

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 426 :
GÈNES GÉNOMES CELLULES

Laboratoire : Institut de Biologie Intégrative de la Cellule

Synthèse en français de la
THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Mlle Maho OKUDA

Mécanisme d'action d'une classe d'antibiotiques depuis leur
entrée jusqu'à leur cible chez la bactérie : visualisation en
temps réel

Date de soutenance : 30/09/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :
Co-directeur de thèse :
Rapporteurs :

Dr. Satoko YOSHIKAWA
Dr. Dominique FOURMY
Dr. Carine TISNÉ

Directeur de recherche (I2BC-CNRS)
Directeur de recherche (I2BC-CNRS)
Directeur de recherche (CNRS-Université Paris
Descartes)

Examineurs :

Dr. Gilles TRUAN
Pr. Jean-Luc PERNODET
Dr. Mathias SPRINGER

Directeur de recherche (INSA-Toulouse)
Professeur (CNRS-Université Paris Sud)
Directeur de recherche émérite (IBPC-CNRS)

Résumé de thèse de Melle Maho OKUDA

Les travaux de thèse de Melle OKUDA concernent le développement et l'utilisation de deux outils de fluorescence pour l'étude de la synthèse des protéines chez les bactéries. Le but est de progresser dans l'observation de la synthèse des protéines directement dans des bactéries vivantes. Le premier chapitre comprend une introduction au mécanisme de la synthèse des protéines suivit d'une description de l'état de l'art dans la visualisation de molécules d'ARN *in vivo*. Le chapitre se termine par une description de l'état des connaissances sur une famille d'antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines les aminoglycosides ainsi que leur mécanisme de franchissement de la paroi bactérienne.

Le chapitre II décrit une stratégie qui a permis d'identifier un aptamère parmi les membres de la famille « Spinach » (1) pour la visualisation des ribosomes bactériens *in vivo*. Spinach est un aptamère ARN capable de fixer un fluorophore et de le rendre actif avec émission de fluorescence sous excitation lumineuse. Plus précisément, l'aptamère « Spinach » permet de rendre fluorescent un analogue du chromophore de la « enhance green fluorescent protein » (EGFP). L'utilisation de cet aptamère représente donc une stratégie différente de celle pratiquée habituellement qui porte sur l'utilisation de protéines fluorescentes pour l'observation de macromolécules *in vivo*. Dans notre cas, la séquence de l'aptamère « Spinach » a été insérée au sein d'un ARN très structuré, l'ARN ribosomal 16S.

Le chapitre III se focalise sur l'étude du mécanisme d'accumulation d'une classe d'antibiotiques ayant pour cible le ribosome par les bactéries à Gram positif et négatif, les aminoglycosides. Pour ce faire nous avons utilisé un dérivé fluorescent actif de la néomycine. Ce nouveau conjugué a gardé son activité bactéricide et permet pour la première fois de suivre en temps réel l'accumulation des aminoglycosides dans les bactéries. Nous avons également obtenu des résultats sur la localisation de l'antibiotique une fois que celui-ci a franchi la paroi bactérienne avec une très haute résolution spatiale en utilisant des outils de microscopie en super-résolution.

Le manuscrit de thèse se termine par le chapitre IV qui est une discussion et une synthèse des résultats décrits dans les chapitre II et III avec une mise en perspective. Les chapitre V et VI contiennent respectivement la section matériels et méthodes et une première publication en révision.

Chapitre I Introduction

Une 1^{ère} partie introductive décrit les quatre principales étapes de la synthèse des protéine par le ribosome : la phase de démarrage, l'élongation, la terminaison et le recyclage du ribosome. Une deuxième partie décrit l'historique et l'état de l'art de l'observation des molécules d'ARN dans les bactéries vivantes. Les stratégies utilisées font souvent appel à des protéines fluorescentes qui peuvent être fusionnées à des peptides possédant une forte affinité pour des séquences d'ARN. Lorsque ces séquences « étiquettes » d'ARN sont introduites dans l'ARN d'intérêt en multiple copie, les protéines fluorescentes exprimées se fixent aux séquences étiquettes et permettent la localisation de l'ARN d'intérêt *in vivo*. En plaçant de nombreuses copies d'une même séquence étiquette au sein d'un ARN, celui-ci peut-être identifié au niveau de la molécule unique. Une introduction au système aptamère « Spinach » est donnée avec une description de ses avantages par rapport aux techniques habituelles faisant appel aux protéines fluorescentes. Une partie décrit les techniques de microscopie en super-résolution utilisées dans le travail de thèse: PALM pour PhotoActivated Localization Microscopy et STORM pour Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. Une 3^{ème} partie décrit le ribosome en tant que cible d'une grande partie des antibiotiques disponibles actuellement et l'état de l'art sur les mécanismes d'entrée dans la bactérie d'une classe

d'antibiotiques bactéricides : les aminoglycosides. Il est également rappelé l'effet de ces antibiotiques sur la fonction du ribosome. Ces antibiotiques représentent une famille importante de composés qui provoque des erreurs de lecture du code génétique conduisant à des dommages et à la mort cellulaire. La littérature sur les mécanismes d'entrée des aminoglycosides dans les bactéries est abondante avec les premiers travaux qui datent de 1960. Cependant les mécanismes moléculaires de franchissement des parois bactériennes restent encore mal compris et en particulier il n'existe pas d'étude à l'échelle de la cellule unique dans une population bactérienne.

