



**HAL**  
open science

**Etude du mécanisme de résistance aux peptides antimicrobiens médié par un transporteur ABC couplé à un système de régulation à deux composants chez *Streptococcus pneumoniae***

Aissatou Maty Diagne

► **To cite this version:**

Aissatou Maty Diagne. Etude du mécanisme de résistance aux peptides antimicrobiens médié par un transporteur ABC couplé à un système de régulation à deux composants chez *Streptococcus pneumoniae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1258 . tel-03685693

**HAL Id: tel-03685693**

**<https://theses.hal.science/tel-03685693v1>**

Submitted on 2 Jun 2022

**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.



N° d'ordre NNT : 2021LYSE1258

## THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**

**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

**Spécialité de doctorat : Biochimie**

Soutenue publiquement le 30/11/2021, par :

**Aissatou Maty DIAGNE**

---

# **Etude du mécanisme de résistance aux peptides antimicrobiens médié par un transporteur ABC couplé à un système de régulation à deux composants chez *Streptococcus pneumoniae***

---

Devant le jury composé de :

<b>Mme Cécile Morlot</b> <i>Institut de Biologie Structurale, Grenoble</i>	Directrice de Recherche	Rapportrice
<b>Mme Isabelle SCHALK</b> <i>Université de Strasbourg</i>	Directrice de Recherche	Rapportrice
<b>Mr Thierry TOUZE</b> <i>Institut de Biologie Intégrative de la cellule, Paris</i>	Maitre de Conférences	Rapporteur
<b>Mme Stéphanie RAVAUD</b> <i>Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale (MMSB), Lyon</i>	Maitre de Conférences	Examinatrice
<b>Mr Jean-Michel JAULT</b> <i>Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale (MMSB), Lyon</i>	Directeur de Recherche	Examineur
<b>Mr Cédric ORELLE</b> <i>Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale (MMSB), Lyon</i>	Chargé de Recherche	Directeur de thèse

## **Université Claude Bernard – LYON 1**

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Générale des Services	M. Pierre ROLLAND

### **COMPOSANTES SANTE**

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administrateur Provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE



# Remerciements

## Je dédie cette thèse

A mon très cher père, une personne respectueuse avec un très grand coeur capable de donner beaucoup d'amour. Une personne qui est toujours une source de bonne humeur et de joie partout où il passe. Je suis tellement heureuse que tu aies pu assister à ma soutenance de thèse. J'espère que, de là où tu te trouves, tu es fière de ta fille aînée. Repose en paix mon petit papa et que le paradis soit ta dernière demeure. Tu me manques énormément.

A ma très chère mère, source inépuisable d'amour, de tendresse, de persévérance et de sacrifice. Je n'ai pas les mots pour t'exprimer la profonde reconnaissance que j'ai envers toi pour avoir fait de moi la personne que je suis devenue. Que le Dieu tout puissant te préserve et t'accorde une longue vie remplie de bonheur et de santé.

Je souhaitais tout d'abord remercier profondément Jean-Michel Jault pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et pour toute l'aide qu'il m'a apporté durant cette thèse. Tu étais toujours disponible pour discuter de mes résultats et répondre à mes questions. Je n'oublierais jamais aussi les blagues que tu racontais durant les déjeuners ou les pauses-café même si je dois avouer que la retombée de certaines me passait complètement à côté.

Je suis reconnaissante envers Mme Cécile Morlot, Mme Isabelle Schalk et Mr Thierry Touze pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. J'aimerais aussi remercier Mme Stéphanie Ravaud ainsi que Mr Jean-Michel Jault pour avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer ma thèse.

Je remercie aussi les membres de mon Comité de Suivi de Thèse : Mr Sébastien Guiral, Mme Claire Durmort, Mr Pierre Falson et Mr Vincent Cattoir pour tous les conseils qu'ils m'ont donnés lors de nos échanges.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pour la bourse doctorale ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et la Fondation FINOVI pour les financements octroyés qui ont permis de mener à bien ce projet de thèse.

