wzc établisse un pore au niveau de la membrane interne. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la protéine Wza, présente dans la membrane externe et également impliquée dans l'export de l'acide colanique, a récemment été décrite comme formant un octamère en forme d'anneau capable d'interagir avec Wzc. Le complexe Wza-Wzc pourrait ainsi constituer un canal traversant les membranes interne et externe de la bactérie pour permettre le transport de l'acide colanique du cytoplasme à l'extérieur de la cellule. De là, nous pouvons également imaginer que l'association/dissociation des domaines cytoplasmiques de Wzc pourrait contrôler l'ouverture et la fermeture du pore au niveau des domaines transmembranaire et périplasmique. De la même manière, nous pouvons supposer que l'association/dissociation des domaines cytoplasmiques de Wzc pourrait induire des contraintes au niveau des domaines extracellulaires, affectant leur interaction avec les protéines du complexe d'assemblage de l'acide colanique (polymérase, flippase, transférase) et régulant de la sorte la polymérisation et l'export de l'acide colanique. Ainsi, la phosphorylation/déphosphorylation cyclique de Wzc conjuguée à son association/dissociation cyclique en octamère ajusterait continuellement la polymérisation et l'export de l'acide colanique. Etant donné la forte conservation des BY-kinases, ce modèle pourrait être étendu de façon générale à la régulation de la biosynthèse de tous les polysaccharides extracellulaires produits par la voie Wzy-dépendante. Nous pouvons ajouter que, dans ce modèle, la phosphorylation des substrats des BY-kinases aurait lieu dans la conformation ouverte de l'octamère par la forme phosphorylée de la BY-kinase.



Il faudrait maintenant confirmer ce nouveau modèle. Pour cela, il faudrait poursuivre la caractérisation structurale des BY-kinases, et notamment obtenir la structure de la protéine entière afin de déterminer le rôle de la boucle périplasmique des BY-kinases ainsi que celui de la petite partie N-terminale cytoplasmique. Ce travail pourrait également permettre de mettre en évidence si, par analogie avec les tyrosine-kinases récepteurs des eucaryotes, leurs domaines extracellulaires peuvent capter des signaux extérieurs permettant d'induire l'activation du domaine catalytique. Il serait également intéressant d'obtenir des structures cristallographiques de BY-kinases complexées à leurs substrats ou à leurs partenaires du complexe d'assemblage des polysaccharides extracellulaires comme, par exemple, Wzc-Ugd, Etk-Ugd, Wzc-flippase, Wzc-polymérase, afin de déterminer avec précision les zones d'interaction entre ces différentes protéines et vérifier si le domaine RK est bien impliqué dans ces interactions.

# **PUBLICATIONS**

### **Publications relatives à ce travail :**

**Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*.**

Olivares-Illana V, Meyer P, Bechet E, Gueguen-Chaignon V, Soulat D, Lazereg-Riquier S, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone AJ, Laprevote O, Morera S, Grangeasse C, Nessler S. PLoS Biol. 2008 Jun 10;6(6):e143.

**Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance.**

Bechet E\*, Lacour S\*, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C. PLoS One. 2008 Aug 25;3(8):e3053.

\*co-premier auteur

**Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export.**

Bechet E\*, Gruszczuk J\*, Terreux R, Gueguen-Chaignon V, Vigouroux A, Obadia B, Cozzone AJ, Nessler S, Grangeasse C.

\*co-premier auteur

Accepté dans Molecular Microbiology (doi : 10.1111/j.1365-2958.2010.07291.x)

### **Autres publications :**

**Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature.**

Jadeau F, Bechet E, Cozzone AJ, Deleage G, Grangeasse C, Combet C. Bioinformatics. 2008 Nov 1;24(21):2427-30.

**Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes.**

Bechet E, Guiral S, Torres S, Mijakovic I, Cozzone A.J, Grangeasse C. Amino Acids. 2009 Sep;37(3):499-507.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., and Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628.
- Alber, T. (2009). Signaling mechanisms of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* 19, 650-657.
- Allison, D.G., and Matthews, M.J. (1992). Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Bacteriol* 73, 484-488.
- Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A., and Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50<sup>csk</sup> protein- tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1048-1052.
- Andrianopoulos, K., Wang, L., and Reeves, P.R. (1998). Identification of the fucose synthetase gene in the colanic acid gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 180, 998-1001.
- Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000). The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 8, 238-244.
- Bach, H., Wong, D., and Av-Gay, Y. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA. *Biochem J* 420, 155-160.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., and Ielpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 145-152.
- Becker, A., and Puhler, A. (1998). Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J Bacteriol* 180, 395-399.
- Beier, D., and Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9, 143-152.
- Bender, M.H., Cartee, R.T., and Yother, J. (2003). Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 185, 6057-6066.
- Bender, M.H., and Yother, J. (2001). CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 276, 17.
- Bengoechea, J.A., Pinta, E., Salminen, T., Oertelt, C., Holst, O., Radziejewska-Lebrecht, J., Piotrowska-Seget, Z., Venho, R., and Skurnik, M. (2002). Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O-antigen polymerase) of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J Bacteriol* 184, 4277-4287.
- Bergmaier, D., Lacroix, C., Guadalupe Macedo, M., and Champagne, C.P. (2001). New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 401-406.
- Berkowitz, B.A., Bevins, C.L., and Zasloff, M.A. (1990). Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. *Biochem Pharmacol* 39, 625-629.

- Bischoff, D.S., and Ordal, G.W. (1991). Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheB, a homolog of *Escherichia coli* CheY, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *J Biol Chem* 266, 12301-12305.
- 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.
- Bourret, R.B., Hess, J.F., Borkovich, K.A., Pakula, A.A., and Simon, M.I. (1989). Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *J Biol Chem* 264, 7085-7088.
- Breazeale, S.D., Ribeiro, A.A., McClarren, A.L., and Raetz, C.R. (2005). A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *J Biol Chem* 280, 14154-14167.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3, 238-250.
- Bugert, P., and Geider, K. (1997). Characterization of the *amsI* gene product as a low molecular weight acid phosphatase controlling exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *FEBS Lett* 400, 252-256.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and short, J.M. (1987). a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376.
- 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.
- Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompert, C.M., Alberti, S., and Bengoechea, J.A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 72, 7107-7114.
- Chen, J., Lee, S.M., and Mao, Y. (2004). Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress. *Int J Food Microbiol* 93, 281-286.
- Collins, R.F., Beis, K., Clarke, B.R., Ford, R.C., Hulley, M., Naismith, J.H., and Whitfield, C. (2006). Periplasmic protein-protein contacts in the inner membrane protein Wzc form a tetrameric complex required for the assembly of *Escherichia coli* group 1 capsules. *J Biol Chem* 281, 2144-2150.
- Combet, C., Jambon, M., Deleage, G., and Geourjon, C. (2002). Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* 18, 213-214.
- Cortay, J.C., Duclos, B., and Cozzone, A.J. (1986). Phosphorylation of an *Escherichia coli* protein at tyrosine. *J Mol Biol* 187, 305-308.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., and Cheng, K.J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 35, 299-324.
- Cozzone, A.J. (1997). Diversity and specificity of protein-phosphorylating systems in bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* 42, 165-170.
- Cuthbertson, L., Mainprize, I.L., Naismith, J.H., and Whitfield, C. (2009). Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein

- families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 155-177.
- Dadssi, M., and Cozzone, A.J. (1990). Evidence of protein-tyrosine kinase activity in the bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Biol Chem* 265, 20996-20999.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 182, 3593-3596.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.
- Delgado, M.A., Mouslim, C., and Groisman, E.A. (2006). The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol Microbiol* 60, 39-50.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 939-1031.
- Deutscher, J., and Saier, M.H., Jr. (1983). ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6790-6794.
- Dische, Z. (1955). New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Methods Biochem Anal* 2, 313-358.
- Dische, Z., and Shettles, L.B. (1951). A new spectrophotometric test for the detection of methylpentose. *J Biol Chem* 192, 579-582.
- Doublet, P., Grangeasse, C., Obadia, B., Vaganay, E., and Cozzone, A.J. (2002). Structural organization of the protein-tyrosine autokinase Wzc within *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 277, 37339-37348.
- Doublet, P., Vincent, C., Grangeasse, C., Cozzone, A.J., and Duclos, B. (1999). On the binding of ATP to the autophosphorylating protein, Ptk, of the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *FEBS Lett* 445, 137-143.
- Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Riberty, M., and Cozzone, A.J. (1996). Autophosphorylation of a bacterial protein at tyrosine. *J Mol Biol* 259, 891-895.
- Dudman, W.F. (1964). Growth and Extracellular Polysaccharide Production by *Rhizobium meliloti* in Defined Medium. *J Bacteriol* 88, 640-645.
- Eguchi, Y., and Utsumi, R. (2005). A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem Sci* 30, 70-72.
- El-Kazzaz, W., Morita, T., Tagami, H., Inada, T., and Aiba, H. (2004). Metabolic block at early stages of the glycolytic pathway activates the Rcs phosphorelay system via increased synthesis of dTDP-glucose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 51, 1117-1128.
- Ernst, R.K., Hajjar, A.M., Tsai, J.H., Moskowitz, S.M., Wilson, C.B., and Miller, S.I. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *J Endotoxin Res* 9, 395-400.

- Farris, M., Grant, A., Richardson, T.B., and O'Connor, C.D. (1998). BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. *Mol Microbiol* 28, 265-279.
- Foster, R., Thorner, J., and Martin, G.S. (1989). Nucleotidylation, not phosphorylation, is the major source of the phosphotyrosine detected in enteric bacteria. *J Bacteriol* 171, 272-279.
- Fuhrmann, J., Schmidt, A., Spiess, S., Lehner, A., Turgay, K., Mechtler, K., Charpentier, E., and Clausen, T. (2009). McsB Is a Protein Arginine Kinase That Phosphorylates and Inhibits the Heat-Shock Regulator CtsR. *Science* 324, 1323-1327.
- Garnak, M., and Reeves, H.C. (1979). Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203, 1111-1112.
- Goldhar, J., Peri, R., Zilberberg, R., and Lahav, M. (1980). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated in the Tel-Aviv (Isreal) area. *Med Microbiol Immunol* 169, 53-61.
- Gottesman, S., Trisler, P., and Torres-Cabassa, A. (1985). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* 162, 1111-1119.
- Grangeasse, C., Cozzone, A.J., Deutscher, J., and Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci* 32, 86-94.
- Grangeasse, C., Doublet, P., and Cozzone, A.J. (2002). Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *J Biol Chem* 277, 7127-7135.
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vaganay, E., Vincent, C., Deleage, G., Duclos, B., and Cozzone, A.J. (1997). Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene* 204, 259-265.
- Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A.J., and Doublet, P. (2003). Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* 278, 39323-39329.
- Grangeasse, C., Vincent, C., Doublet, P., Cozzone, A.J., and Duclos, B. (1999). Biochemical properties of the protein tyrosine kinase of the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *IUBMB Life* 48, 339-343.
- Greenstein, A.E., Grundner, C., Echols, N., Gay, L.M., Lombana, T.N., Miecskowski, C.A., Pullen, K.E., Sung, P.Y., and Alber, T. (2005). Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9, 167-181.
- Groisman, E.A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183, 1835-1842.
- Groisman, E.A., Kayser, J., and Soncini, F.C. (1997). Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2+</sup> environments. *J Bacteriol* 179, 7040-7045.
- Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., and Teran, L.M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135, 1-11.