Chapitre II Stratégie d'identification d'un aptamère Spinach pour la visualisation du ribosome bactérien sur bactérie vivante

Spinach est une séquence d'ARN qui adopte une structure particulière contenant une poche de fixation à un chromophore, le 3,5-DiFluoro-4-HydroxyBenzylidene Imidazolinone (DFHBI) (2,3). Cet aptamère possède l'avantage qu'il peut être inséré génétiquement au sein d'un ARN d'intérêt pour permettre l'observation sur des bactéries vivantes. Depuis la description du premier aptamère « Spinach » (1), cette séquence a été modifiée afin d'améliorer ses performances en termes de stabilité, repliement et fluorescence. Cependant, une analyse comparative de toutes ces versions n'était pas disponible. Nous avons donc utilisé une stratégie qui nous a permis d'identifier parmi plusieurs constructions ribosomales contenant différentes séquences de l'aptamère « Spinach » une séquence qui présente d'excellentes propriétés de fluorescence pour une visualisation chez la bactérie. De façon pratique, 8 séquences différentes (existantes ou nouvellement créées lors de la thèse) de l'aptamère « Spinach » ont été insérées dans un site préalablement identifié de l'ARN ribosomal 16S. Ce site a été choisi afin de ne pas perturber la fonction du ribosome (4). Les séquences insérées varient dans leurs structures et leurs tailles. Nous avons trouvé que la taille de l'insert doit être maintenue à une taille raisonnable car les séquences longues affectent la croissance bactérienne. La séquence de l'aptamère est insérée au bout de la structure en tige-boucle de l'hélice 33a de l'ARN 16S (Figure 1). Nos résultats suggèrent que cette structure facilite le repliement et la stabilité de l'aptamère « Baby Spinach » lorsque l'on compare son niveau de fluorescence *in vivo* par rapport à son comportement *in vitro*. En effet, *in vitro* l'aptamère « Baby Spinach » possède des performances médiocres alors que *in vivo* au sein de l'hélice 33a, cet aptamère surpasse toutes les autres séquences testées (Figure 2). L'aptamère « Baby Spinach » est en fait le plus court et compact de tous les aptamères testés ce qui explique sans doute sa résistance toute particulière à la dégradation par les RNases. Cette résistance contribue à l'excellent signal de fluorescence que cet aptamère est capable de produire. Baby Spinach constitue par conséquent un excellent système pour le marquage et l'observation d'ARN structurés bactériens.

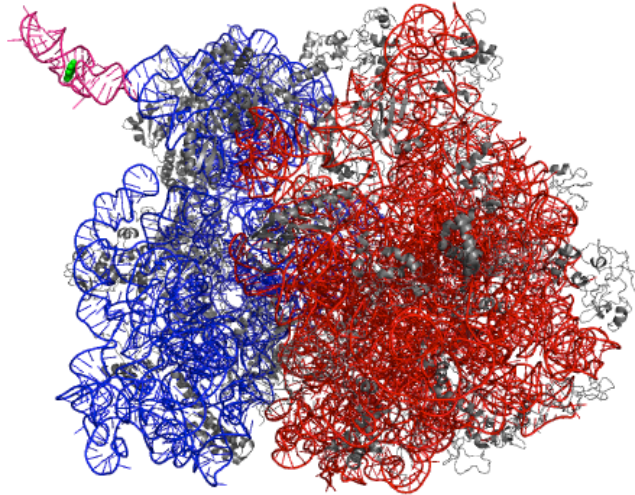


Figure 1: Modèle du ribosome avec l'insertion de l'aptamère « Baby Spinach » au bout de l'hélice h33a du ribosome d'*E. coli* (codes PDB: 2AW4 and 2AVY). La séquence « Baby Spinach » (rose) liée au chromophore DFHBI (vert) a été créée à partir de la structure cristalline de l'aptamère Spinach lié à DFHBI (code PDB : 4KZD (2)). L'ARN 16S est représenté en bleu et les ARN 5S et 23 S sont en rouge. Les protéines ribosomales sont en gris.

Figure 2 sont indiqués les résultats d'une comparaison des différentes séquences « Spinach » insérées dans le ribosome et exprimées dans une souche de bactérie *E. coli* TA531. Cette souche a la particularité de n'exprimer que le ribosome contenant l'insert « Spinach ». On remarque que les bactéries exprimant des ribosomes « Baby Spinach », Spinach mini et « Spinach2-mini » donnent des niveaux de fluorescence élevés.