J'en viens à Cédric Orelle, mon directeur de thèse. Je ne pense pas que j'ai les mots pour t'exprimer ma gratitude. Merci beaucoup de m'avoir fait confiance depuis le stage de fin d'études en Master 2, d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée à dépasser les limites que je me fixais. Merci pour tes conseils avisés et pour toutes ces discussions scientifiques et non scientifiques qui m'ont permis d'élargir mes horizons et d'avoir plus confiance en moi. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions et me poser pleins d'interrogations qui m'ont fait réfléchir même si cela pouvait durer des heures. Je n'oublierais jamais la première fois où j'ai osé te dire que je n'étais pas très d'accord avec la stratégie adoptée et que je voulais tester certaines expérimentations. Tu m'as répondu : « Bravo Maty, je suis content que tu ne sois pas d'accord avec moi et que tu veuilles tester de nouvelles choses. Fais-le et on verra ce que cela donne ». Je pense que cette réponse a été un des moments importants qui m'ont permis de sortir de ma coquille et de m'affirmer plus dans le projet de thèse. Je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait et je suis particulièrement heureuse d'être la première doctorante que tu as encadrée à 100%.

Je remercie chaleureusement tous les membres de la « Team JMJ » (passés et présents) pour leur gentillesse. Tous autant qu'ils sont, ils ont contribué à la réussite de cette thèse en me donnant des conseils et en m'aidant dans certaines expérimentations : Sylvain, Maxime, Benjamin, Margot, Agathe, Khadija, Waqas, Marie-Pierre, Cécile, Kerstin et mon stagiaire Armand.

Je souhaitais aussi dire un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir durant cette thèse :

- Mme Patricia Rousselle qui m'a très bien accueillie dans son laboratoire et a énormément contribué à l'obtention des résultats dans la partie « Sp36 » de ma thèse. Je voudrais aussi vous remercier pour la gentillesse et la patience que vous m'avez témoignées ainsi que pour tout ce que vous avez pu m'apprendre durant les expérimentations ainsi que lors de nos discussions. Merci à Cécile Garnier et Marine Montmasson pour leur gentillesse et de m'avoir enseignée la culture cellulaire ainsi que les tests de cytotoxicité. Merci à Eva Roig pour sa joie et ses sourires.
- Mr Christophe Grangeasse, Mr Sébastien Guiral et Anaïs Pelletier qui ont beaucoup contribué au projet en générant des mutants du pneumocoque et en effectuant les expériences de fluorescence.
- Adeline et Frédéric de la plateforme PSF qui ont réalisé les analyses en spectrométrie de masse. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions concernant la spectrométrie de masse. Merci aussi à Eric Diesis, Virginie Gueguen-Chaignon et à Damien Ficheux.
- La « Team Falson » : Pierre Falson, Vincent Chaptal, Sandrine Magnard, Hélène Cortay que j'ai eu la chance d'avoir comme professeur à l'Université et qui m'a offert mon premier stage dans un laboratoire de recherche, Véronica Zampieri, Jorgo Pata, Alicia Gobet, Rashad Nasr, Alexis Moréno et Josiane Kassis.
- La « Team RMN » : Marie-Laure Forgeron, Lauriane Lecoq, Roland Montserret qui m'a beaucoup aidé pour mes expériences de dichroïsme circulaire, Denis, Guillaume David et Aurélie Badillo.
- Les gestionnaires de MMSB sans qui j'aurais sombré dans les dédales des démarches administratives : Dorothée Bernard et Souad Boukoum ainsi que tous les membres de l'unité MMSB.
- Les membres de l'unité LBTI et plus particulièrement Mehwish ainsi que l'équipe de la maintenance (Nicolas et Lotfi)

Je remercie infiniment :

- Mes deux parents qui ont toujours été là pour moi et sans qui je ne serais jamais arrivée là où je suis.
- Mon petit frère Bira et ma petite sœur Kiné pour tous les moments de bonheur, de joie et d'entraide partagés ensemble.