- 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.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177, 4121-4130.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hancock, R.E. (1999). Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57, 469-473.
- Hancock, R.E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 1, 156-164.
- Hanks, S.K., and Quinn, A.M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200, 38-62.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Hanlon, W.A., Inouye, M., and Inouye, S. (1997). Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 23, 459-471.
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., and Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69, 4474-4481.
- Hartmann, M.D., Bourenkov, G.P., Oberschall, A., Strizhov, N., and Bartunik, H.D. (2006). Mechanism of phosphoryl transfer catalyzed by shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* 364, 411-423.
- Hayashi, I., Oyama, T., and Morikawa, K. (2001). Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus. *Embo J* 20, 1819-1828.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Ilan, O., Bloch, Y., Frankel, G., Ullrich, H., Geider, K., and Rosenshine, I. (1999). Protein tyrosine kinases in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide. *Embo J* 18, 3241-3248.
- Iyer, A., Mody, K., and Jha, B. (2005). Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar Pollut Bull* 50, 340-343.
- Johnson, J.G., and Wilson, D.B. (1977). Role of a sugar-lipid intermediate in colanic acid synthesis by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 129, 225-236.
- Karlyshev, A.V., and Wren, B.W. (2001). Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using alcian blue dye. *J Clin Microbiol* 39, 279-284.
- Keiski, C.L., Harwich, M., Jain, S., Neculai, A.M., Yip, P., Robinson, H., Whitney, J.C., Riley, L., Burrows, L.L., Ohman, D.E., *et al.* (2010). AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure* 18, 265-273.

- Kelly-Wintenberg, K., South, S.L., and Montie, T.C. (1993). Tyrosine phosphate in a- and b-type flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 175, 2458-2461.
- Kennelly, P.J. (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol Lett* 206, 1-8.
- Kirstein, J., Dougan, D.A., Gerth, U., Hecker, M., and Turgay, K. (2007). The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *Embo J* 26, 2061-2070.
- Kirstein, J., and Turgay, K. (2005). A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9, 182-188.
- Klein, G., Dartigalongue, C., and Raina, S. (2003). Phosphorylation-mediated regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48, 269-285.
- Klumpp, S., and Krieglstein, J. (2002). Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* 269, 1067-1071.
- Kolot, M., Gorovits, R., Silberstein, N., Fichtman, B., and Yagil, E. (2008). Phosphorylation of the integrase protein of coliphage HK022. *Virology* 375, 383-390.
- Krebs, E.G., and Fisher, E.H. (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 20, 150-157.
- Lacour, S., Doublet, P., Obadia, B., Cozzone, A.J., and Grangeasse, C. (2006). A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Res Microbiol* 157, 637-641.
- Lee, D.C., and Jia, Z. (2009). Emerging structural insights into bacterial tyrosine kinases. *Trends Biochem Sci* 34, 351-357.
- Lee, D.C., Zheng, J., She, Y.M., and Jia, Z. (2008). Structure of *Escherichia coli* tyrosine kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *Embo J*.
- Lee, H., Hsu, F.F., Turk, J., and Groisman, E.A. (2004). The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 186, 4124-4133.
- Leroux, B., Yanofsky, M.F., Winans, S.C., Ward, J.E., Ziegler, S.F., and Nester, E.W. (1987). Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J* 6, 849-856.
- Lin, M.H., Hsu, T.L., Lin, S.Y., Pan, Y.J., Jan, J.T., Wang, J.T., Khoo, K.H., and Wu, S.H. (2009). Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol Cell Proteomics* 8, 2613-2623.
- Lo Conte, L., Chothia, C., and Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285, 2177-2198.
- Londesborough, J. (1986). Phosphorylation of proteins in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J Bacteriol* 165, 595-601.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., and Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64, 71-80.
- Lu, T., Tan, H., Lee, D., Chen, G., and Jia, Z. (2009). New insights into the activation of *Escherichia coli* tyrosine kinase revealed by molecular dynamics simulation and biochemical analysis. *Biochemistry* 48, 7986-7995.