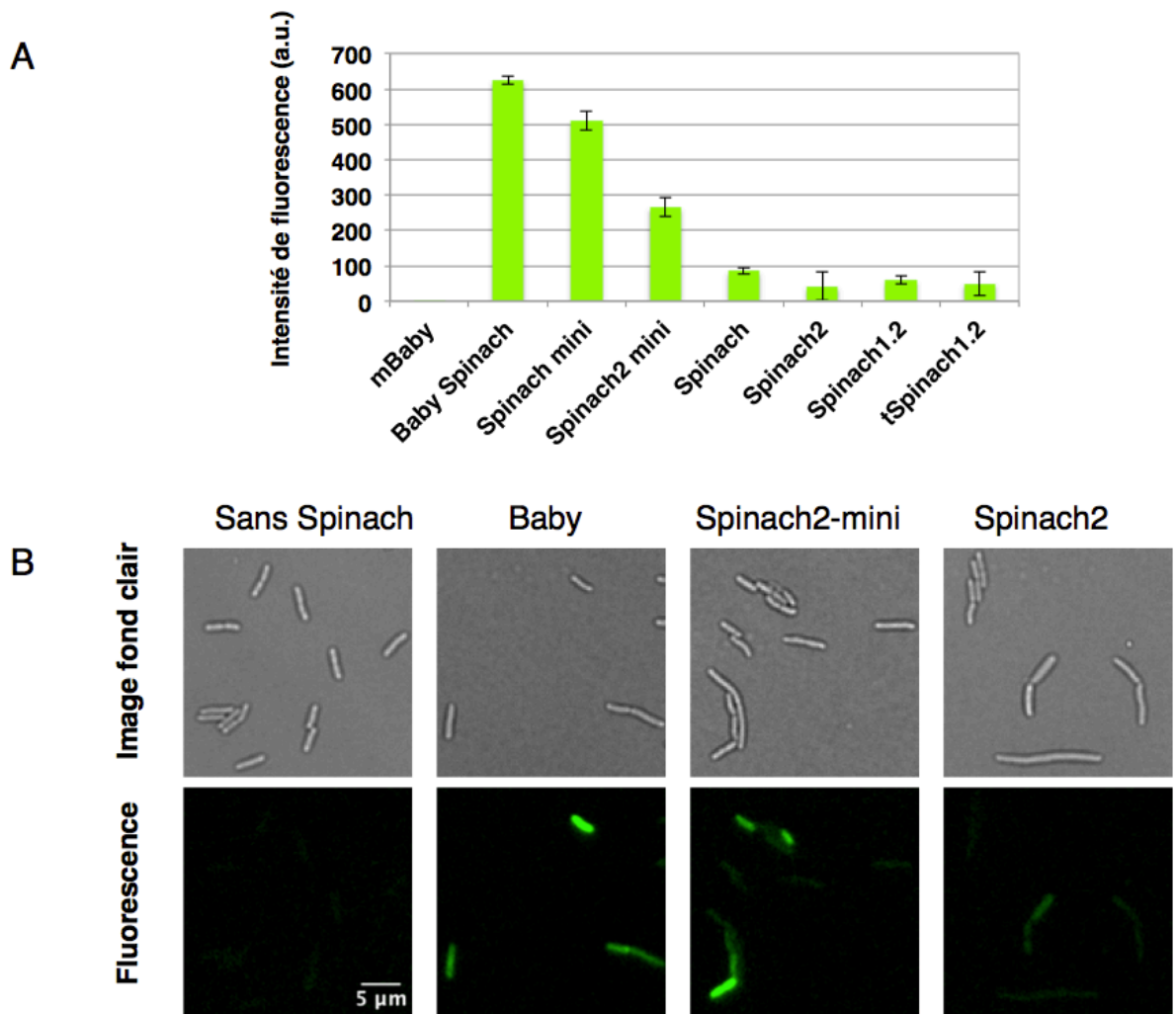


Figure 2: Test de fluorescence *in vivo* des séquences ribosomales contenant différentes versions de l'aptamère Spinach. (A) Signaux de fluorescence de cellules *E. coli* TA531 incubées avec 20 μM DFHBI dans du milieu M9-Glucose (2 mM magnésium) à 37°C pendant 30 minutes. Les valeurs ont été corrigées pour le bruit de fond généré par le DFHBI et normalisées par rapport au niveau d'expression de l'ARN 16S. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard pour trois expériences indépendantes. (B) Images de cellules *E. coli* TA531 exprimant des ribosomes étiquetés avec différentes séquences Spinach. La luminosité des images a été ajustée par rapport au signal enregistré pour la séquence Baby Spinach. On remarque une hétérogénéité dans les niveaux de fluorescence à l'échelle de la cellule unique.

Une comparaison de la taille de l'aptamère « Baby Spinach » par rapport à l'aptamère découvert à l'origine « Spinach » est illustrée Figure 2. La structure de Baby Spinach est en effet beaucoup plus proéminente que celle du Spinach1.2. Même si l'hélice h33a est localisée dans le « dos » de la sous-unité 30S du ribosome, une telle extension dans le solvant rend la séquence de l'aptamère très accessible à une éventuelle dégradation par des RNase surtout en l'absence du ligand DFHBI où l'aptamère est moins structuré. Il est également possible qu'une telle structure aussi allongée affecte la synthèse des protéines au sein des polysomes où les ribosomes sont très proches les uns des autres, voire même en contact (5).