- Tous les membres de ma famille pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté. Je ne saurais décrire l'émotion ressentie quand je vous ai vu arriver dans la salle pour assister à ma soutenance. Merci à toi papi chéri, tonton Issa, tata Gizel, ma petite sœur Mame Sokhna, papa et maman.

Je vous aime énormément. « *Khana di lenn nianal goudou fane akh weerr gou yaram li ngueine beugue ci senn khol ya leine ko kham, yalla na leine ko yalla mayyy* ».

- Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidées à préparer ma défense de thèse en prenant le temps d'écouter ma présentation orale et de me poser des questions pour m'entraîner notamment les membres de mon équipe, mon amie Adja et tata Aicha.
- Merci à toutes les personnes qui se sont déplacées pour assister à la soutenance.

Une pensée toute particulière pour toi, Mr Mon mari ; je ne vais pas faire un long paragraphe, je veux te dire merci d'être la personne que tu es, patiente, compréhensive et toujours là quand j'ai besoin de toi. Je remercie le bon Dieu de t'avoir mis sur ma route.

Et bien sûr, je n'oublie pas mes amis, merci pour tout.



# Résumé

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique qui affecte de nombreux pathogènes bactériens. Pour ralentir ce phénomène, des peptides antimicrobiens (PAMs), naturellement synthétisés et impliqués dans la défense immunitaire de différents organismes, est une approche thérapeutique prometteuse. Cependant, les bactéries présentent de nombreux mécanismes capables de contrecarrer l'action de ces peptides. L'un des mécanisme de résistance les plus importants implique une étroite collaboration entre un transporteur ABC et un système de régulation à deux composants (TCS). Pour comprendre le mécanisme de résistance aux PAMs chez *Streptococcus pneumoniae*, un important pathogène humain, nous avons identifié le TCS associé au transporteur ABC de PAMs. Le TCS01 en collaboration avec un transporteur ABC de type BceAB détecte et induit la résistance à des PAMs structurellement différents mais ciblant l'undécaprényl-pyrophosphate ou le lipide II, essentiels à la biosynthèse du peptidoglycane. Bien que les gènes codant le TCS01 et le transporteur BceAB ne soient pas adjacents, leurs délétions sensibilisent de la même manière *S. pneumoniae* aux mêmes PAMs. Nous avons montré par des expériences de fluorescence et de qPCR que le TCS01 régulait l'expression du transporteur BceAB. Afin de caractériser le mécanisme moléculaire du transporteur BceAB, nous l'avons surexprimé et purifié à partir d'*Escherichia coli*. Après la reconstitution en liposomes, le transporteur présente des activités ATPase et GTPase significatives qui sont stimulées par les PAMs substrats du système de résistance.

Mots clés : Résistance aux antimicrobiens, peptides antimicrobiens (PAMs), transporteurs ABC, systèmes de régulation à deux composants (TCS), BceAB, *Streptococcus pneumoniae*, activité ATPase

# Title and summary

## **Antimicrobial peptides resistance mechanism mediated by an ABC transporter coupled to a two-component system in *Streptococcus pneumoniae***

Antibiotic resistance is a growing threat to public health affecting many bacterial pathogens. To slow this phenomenon, antimicrobial peptides (AMPs), naturally synthesized and involved in immune defence of several organisms, are a promising therapeutic approach. However, bacteria present plenty mechanisms to thwart these peptides' action. One of the most important resistance mechanisms involves a close collaboration between an ABC transporter and a two-component regulatory system (TCS). To understand the mechanism of resistance to AMPs in *Streptococcus pneumoniae*, an important human pathogen, we identified the TCS associated with the ABC transporter of AMPs. TCS01 in collaboration with a BceAB-like ABC transporter detect and induce resistance to structurally-unrelated antimicrobial peptides but targeting undecaprenyl-pyrophosphate or lipid II, which are essential for peptidoglycan biosynthesis. Although the genes encoding TCS01 and the BceAB transporter are not located in the same gene cluster, the disruption of either of them equally sensitized *S. pneumoniae* to the same AMPs. We have shown by fluorescence and qPCR experiments that TCS01 regulates the expression of the BceAB transporter. To characterize the molecular mechanism of the BceAB transporter, we overexpressed and purified it from *Escherichia coli*. After reconstitution in liposomes, the transporter exhibits substantial ATPase and GTPase activities which are stimulated by the AMPs substrates of the resistance system.