- Macek, B., Gnad, F., Soufi, B., Kumar, C., Olsen, J.V., Mijakovic, I., and Mann, M. (2008). Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* 7, 299-307.
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J.V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P.R., and Mann, M. (2007). The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* 4, 697-707.
- Magasanik, B. (1988). Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends Biochem Sci* 13, 475-479.
- Manai, M., and Cozzone, A.J. (1979). Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem Biophys Res Commun* 91, 819-826.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H., Howe, J., Brandenburg, K., and Lopez-Goni, I. (2005). The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* 187, 5631-5639.
- Mao, Y., Doyle, M.P., and Chen, J. (2001). Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 183, 3811-3815.
- Mao, Y., Doyle, M.P., and Chen, J. (2006). Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett Appl Microbiol* 42, 642-647.
- Margolles, A., Florez, A.B., Moreno, J.A., van Sinderen, D., and de los Reyes-Gavilan, C.G. (2006). Two membrane proteins from *Bifidobacterium breve* UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter. *Microbiology* 152, 3497-3505.
- Mattoo, A.R., Arora, A., Maiti, S., and Singh, Y. (2008). Identification, characterization and activation mechanism of a tyrosine kinase of *Bacillus anthracis*. *FEBS J* 275, 6237-6247.
- Meredith, T.C., Mamat, U., Kaczynski, Z., Lindner, B., Holst, O., and Woodard, R.W. (2007). Modification of lipopolysaccharide with colanic acid (M-antigen) repeats in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 282, 7790-7798.
- Mesnage, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M., and Fouet, A. (2000). Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J* 19, 4473-4484.
- Mijakovic, I., Petranovic, D., and Deutscher, J. (2004). How tyrosine phosphorylation affects the UDP-glucose dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis* YwqF. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8, 19-25.
- Mijakovic, I., Petranovic, D., Macek, B., Cepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P.R., and Vujaklija, D. (2006). Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res* 34, 1588-1596.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Boel, G., Maze, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Le Marechal, P., *et al.* (2003). Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J* 22, 4709-4718.

- Miller, C.A., Ingmer, H., and Cohen, S.N. (1995). Boundaries of the pSC101 minimal replicon are conditional. *J Bacteriol* 177, 4865-4871.
- Min, H., and Cowman, M.K. (1986). Combined alcian blue and silver staining of glycosaminoglycans in polyacrylamide gels: application to electrophoretic analysis of molecular weight distribution. *Anal Biochem* 155, 275-285.
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J.M., Mercier, G., Ehrlich, D., and Renault, P. (2007). Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J Bacteriol* 189, 1351-1357.
- Mohamed, Z.A. (2001). Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium *Gloeotheca magna*. *Water Res* 35, 4405-4409.
- Molle, V., Soulat, D., Jault, J.M., Grangeasse, C., Cozzone, A.J., and Prost, J.F. (2004). Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 234, 215-223.
- Moreira, L.M., Hoffmann, K., Albano, H., Becker, A., Niehaus, K., and Sa-Correia, I. (2004). The gellan gum biosynthetic genes *gelC* and *gelE* encode two separate polypeptides homologous to the activator and the kinase domains of tyrosine autokinases. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8, 43-57.
- Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C., and Paton, J.C. (2003). Mutational Analysis of the Carboxy-Terminal (YGX)(4) Repeat Domain of CpsD, an Autophosphorylating Tyrosine Kinase Required for Capsule Biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 185, 3009-3019.
- Morona, J.K., Paton, J.C., Miller, D.C., and Morona, R. (2000a). Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 35, 1431-1442.
- Morona, R., Van Den Bosch, L., and Daniels, C. (2000b). Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 proteins based on the presence of coiled-coil regions. *Microbiology* 146 ( Pt 1), 1-4.
- Mouslim, C., and Groisman, E.A. (2003). Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* 47, 335-344.
- Munoz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* 67, 995-1006.
- Nakar, D., and Gutnick, D.L. (2003). Involvement of a protein tyrosine kinase in production of the polymeric bioemulsifier emulsan from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *J Bacteriol* 185, 1001-1009.
- Nariya, H., and Inouye, S. (2005). Factors that modulate the Pkn4 kinase cascade in *Myxococcus xanthus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9, 147-153.
- Niemeyer, D., and Becker, A. (2001). The molecular weight distribution of succinoglycan produced by *Sinorhizobium meliloti* is influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. *J Bacteriol* 183, 5163-5170.
- Nishino, K., Hsu, F.F., Turk, J., Cromie, M.J., Wosten, M.M., and Groisman, E.A. (2006). Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella*

- PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol Microbiol* 61, 645-654.
- Novakova, L., Bezouskova, S., Pompach, P., Spidlova, P., Saskova, L., Weiser, J., and Branny, P. (2010). Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 192, 3629-3638.
- Obadia, B., Lacour, S., Doublet, P., Baubichon-Cortay, H., Cozzzone, A.J., and Grangeasse, C. (2007). Influence of Tyrosine-Kinase Wzc Activity on Colanic Acid Production in *Escherichia coli* K12 Cells. *J Mol Biol* 367, 42-53.
- Owens, R.M., Pritchard, G., Skipp, P., Hodey, M., Connell, S.R., Nierhaus, K.H., and O'Connor, C.D. (2004). A dedicated translation factor controls the synthesis of the global regulator Fis. *EMBO J* 23, 3375-3385.
- Pagni, M., Lazarevic, V., Soldo, B., and Karamata, D. (1999). Assay for UDPglucose 6-dehydrogenase in phosphate-starved cells: gene *tuaD* of *Bacillus subtilis* 168 encodes the UDPglucose 6-dehydrogenase involved in teichuronic acid synthesis. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1049-1053.
- Paiment, A., Hocking, J., and Whitfield, C. (2002). Impact of phosphorylation of specific residues in the tyrosine autokinase, Wzc, on its activity in assembly of group 1 capsules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 6437-6447.
- Pawson, T., and Scott, J.D. (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30, 286-290.
- Peleg, A., Shifrin, Y., Ilan, O., Nadler-Yona, C., Nov, S., Koby, S., Baruch, K., Altuvia, S., Elgrably-Weiss, M., Abe, C.M., *et al.* (2005). Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J Bacteriol* 187, 5259-5266.
- Petranovic, D., Michelsen, O., Zahradka, K., Silva, C., Petranovic, M., Jensen, P.R., and Mijakovic, I. (2007). *Bacillus subtilis* strain deficient for the protein-tyrosine kinase PtkA exhibits impaired DNA replication. *Mol Microbiol* 63, 1797-1805.
- Pletz, M.W., Maus, U., Krug, N., Welte, T., and Lode, H. (2008). Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. *Int J Antimicrob Agents* 32, 199-206.
- Poncet, S., Mijakovic, I., Nessler, S., Gueguen-Chaignon, V., Chaptal, V., Galinier, A., Boel, G., Maze, A., and Deutscher, J. (2004). HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1697, 123-135.
- Portoles, M., Kiser, K.B., Bhasin, N., Chan, K.H., and Lee, J.C. (2001). *Staphylococcus aureus* Cap50 has UDP-ManNAc dehydrogenase activity and is essential for capsule expression. *Infect Immun* 69, 917-923.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., and Jacobson, G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57, 543-594.
- Prigent, M., and Morin, P. (2000). Charge effect in point projection images of carbon fibres. *J Microsc* 199 (Pt 3), 197-207.
- Prisic, S., Dankwa, S., Schwartz, D., Chou, M.F., Locasale, J.W., Kang, C.M., Bemis, G., Church, G.M., Steen, H., and Husson, R.N. (2010). Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7521-7526.

- Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S., and Bishop, R.E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 76, 295-329.
- Ravichandran, A., Sugiyama, N., Tomita, M., Swarup, S., and Ishihama, Y. (2009). Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Proteomics* 9, 2764-2775.
- Ray, M.K., Kumar, G.S., and Shivaji, S. (1994). Tyrosine phosphorylation of a cytoplasmic protein from the antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiol Lett* 122, 49-54.
- Reizer, J., Saier, M.H., Jr., Deutscher, J., Grenier, F., Thompson, J., and Hengstenberg, W. (1988). The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: properties, mechanism, and regulation. *Crit Rev Microbiol* 15, 297-338.
- Roberts, I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50, 285-315.
- Roland, K.L., and Spitznagel, J.K. (1995). Molecular genetics of polymyxin resistance in *Salmonella typhimurium*. *Prog Clin Biol Res* 392, 3-14.
- Rosenberg, E., and Ron, E.Z. (1997). Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr Opin Biotechnol* 8, 313-316.
- Sailer, F.C., Meberg, B.M., and Young, K.D. (2003). beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 226, 245-249.
- Sau, S., Bhasin, N., Wann, E.R., Lee, J.C., Foster, T.J., and Lee, C.Y. (1997). The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology* 143, 2395-2405.
- Schaffer, A.C., and Lee, J.C. (2009). Staphylococcal vaccines and immunotherapies. *Infect Dis Clin North Am* 23, 153-171.
- Schmidl, S.R., Gronau, K., Pietack, N., Hecker, M., Becher, D., and Stulke, J. (2010). The phosphoproteome of the minimal bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the complete known Ser/Thr kinome suggests the existence of novel kinases. *Mol Cell Proteomics* 9, 1228-1242.
- Schnider-Keel, U., Lejbolle, K.B., Baehler, E., Haas, D., and Keel, C. (2001). The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* 67, 5683-5693.
- Scott, M.G., and Hancock, R.E. (2000). Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 20, 407-431.
- Smelcerovic, A., Knezevic-Jugovic, Z., and Petronijevic, Z. (2008). Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals. *Curr Pharm Des* 14, 3168-3195.
- Smith, C.A., and Rayment, I. (1996). Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys J* 70, 1590-1602.
- Smith, D.B., Davern, K.M., Board, P.G., Tiu, W.U., Garcia, E.G., and Mitchell, G.F. (1986). Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8703-8707.

- Soufi, B., Gnad, F., Jensen, P.R., Petranovic, D., Mann, M., Mijakovic, I., and Macek, B. (2008). The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics* 8, 3486-3493.
- Soulat, D., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A.J., and Duclos, B. (2007a). UDP-acetylmannosamine dehydrogenase is an endogenous protein substrate of *Staphylococcus aureus* protein-tyrosine kinase activity. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 45-54.
- Soulat, D., Jault, J.M., Duclos, B., Geourjon, C., Cozzone, A.J., and Grangeasse, C. (2006). *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J Biol Chem* 281, 14048-14056.
- Soulat, D., Jault, J.M., Geourjon, C., Gouet, P., Cozzone, A.J., and Grangeasse, C. (2007b). Tyrosine-kinase Wzc from *Escherichia coli* possesses an ATPase activity regulated by autophosphorylation. *FEMS Microbiol Lett* 274, 252-259.
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., and Reeves, P.R. (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol* 178, 4885-4893.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215.
- Storm, D.R., Rosenthal, K.S., and Swanson, P.E. (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* 46, 723-763.
- Stout, V., Torres-Cabassa, A., Maurizi, M.R., Gutnick, D., and Gottesman, S. (1991). RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J Bacteriol* 173, 1738-1747.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.L., Yin, X.F., Ge, R., Zhang, L.H., and He, Q.Y. (2009). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res*.
- Suzuki, M., Takatsuki, F., Maeda, Y.Y., Hamuro, J., and Chihara, G. (1994). Antitumor and immunological activity of lentinan in comparison with LPS. *Int J Immunopharmacol* 16, 463-468.
- Tamayo, R., Choudhury, B., Septer, A., Merighi, M., Carlson, R., and Gunn, J.S. (2005). Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J Bacteriol* 187, 3391-3399.
- Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A.G., Burke, N., Plamann, L., and Hartzell, P.L. (2002). MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* 46, 1399-1413.
- Tosteson, T.R., and Corpe, W.A. (1975). Enhancement of adhesion of the marine *Chlorella vulgaris* to glass. *Can J Microbiol* 21, 1025-1031.
- Trent, M.S., Pabich, W., Raetz, C.R., and Miller, S.I. (2001a). A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 276, 9083-9092.