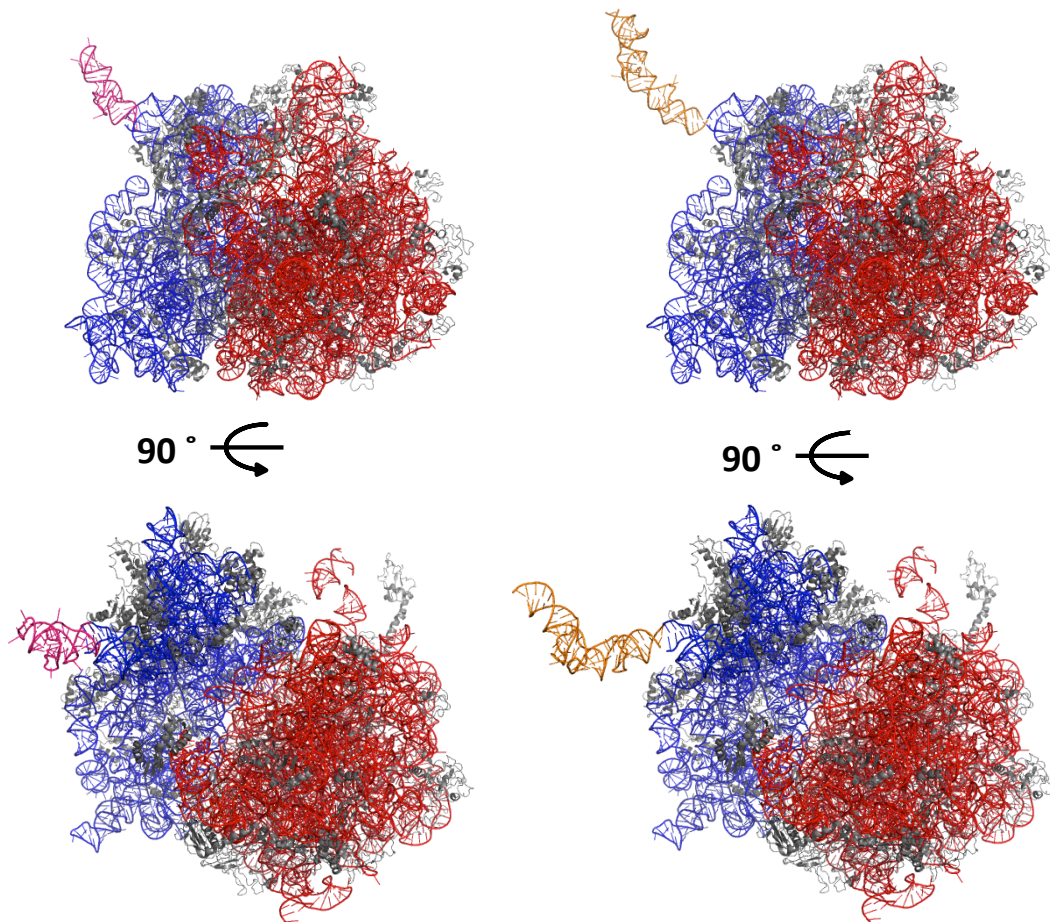


Figure 3: Modèle du ribosome avec l'insertion de l'aptamère « Baby Spinach » (gauche) et Spinach1.2 (droite) en superposant les structures de Baby Spinach ou Spinach1.2 (code PDB: 4TS0 (3)) au ribosome d'*E. coli* (codes PDB: 2AW4 and 2AVY) dans le logiciel PyMOL. Les couleurs sont comme dans la Figure 1. Les structures en bas ont été obtenues après une rotation de 90° afin d'obtenir une vue de dessus du ribosome.

Effet de la séquence des inserts Spinach

Nos résultats indiquent que la séquence en elle-même des inserts de Spinach est importante. En effet nos données sur micro-Baby Spinach (mBaby Spinach) et deux de ses variants qui présentent une simple mutation montrent un effet sur la physiologie de la bactérie. La séquence mBaby Spinach est plus courte que celle de Baby Spinach de 8 nucléotides. Deux variants diffèrent par de simples mutations et pourtant ils présentent une vitesse de croissance presque normale avec la souche *E. coli* TA531, alors que la séquence parentale mBaby souffre d'une forte diminution. Ces deux variants ont été obtenus lors du clonage de l'insert mBaby. La séquence 5'- UUCGCGUU -3' de mBaby Spinach est une séquence unique parmi toutes les constructions contenant l'aptamère Spinach. Le variant M1 de mBaby Spinach a la séquence 5'- UC*CGCGUU -3' (le site de la mutation est indiqué par une étoile) et le deuxième (M2) possède la séquence 5'- UUCGCA*UU -3' au lieu de la séquence d'origine. Nous avons trouvé une séquence complémentaire (5'- AACGCGAA -3') à cette séquence dans l'hélice 31 de l'ARN 16S (Figure 4). Notre hypothèse pour expliquer cette observation est la suivante : la séquence de mBaby Spinach qui contient la séquence 5'- UUCGCGUU -3' pourrait interagir avec la séquence de l'hélice 31 et perturber le repliement et/ou la maturation du ribosome. Les mutations simples dans les deux variants auraient pour effet de diminuer la stabilité de cet appariement entre l'aptamère et la séquence de l'hélice 31

ce qui permettrait de retrouver un ribosome fonctionnel et donc d'obtenir une souche *E. coli* TA531 avec une vitesse de croissance normale.

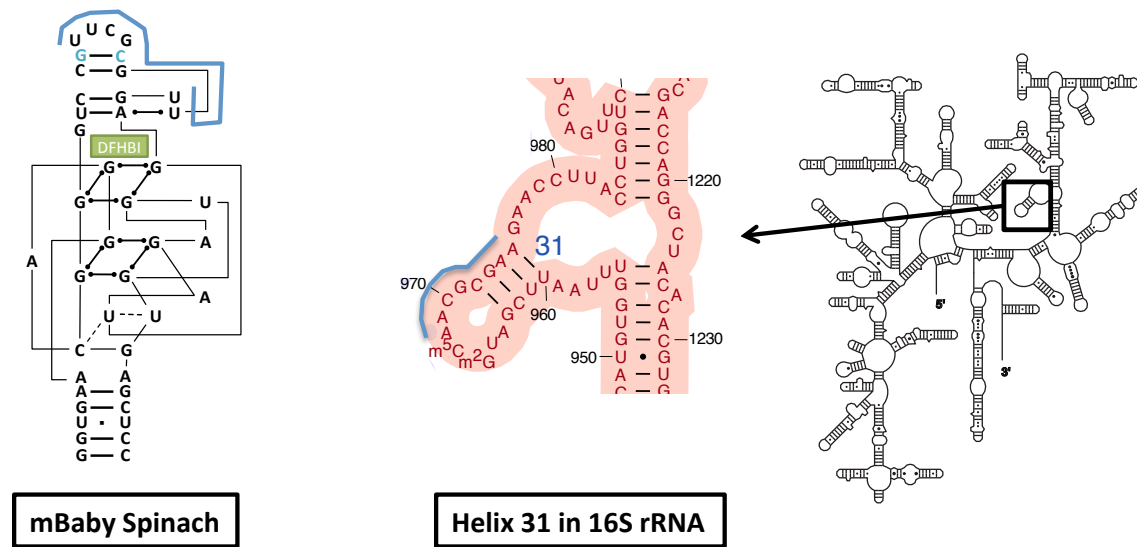


Figure 4: séquence 5'-UUCGCGUU-3' de mBaby Spinach et la séquence 5'-AACGCGAA-3' identifiée dans l'hélice 31 de l'ARN 16S.