Keywords : Antimicrobial resistance, Antimicrobial peptides (AMPs), ABC transporters, Two-component regulatory systems (TCS), BceAB, *Streptococcus pneumoniae*, ATPase activity

## Formation

- 2017 – 2021 : Doctorante en Biochimie à l'EDISS / Université Claude Bernard Lyon 1
- 2015 – 2017 : Master de Biochimie et Biologie moléculaire à l'Université Claude Bernard Lyon 1
- 2012 – 2015 : Licence de Biochimie à l'Université Claude Bernard Lyon 1

## Publications

- « Functional overexpression of membrane proteins in *E. coli* : the good, the bad and the ugly ». M. Di Cesare, A. M. Diagne, B. Bourgey, J. M. Jault and C. Orelle. (Methods Mol. Biol., sous presse)
- « Identification of a two-component regulatory system involved in antimicrobial peptide resistance in *Streptococcus pneumoniae* ». A. M. Diagne, A. Pelletier, C. Durmort, A. Faure, K. Kanonenberg, A. Page, F. Delorme, J. Vorac, L. Bellard, C. Vivès, F. Fieschi, T. Vernet, P. Rousselle, S. Guiral, C. Grangeasse, J. M. Jault and C. Orelle. (Article soumis)

## Communications scientifiques

- Mars 2020 : Poster « Antimicrobial peptide resistance mediated by an ABC transporter coupled to a two-component system in *Streptococcus pneumoniae* », Conférence sur les protéines ABC, Innsbruck (Autriche)
  - **Obtention d'une bourse de FEBS** pour participer au congrès
  - **Prix du meilleur poster**
- Mai 2019 : Présentation orale « **Resistance to antimicrobial peptide in *Streptococcus pneumoniae*** », GDR Membrane Proteins, Carqueiranne (France)
- Décembre 2018 : Présentation orale « **Resistance to antimicrobial peptide mediated by an ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*** », séminaire interne, département MMSB, Lyon (France)
- Octobre 2018 : Poster « **Mécanisme de résistance aux Peptides Antimicrobiens (PAMs) par un transporteur ABC chez *Streptococcus pneumoniae*** », Journée annuelle de l'école doctorale EDISS, Lyon (France)

## Financement

Cette thèse a été financée par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation entre le 1er Octobre 2017 et le 31 Décembre 2020.

## Laboratoire d'accueil de la thèse

Unité : Microbiologie Moléculaire et Biochimie Structurale, UMR5086

Equipe : ATPase / GTPase bactériennes : résistance aux antibiotiques et nouvelles enzymes

Responsable d'équipe : Jean-Michel JAULT

Adresse : 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon

# Résumé substantiel

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Pour lutter contre ce phénomène grandissant, de nouvelles approches thérapeutiques sont étudiées comme l'utilisation des peptides antimicrobiens (PAMs). Ces molécules sont naturellement synthétisées par de nombreux organismes pour lutter contre les pathogènes et les compétiteurs. Chez les humains, les PAMs représentent une importante part de la défense immunitaire innée. Cependant, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance spécifiques qui, le plus souvent impliquent des transporteurs ABC couplés à des systèmes de régulation à deux composants (TCS). Ces systèmes détectent la présence des PAMs puis activent l'expression des gènes codant le transporteur ABC à travers l'histidine kinase membranaire et le régulateur de réponse cytoplasmique, induisant une hausse du niveau de résistance de la bactérie. Cependant, le fonctionnement de ce système de détection/transport est peu caractérisé.