- Trent, M.S., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2001b). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* 276, 43122-43131.
- Tzeng, Y.L., Ambrose, K.D., Zughailer, S., Zhou, X., Miller, Y.K., Shafer, W.M., and Stephens, D.S. (2005). Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 187, 5387-5396.
- Udo, H., Munoz-Dorado, J., Inouye, M., and Inouye, S. (1995). *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. *Genes Dev* 9, 972-983.
- Vaara, M. (1981). Increased outer membrane resistance to ethylenediaminetetraacetate and cations in novel lipid A mutants. *J Bacteriol* 148, 426-434.
- Vallejos, R.H., Holuigue, L., Lucero, H.A., and Torruella, M. (1985). Evidence of tyrosine kinase activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 685-691.
- Vanhooren, P. and Vandamme, E.J. 1998. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent Res. Devel. Ferment. Bioeng.*, 1, 253-299.
- van Mourik, A., Steeghs, L., van Laar, J., Meiring, H.D., Hamstra, H.J., van Putten, J.P., and Wosten, M.M. 2010. Altered linkage of hydroxyacyl chains in lipid A of *Campylobacter jejuni* reduces TLR4 activation and antimicrobial resistance. *J Biol Chem* 285, 15828-15836.
- Ventura, C.L., Cartee, R.T., Forsee, W.T., and Yother, J. (2006). Control of capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 61, 723-733.
- Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A.J., and Duclos, B. (1999). Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J Bacteriol* 181, 3472-3477.
- Vincent, C., Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Riberty, M., Cozzone, A.J., and Doublet, P. (2000). Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J Mol Biol* 304, 311-321.
- Voisin, S., Watson, D.C., Tessier, L., Ding, W., Foote, S., Bhatia, S., Kelly, J.F., and Young, N.M. (2007). The cytoplasmic phosphoproteome of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*: evidence for modification by unidentified protein kinases. *Proteomics* 7, 4338-4348.
- Wang, J.Y., and Koshland, D.E., Jr. (1978). Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 253, 7605-7608.
- Waters, B., Vujaklija, D., Gold, M.R., and Davies, J. (1994). Protein tyrosine phosphorylation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 120, 187-190.
- Wehland, M., and Bernhard, F. (2000). The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem* 275, 7013-7020.
- Weinrauch, Y., Penchev, R., Dubnau, E., Smith, I., and Dubnau, D. (1990). A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles

- sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes Dev* 4, 860-872.
- Weintraub, A. (2003). Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr Res* 338, 2539-2547.
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 75, 39-68.
- Whitfield, C., and Paiment, A. (2003). Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr Res* 338, 2491-2502.
- Winfield, M.D., and Groisman, E.A. (2004). Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17162-17167.
- Woodward, R., Yi, W., Li, L., Zhao, G., Eguchi, H., Sridhar, P.R., Guo, H., Song, J.K., Motari, E., Cai, L., *et al.* (2010). In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat Chem Biol* 6, 418-423.
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J.L., and Newton, A. (1999). A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13068-13073.
- Wugeditsch, T., Paiment, A., Hocking, J., Drummelsmith, J., Forrester, C., and Whitfield, C. (2001). Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 2361-2371.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yeh, J.Y., and Chen, J. (2004). Production of slime polysaccharide by EHEC and STEC as well as the influence of culture conditions on slime production in *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 38, 488-492.
- Yethon, J.A., Gunn, J.S., Ernst, R.K., Miller, S.I., Laroche, L., Malo, D., and Whitfield, C. (2000). *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* *waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence *in vivo*. *Infect Immun* 68, 4485-4491.
- Yethon, J.A., Heinrichs, D.E., Monteiro, M.A., Perry, M.B., and Whitfield, C. (1998). Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J Biol Chem* 273, 26310-26316.
- Zhang, C.C. (1996). Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol* 20, 9-15.
- Zhao, X., and Lam, J.S. (2002). WaaP of *Pseudomonas aeruginosa* is a novel eukaryotic type protein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 277, 4722-4730.
- Zhou, Z., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., Miller, S.I., and Raetz, C.R. (2001). Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem* 276, 43111-43121.