Conclusion du chapitre II

Nous avons donc utilisé une stratégie qui nous a permis d'identifier la meilleure séquence, parmi un ensemble de séquences Spinach connues, permettant une visualisation optimale du ribosome dans des bactéries vivantes. Cette approche pourra être appliquée à d'autres séquences d'intérêt d'ARN cellulaires structurés. Notre approche prend avantage de la plateforme naturelle de l'ARN 16S du ribosome qui favorise le repliement de l'aptamère et lui confère une protection de l'attaque par des nucléases. Cette approche pourrait en fait être généralisée à l'identification d'aptamères très robustes. En ce qui nous concerne, cela va élargir notre capacité d'étude et de visualisation du ribosome bactérien qui, pour l'instant, n'a été effectuée que par marquage de protéines ribosomales par une protéine fluorescente de la famille de la GFP sous forme de protéines de fusion. Par exemple, la protéine ribosomale S2 a été fusionnée à la protéine YFP et a permis une estimation du nombre de copies de molécules de ribosome dans des cellules vivantes d'*E. coli* en utilisant la microscopie en super-résolution (6). Les protéines L9 et L1 ont également été ciblées (7,8). Cette méthode conventionnelle peut s'appliquer à des protéines fluorescentes aux propriétés particulières pour une utilisation en PALM. Cependant ces méthodes ont un point faible, elles ne permettent de marquer les ribosomes bactériens que de façon homogène dans toute la cellule. La quantité de ribosomes dans une bactérie représente un obstacle à leur observation fine. En ce qui concerne l'ARN ribosomal celui-ci possède des sites actifs du ribosome et des sites de fixation des acteurs de la synthèse des protéines. Il est donc possible par exemple d'utiliser des ribosomes « spécialisés » qui possèdent une séquence anti-Shine-Dalgarno qui est modifiée afin de diriger la fixation de ces ribosomes spécialisés sur un ARNm d'intérêt (9). Dans ce cas la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm est elle même modifiée pour s'apparier à la séquence anti-Shine-Dalgarno du ribosome spécialisé. La modification de cette séquence anti-Shine-Dalgarno dans des ribosomes « Spinach » permettrait d'observer spécifiquement des ribosomes en train de traduire un ARNm spécifique (si la quantité de ribosomes Spinach fluorescents reste sous contrôle afin d'éviter un excès qui empêcherait à nouveau toute

observation). Une telle approche permettrait de progresser dans l'étude de la dynamique des ribosomes dans les cellules vivantes.

Chapitre III Accumulation des antibiotiques aminoglycosides par les bactéries

Un dérivé de la néomycine la Neo-Cy5: un nouvel outil

Depuis des décennies, plusieurs laboratoires ont fait avancer le domaine de recherche sur le mécanisme d'entrée des aminoglycosides dans les bactéries. Ces travaux sont particulièrement bien résumés dans deux revues (10,11). Trois phases d'entrée ont été identifiées. La première correspond à une fixation par interaction électrostatique à la surface de la paroi bactérienne. En effet les aminoglycosides possèdent des fonctions amines et sont donc chargés positivement à un pH physiologique. La paroi bactérienne est elle chargée négativement. Cette première étape est suivie par deux phases qui quant à elles requièrent de l'énergie. Elles sont appelées EDPI et EDPII pour (energy dependent phase I and II). L'accumulation active et irréversible des aminoglycosides a besoin du gradient de proton au sein de la membrane cytoplasmique (la force protomotrice). Cependant il n'y a toujours pas de compréhension détaillée des mécanismes moléculaires qui permettent à ces antibiotiques de pénétrer dans les bactéries afin d'y exercer leur action bactéricide. Notre but était d'obtenir une vue nouvelle de ce mécanisme en utilisant des outils modernes de visualisation. Un nouveau conjugué fluorescent d'un aminoglycoside a été développé dans ce but. Nous avons démontré tout d'abord que le dérivé a conservé son activité antibiotique ainsi que sa capacité à être accumulé dans les bactéries. Nous démontrons que l'antibiotique a conservé ses propriétés de fixation au site de décodage du ribosome et par conséquent a gardé son activité délétère sur la lecture du code génétique. La valeur de la MIC (valeur minimum d'inhibition de la croissance bactérienne) reste comparable à celle des antibiotiques de la famille de la néomycine même si cette valeur est 4 fois supérieure à la molécule parentale. L'antibiotique a été conjugué au fluorophore (Cy5) qui a d'excellentes propriétés pour la microscopie en super-résolution (STORM). Nous avons ainsi visualisé la localisation du conjugué une fois qu'il a pénétré les bactéries et ceci à une très haute résolution. Les protocoles que nous développons s'améliorent comme illustré Figure 5.