Dans cette thèse, le mécanisme de résistance aux peptides antimicrobiens médié par le transporteur SpABC et le système à deux composants SpTCS de la bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae* a été étudié. La première approche consiste en l'étude de la sensibilité des souches R6 et R800 (non pathogènes) et D39 (pathogène) sauvages (*wt*) et inactivées au niveau du transporteur ABC ( $\Delta spABC$ ) et du TCS ( $\Delta spTCS$ ). Ces expériences ont permis d'identifier le couple SpABC/SpTCS qui coopère pour induire la résistance aux PAMs ciblant l'undécaprényl pyrophosphate (UPP). En utilisant différentes méthodes notamment la quantification de l'expression génique de SpABC et SpTCS par qPCR, la suivie par fluorescence de l'expression de SpABC-GFP, la détection par Western blot et la quantification protéique par spectrométrie de masse, l'implication du couple SpABC/SpTCS dans la résistance aux PAMs a été établie.

En amont des gènes codant le transporteur SpABC, la présence d'un peptide de 36 acides aminés (Sp36) dans le même opéron que SpABC suggère que Sp36 serait sous le contrôle de SpTCS. Les expériences de survie cellulaire ont montré que ce peptide Sp36 avait un effet cytotoxique sur les cellules de poumon humain (A549 et 16HBE). Ce système constitué du transporteur SpABC, du système à deux composants SpTCS et de la toxine Sp36 pourrait constituer un unique système de défense et d'attaque impliqué dans la virulence de *S. pneumoniae*.

Le mécanisme moléculaire du transporteur SpABC est à ce jour inconnu. Afin de mieux comprendre ce système, le transporteur SpABC a été surexprimé dans des systèmes hétérologues (*E.*

*coli* et *L. lactis*), purifié à l'aide de détergents doux (LMNG, DDM et UDM) et fonctionnellement caractérisé dans les liposomes. Les activités ATPase/GTPase du transporteur SpABC mesurées en détergents et en liposomes montrent que ce dernier présente une activité d'hydrolyse significative en liposomes modulée par la présence des PAMs substrats.

A long terme, l'étude du mécanisme moléculaire régissant la résistance aux PAMs permettra la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre l'antibiorésistance.

## Table des matières

Remerciements .....	4
Résumé .....	8
Title and summary .....	9
Formation .....	10
Publications .....	10
Communications scientifiques.....	10
Financement .....	11
Laboratoire d'accueil de la thèse .....	11
Résumé substantiel .....	12
Liste des figures.....	21
Liste des tableaux .....	24
Abréviations .....	26
Partie I : Rappels bibliographiques.....	29
1. La résistance aux agents antimicrobiens, un problème majeur de santé publique.....	30
1.1. Contexte actuel .....	30
1.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	33
1.2.1. Modification ou Destruction de l'antibiotique .....	33
1.2.2. Modification de la cible de l'antibiotique.....	33
1.2.3. Limiter la pénétration des molécules antibiotiques .....	34
1.2.4. Pompes à efflux .....	34
1.3. Pathogènes bactériens : l'exemple de <i>Streptococcus pneumoniae</i> ( <i>S. pneumoniae</i> ) .....	36
1.3.1. Bref historique du pneumocoque.....	37
1.3.2. Caractéristiques générales .....	37
1.3.3. Pathogénicité du pneumocoque .....	41
1.3.4. Antibiorésistance de <i>S. pneumoniae</i> .....	43
2. Les Peptides AntiMicrobiens (PAMs) : une lueur d'espoir ?.....	47
2.1. Généralités sur les PAMs .....	47
2.2. Classification des PAMs.....	48
2.2.1. Classification selon l'origine .....	48
2.2.2. Classification selon les organismes cibles .....	50
2.2.3. Classification selon la charge, la structure et la composition en acides aminés .....	51
2.3. Mode d'action des PAMs .....	54
2.3.1. Perméabilisation de la membrane cellulaire .....	54
2.3.2. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.....	59
2.3.3. Cibles intracellulaires .....	63