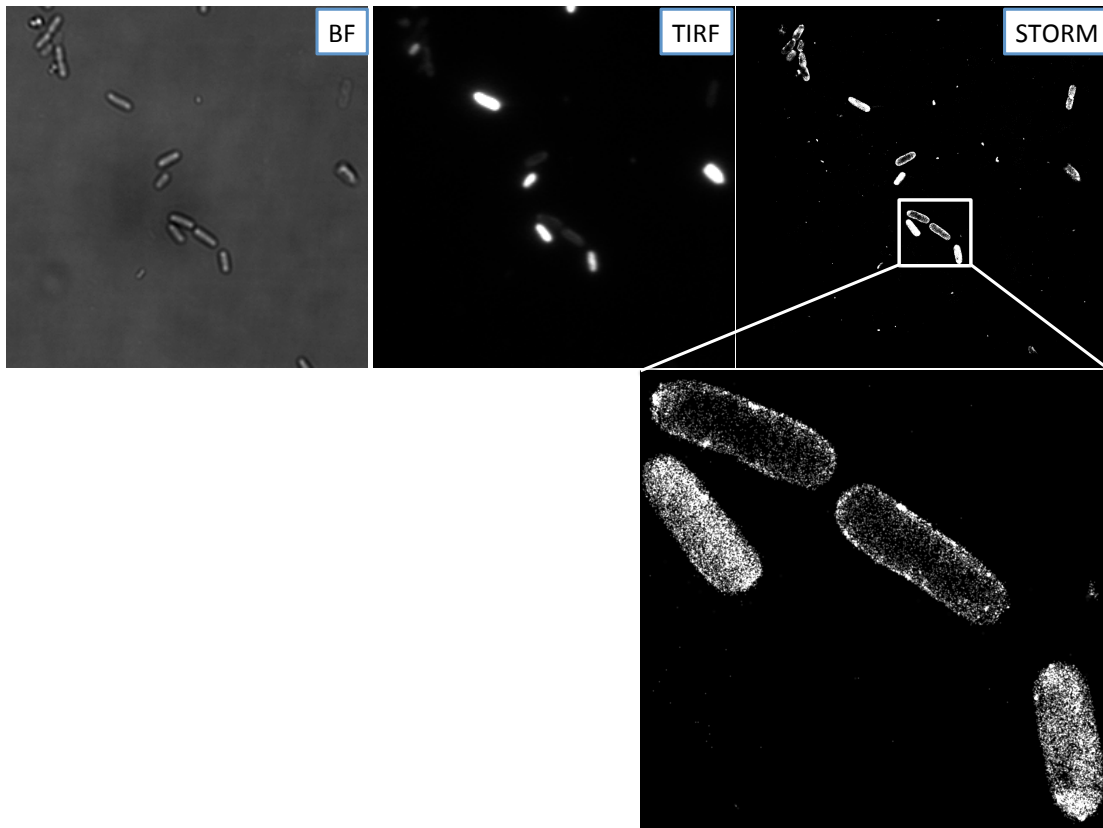


Figure 5: images en super-résolution de la localisation de l'antibiotique fluorescent dans des bactéries vivantes. BF : image des bactéries en fond clair. TIRF : image de la fluorescence obtenue en microscopie de réflexion totale. Les bactéries avec une accumulation à la périphérie présentent des niveaux d'intensités de fluorescence beaucoup plus faibles que les cellules ayant accumulé de très fortes quantités de l'antibiotique dans le cytoplasme. STORM : image de la fluorescence cette fois en super-résolution (STORM) avec un agrandissement sur quatre bactéries. Les différences de localisation pour les accumulations à la périphérie ou cytoplasmique sont clairement identifiables.

Une analyse à l'échelle de la cellule unique

Dans les expériences d'accumulation de l'antibiotique dans la bactérie *E. coli*, nous avons observé plusieurs situations. Toutes les bactéries exposées accumulent de façon irréversible l'antibiotique à la périphérie (sans doute dans le périplasme). Une fraction des cellules, dont le pourcentage dépend du milieu de croissance utilisé, de la phase de croissance et de la concentration en cellules, a la capacité pour des raisons encore inconnues d'accumuler de très fortes quantités d'antibiotique dans le cytoplasme. Cette accumulation est aussi irréversible et est largement supérieure à l'accumulation périphérique. Cette accumulation conduit, par les effets néfastes de l'antibiotique sur la lecture du code génétique, à la perméabilisation de la membrane et à la mort cellulaire. Nous avons pu suivre cette perméabilisation en observant la fuite de l'antibiotique fluorescent. Un troisième cas de figure a été observé pour les cellules en cours de division. Dans ce cas, toutes les cellules accumulent de façon transitoire l'antibiotique au septum lors de la division. Cette fixation n'a aucune conséquence létale sur les bactéries puisque celles-ci continuent à se diviser lors de l'observation sous le microscope. Cependant, cette observation était inattendue et mérite une attention particulière puisque l'identification du site de fixation au septum pourrait révéler une cible potentielle pour de futurs dérivés des aminoglycosides. En effet il est important de noter

que la localisation septale que nous avons observée est très similaire à celle découverte pour le site de synthèse du peptidoglycane qui a été identifiée par marquage *in situ* avec des acides aminés D fluorescents (12). La synthèse du peptidoglycane est en effet la cible d'importants antibiotiques tels que la vancomycine (chez les bactéries à Gram positif) ou les beta-lactames agissant sur les bactéries à Gram positif et négatif.

Etant capable de classifier dans les données de microscopie les bactéries *E. coli* ayant été exposées à la néomycine fluorescente dans différentes catégories (accumulation périplasmique, cytoplasmique ou septale) cela nous a permis de nous engager dans une analyse fine, à l'échelle de la cellule unique, des populations bactériennes traitées. Nous avons mesuré les effets du temps d'exposition ou de la concentration en antibiotique. Une augmentation du temps d'exposition se traduit par une augmentation de l'accumulation périplasmique ou cytoplasmique. Quant à l'expérience où l'on a mesuré l'effet de la concentration, elle indique un lien direct entre la concentration externe et l'accumulation périplasmique. Ces résultats ont besoin d'être confirmés mais ils suggèrent bien une étape diffusive lors du franchissement de la membrane externe. Cela soulève d'ailleurs une question intéressante. Pourquoi l'accumulation est elle irréversible (à une échelle de temps raisonnable). Cela pourrait être lié à la présence des molécules de lipopolysaccharides qui sont trouvées uniquement sur la surface externe de la paroi bactérienne et impliquées dans un mécanisme auto-induit de franchissement de la paroi bactérienne. L'hypothèse est la suivante. Les aminoglycosides cationiques perturberaient la structure de la membrane au niveau des lipopolysaccharides pour y pénétrer. Une fois dans le périplasma, les molécules d'aminoglycosides ne seraient pas en mesure de refranchir la paroi du fait de l'absence de lipopolysaccharides du côté interne de la paroi.

Une analyse plus précise sera également réalisée sur la fraction qui accumule l'antibiotique dans le cytoplasme. Ceci pourrait être la première opportunité pour décomposer l'analyse de l'étude du mécanisme d'accumulation des aminoglycosides au niveau de chaque membrane, la paroi externe et la paroi interne des bactéries à Gram négatif, ce qui restait jusqu'à présent impossible par absence de visualisation avec les aminoglycosides radioactifs.

Nous avons également effectué des expériences en observant en fonction du temps le comportement des bactéries préalablement exposées à l'antibiotique fluorescent. Différentes observations ont été faites telles que l'accumulation transitoire de l'antibiotique au septum de division, la fuite soudaine ou lente de l'antibiotique (dans certaines conditions expérimentales) traduisant la perméabilisation de la paroi bactérienne. L'un des buts de cette étude de visualisation en temps réel est d'observer l'accumulation lors de la transition du périplasma vers le cytoplasme de qui permettra d'améliorer notre compréhension de ce mécanisme.

Nous avons également démontré que le protonophore, le Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) qui décroît la force protomotrice bloque seulement l'accumulation cytoplasmique et n'a aucun effet sur l'accumulation au niveau du périplasma. Cela renforce l'idée que le franchissement de la paroi externe est un phénomène diffusif alors que pour la barrière de la membrane cytoplasmique, c'est un mécanisme actif qui requiert de l'énergie.

Gram-négatif versus Gram-positif

Enfin, nous avons étudié l'accumulation des aminoglycosides par les bactéries à Gram-positif avec comme modèle: *B. subtilis* wt168 (Figure 6). Comme pour les bactéries à Gram-négatif, *B. subtilis* accumule des niveaux élevés de l'antibiotique dans le cytoplasme. De façon surprenante nous avons observé l'accumulation en périphérie qui paraît cette fois transitoire puisque l'élimination de l'excès d'antibiotique Neo-Cy5 du milieu de culture

provoque une disparition de la fluorescence. Si cette accumulation périphérique était stable chez *E. coli* qui présente des membranes internes et externes, la région externe de la paroi de *B. subtilis* est plus perméable (13) et n'est sans doute pas en mesure de retenir le Neo-Cy5.

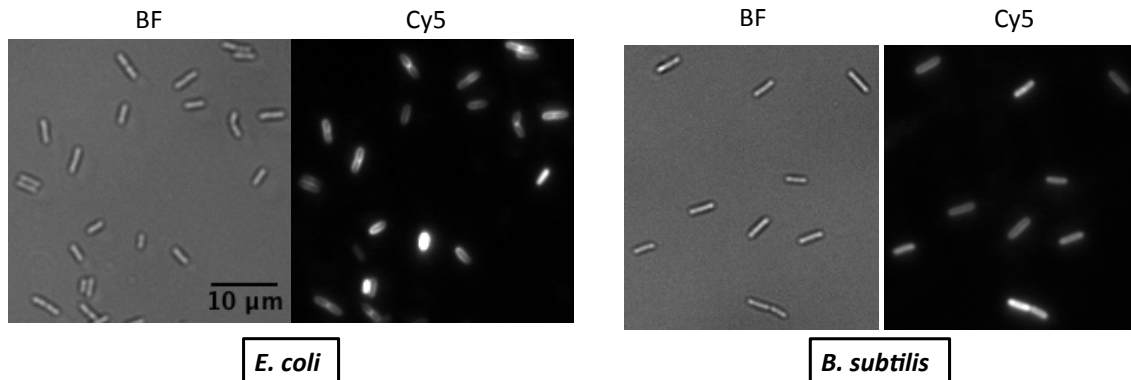


Figure 6: Images d'*E. coli* (bactérie gram-négatif: gauche) et *B. subtilis* (gram-positif bactérie: droite) exposées à la Neo-Cy5. La population de bactéries *E. coli* se répartit en différentes catégories d'accumulation: à la périphérie, dans le cytoplasme et au septum. Chez *B. subtilis* l'antibiotique Neo-Cy5 se distribue différemment: uniformément dans les cellules en division, à la périphérie de la cellule.