2.4.	Mécanismes de résistance aux PAMs.....	64
2.4.1.	Modification de la surface des cellules bactériennes.....	65
2.4.2.	Modification de la structure des molécules cibles.....	65
2.4.3.	Production de protéases et formation de biofilms.....	66
2.4.4.	Utilisation de pompes à efflux.....	66
2.4.5.	Import et dégradation intracellulaire.....	67
3.	Les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette).....	67
3.1.	Architecture générale d'un transporteur ABC.....	68
3.1.1.	Les domaines transmembranaires (TMD).....	69
3.1.2.	Les domaines de liaison aux nucléotides (NBD).....	70
3.2.	Différents types de transporteurs ABC.....	73
3.2.1.	Les importateurs.....	74
3.2.2.	Les exportateurs.....	76
3.2.3.	Les mécanotransmetteurs.....	77
3.3.	Mécanismes de transport des transporteurs ABC.....	77
3.3.1.	Le modèle « ATP Switch ».....	78
3.3.2.	Le modèle contact constant.....	78
4.	Les systèmes de régulation à deux composants (TCS).....	79
4.1.	Généralités sur les systèmes de régulation à deux composants.....	80
4.1.1.	Histidine Kinase (HK).....	81
4.1.2.	Régulateur de Réponse (RR).....	83
4.2.	Fonctions régulées par les TCS de <i>S. pneumoniae</i> .....	85
4.2.1.	Compétence.....	87
4.2.2.	Production de PAMs.....	88
4.2.3.	Expression des facteurs de virulence.....	89
4.2.4.	Stabilité de la membrane et résistance aux antimicrobiens.....	89
4.2.5.	Réponse au stress environnemental.....	90
4.2.6.	Absorption des nutriments.....	91
5.	Les transporteurs de peptides antimicrobiens.....	93
5.1.	Généralités et classification des transporteurs de PAMs.....	93
5.1.1.	Le groupe SunT.....	93
5.1.2.	Le groupe LanFEG.....	94
5.1.3.	Le groupe NisT.....	94
5.1.4.	Le groupe BcrAB.....	95
5.1.5.	Le groupe BceAB.....	96
5.2.	Le système de résistance BceRS-AB.....	97



5.2.1.	Chez <i>B. subtilis</i> .....	97
5.2.2.	Chez <i>S. aureus</i> .....	99
5.2.3.	Chez d'autres <i>Firmicutes</i> .....	101
5.2.4.	Chez <i>S. pneumoniae</i> .....	103
6.	Organismes modèles d'étude de la virulence de <i>S. pneumoniae</i> .....	104
6.1.	Modèles animaux vertébrés .....	105
6.1.1.	Souris .....	105
6.1.2.	Rat .....	106
6.1.3.	Lapin et autres rongeurs .....	106
6.1.4.	Porc .....	107
6.1.5.	Primates non humains .....	107
6.2.	Modèles animaux invertébrés .....	107
6.2.1.	<i>Galleria mellonella</i> ( <i>G. mellonella</i> ) .....	107
6.2.2.	Drosophile .....	109
6.2.3.	<i>Caenorhabditis elegans</i> ( <i>C. elegans</i> ) .....	109
7.	Outils nécessaires à l'étude des protéines membranaires .....	110
7.1.	Systèmes d'expression .....	110
7.1.1.	Expression chez <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	111
7.1.2.	Expression chez <i>Lactococcus lactis</i> ( <i>L. lactis</i> ) .....	115
7.2.	Extraction .....	116
7.2.1.	Utilisation des détergents .....	116
7.2.2.	Utilisation des amphipoles .....	120
7.2.3.	Utilisation des SMALPs .....	120
7.3.	Fonctionnalité .....	121
7.3.1.	Liposomes .....	121
7.3.2.	Nanodisques .....	125
	Objectifs de la thèse .....	127
	Partie II : Matériel et Méthodes .....	129
1.	Analyses bio-informatiques .....	130
1.1.	Recherche par pBlast .....	130
1.2.	Alignement de séquences .....	130
2.	Microbiologie .....	131
2.1.	Souches bactériennes utilisées .....	131
2.2.	Conditions de croissance des bactéries utilisées .....	131
2.3.	Détermination de la sensibilité du pneumocoque aux PAMs .....	132
2.4.	Construction et expression de SpABC fusionné à la protéine GFP .....	132