Nous avons également poussé l'analyse chez *B. subtilis* au niveau de la cellule unique. Des différences intéressantes apparaissent entre *B. subtilis* et *E. coli*. Notamment, l'accumulation au septum se produit à un stade très précoce de la division cellulaire, au moment où les signes morphologiques de la division ne sont pas encore visibles. L'entrée de l'antibiotique Neo-Cy5 dans le cytoplasme a des traits communs chez les deux organismes (*B. subtilis* et *E. coli*) comme la dépendance à la PMF (bloquée par le CCCP) et le caractère irréversible de l'accumulation cytoplasmique. Cela démontre que les bactéries à Gram positif et Gram négatif utilisent la force protomotrice pour une forte accumulation cytoplasmique.

Conclusion

Nous avons maintenant une meilleure visualisation de l'accumulation des aminoglycosides chez les bactéries à Gram-positif et négatif. Il reste beaucoup de progrès à faire notamment pour une compréhension au niveau moléculaire du mécanisme d'entrée mais nous avons avancé depuis les premières observations de Bernard Davis en 1960 (Figure 7). Nous avons maintenant la possibilité de suivre l'accumulation en temps réel et au niveau de la cellule unique. Cela nous donnera peut-être dans un avenir proche des informations sur les différences physiologiques entre cellules qui expliqueront pourquoi dans une culture cellulaire, certaines cellules sont aptes pour une forte accumulation cytoplasmique et d'autres non. Cela permettra de mieux comprendre comment cette famille d'antibiotique pénètre dans les bactéries et de déboucher sur le développement de nouvelles stratégies pour favoriser l'accumulation des antibiotiques ou développer de nouveaux antibiotiques pour une meilleure antibiothérapie.

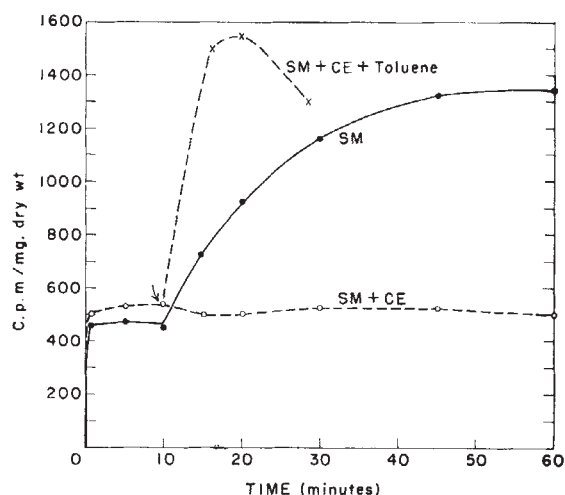


Fig. 1. Uptake of streptomycin labelled with carbon-14. 40 $\mu\text{gm./ml.}$ of labelled streptomycin (formed from uniformly labelled glucose) was added to an exponentially growing shaking culture in minimal medium, and to two similar cultures (labelled *CE*) to which chloramphenicol (20 $\mu\text{gm./ml.}$) had been added 2 min. earlier. At the time indicated by the arrow, one *CE* culture received 0.02 ml. of toluene per ml. of culture

Figure IV-2-3: Figure 1 de la publication du laboratoire de B. Davis “Uptake of Streptomycin by *Escherichia coli*” (14).

Références

1. Paige, J.S., Wu, K.Y. and Jaffrey, S.R. (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, **333**, 642-646.
2. Huang, H., Suslov, N.B., Li, N.S., Shelke, S.A., Evans, M.E., Koldobskaya, Y., Rice, P.A. and Piccirilli, J.A. (2014) A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nature chemical biology*, **10**, 686-691.
3. Warner, K.D., Chen, M.C., Song, W., Strack, R.L., Thorn, A., Jaffrey, S.R. and Ferre-D'Amare, A.R. (2014) Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein. *Nature structural & molecular biology*, **21**, 658-663.
4. Dorywalska, M., Blanchard, S.C., Gonzalez, R.L., Kim, H.D., Chu, S. and Puglisi, J.D. (2005) Site-specific labeling of the ribosome for single-molecule spectroscopy. *Nucleic acids research*, **33**, 182-189.
5. Brandt, F., Etchells, S.A., Ortiz, J.O., Elcock, A.H., Hartl, F.U. and Baumeister, W. (2009) The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell*, **136**, 261-271.
6. Bakshi, S., Siryaporn, A., Goulian, M. and Weisshaar, J.C. (2012) Superresolution imaging of ribosomes and RNA polymerase in live *Escherichia coli* cells. *Molecular microbiology*, **85**, 21-38.
7. Chai, Q., Singh, B., Peisker, K., Metzendorf, N., Ge, X., Dasgupta, S. and Sanyal, S. (2014) Organization of ribosomes and nucleoids in *Escherichia coli* cells during growth and in quiescence. *The Journal of biological chemistry*, **289**, 11342-11352.
8. Montero Llopis, P., Jackson, A.F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T. and Jacobs-Wagner, C. (2010) Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*, **466**, 77-81.
9. Rackham, O. and Chin, J.W. (2005) A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nature chemical biology*, **1**, 159-166.

10. Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F. and Arrow, A.S. (1987) Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiological reviews*, **51**, 439-457.
11. Davis, B.D. (1987) Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological reviews*, **51**, 341-350.
12. Kuru, E., Hughes, H.V., Brown, P.J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., de Pedro, M.A., Brun, Y.V. and VanNieuwenhze, M.S. (2012) In Situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angewandte Chemie*, **51**, 12519-12523.
13. Matias, V.R. and Beveridge, T.J. (2005) Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Molecular microbiology*, **56**, 240-251.
14. Anand, N., Davis, B.D. and Armitage, A.K. (1960) Uptake of streptomycin by *Escherichia coli*. *Nature*, **185**, 23-24.