2.5. Numération de <i>S. pneumoniae</i> .....	132
2.6. Infection de <i>G. mellonella</i> avec des souches de <i>S. pneumoniae</i> .....	133
2.7. Survie des souches de <i>S. pneumoniae</i> en stress acide et oxydant.....	133
2.8. Souches utilisées pour l'expression du transporteur SpABC .....	134
2.9. Milieux de culture utilisés pour l'expression du transporteur SpABC.....	135
2.10. Préparation de bactéries compétentes.....	136
2.11. Transformation des bactéries compétentes .....	136
3. Biologie moléculaire .....	136
3.1. Plasmides utilisés pour l'expression des protéines.....	136
3.2. Génération des mutants glutamate de SpABC par mutagenèse dirigée.....	138
3.3. Génération du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC sans étiquette histidine.....	140
4. Biochimie .....	142
4.1. Quantification de l'expression génique de <i>SpABC</i> et <i>SpTCS</i> par qPCR.....	142
4.2. Méthodes de dosage des protéines.....	143
4.2.1. Détermination de la quantité de protéines totales par un dosage au BCA.....	143
4.2.2. Détermination de la concentration de protéines purifiées par un dosage de Bradford .....	144
4.3. Expression de SpABC dans <i>E. coli</i> .....	144
4.3.1 Expression .....	144
4.3.2. Préparation et purification des vésicules de membranes inversées .....	144
4.3.3. Contrôle de la surexpression du transporteur par SDS-PAGE .....	145
4.3.4. Détection de SpABC par Western blot avec un anticorps anti-étiquette histidine .....	146
4.3.5. Tests d'expression de SpABC dans d'autres souches d' <i>E. coli</i> (DE3).....	146
4.3.6. Tests d'expression de SpABC sans l'étiquette histidine .....	147
4.4. Purification du transporteur SpABC.....	147
4.4.1. Solubilisation.....	147
4.4.2. Purification sur une colonne Ni-NTA.....	149
4.5. Analyses fonctionnelles du transporteur SpABC .....	150
4.5.1. Préparation des liposomes .....	150
4.5.2. Purification des liposomes par gradient de sucrose .....	151
4.5.3. Mesure de l'activité ATPase et GTPase du transporteur SpABC .....	152
4.6. Les protéoliposomes sont-ils imperméables ?.....	154
4.6.1. Préparation de la 6-carboxyfluorescéine .....	154
4.6.2. Préparation des liposomes ayant incorporé la carboxyfluorescéine .....	155
4.6.3. Purification des liposomes ayant incorporé la carboxyfluorescéine et mesure de la fluorescence .....	155
4.6.4. Tests de transport sur SpABC .....	155

4.7. Expression de SpABC dans <i>L. lactis</i> .....	157
4.7.1. Expression .....	157
4.7.2. Préparation et purification des vésicules de membranes inversées .....	157
4.7.3. Sensibilité des bactéries <i>L. lactis</i> exprimant SpABC aux peptides antimicrobiens.....	157
5. Analyses protéomiques.....	158
5.1. Préparation des échantillons .....	158
5.2. Extraction des protéines totales .....	159
5.3. Détermination du protéome de <i>S. pneumoniae</i> par spectrométrie de masse (SM) .....	159
6. Etude biochimique du peptide Sp36.....	160
6.1. Dichroïsme circulaire .....	160
6.2. Sensibilité des bactéries au peptide Sp36 .....	161
6.3. Détection de Sp36.....	161
6.3.1. Par un anticorps anti-Sp36.....	161
6.3.2. Par interaction de Sp36 avec l'héparine .....	162
6.3.3. Par spectrométrie de masse.....	165
7. Biologie cellulaire .....	166
7.1. Les lignées cellulaires.....	166
7.1.1. Cellules A549 .....	166
7.1.2. Cellules 16HBE.....	166
7.2. Culture cellulaire .....	166
7.2.1. Décongélation des cellules .....	166
7.2.2. Conditions de culture.....	167
7.2.3. Comptage des cellules .....	167
7.2.4. Congélation des cellules .....	168
7.3. Test de cytotoxicité : le test XTT .....	169
7.4. Visualisation des cellules au microscope optique .....	170
Partie III : Résultats et Discussion.....	171
1. Etude de la fonction du couple BceAB-RS de <i>S. pneumoniae</i> .....	172
1.1. Un TCS du pneumocoque potentiellement impliqué dans la résistance aux peptides antimicrobiens	172
1.2. Le couple BceAB-RS de <i>S. pneumoniae</i> est impliqué dans la résistance aux PAMs.....	178
1.2.1. Fonction de SpABC et SpTCS dans la résistance aux PAMs.....	178
1.2.2. Rôle de SpTCS dans la stimulation de la transcription des gènes codant SpABC .....	182
1.2.3. Expression des protéines dépendantes de SpTCS .....	186
1.2.4. Complémentation du couple SpABC/SpTCS.....	189
2. Implication du couple SpABC/SpTCS dans la virulence du pneumocoque.....	195

2.1. Etude de la virulence chez <i>G. mellonella</i> .....	195
2.2. Importance du couple SpABC/SpTCS dans la survie de <i>S. pneumoniae</i> .....	198
2.3. Sp36, un peptide de fonction inconnue .....	200
2.3.1. Un peptide codé dans l'opéron <i>SpABC</i> .....	200
2.3.2. Sp36 est-il un peptide antimicrobien ? .....	203
2.3.3. Sp36 est-il une toxine ? .....	205
2.3.4. Détection du peptide Sp36.....	207
3. Discussion et Perspectives.....	212
3.1. Spécificité de substrats du couple SpABC/SpTCS.....	212
3.2. Régulation du système SpABC/SpTCS.....	214
3.2. Rôle du système SpABC/SpTCS dans la virulence de <i>S. pneumoniae</i> .....	215
3.3. Modèle de fonctionnement du système de résistance aux PAMs médié par le couple SpABC/SpTCS chez <i>S. pneumoniae</i> .....	217
4. Etude biochimique du transporteur ABC .....	219
4.1. Expression, Purification et Fonctionnalité de SpABC dans les souches d' <i>E. coli</i> .....	220
4.1.1. Tests d'expression de SpABC dans les souches BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), C44(DE3) et C45(DE3).....	220
4.1.2. Expression du transporteur SpABC dans la souche BL21(DE3) .....	222
4.1.3. Solubilisation et Purification du transporteur SpABC avec différents détergents.....	224
4.1.4. Activité ATPase du transporteur SpABC purifié avec différents détergents .....	225
4.2. Optimisation de l'étude biochimique du transporteur SpABC.....	229
4.2.1. Optimisation de la solubilisation de SpABC .....	229
4.2.2. Optimisation de la purification du transporteur SpABC .....	230
4.2.3. Expression et Purification du transporteur SpABC dans la souche C43 $\Delta$ <i>acrAB</i> $\Delta$ <i>ompF</i> .....	231
4.3. Caractérisation de la fonctionnalité du transporteur SpABC.....	233
4.3.1. Activités ATPase et GTPase.....	233
4.3.2. Activité de transport .....	241
4.4. Expression et Fonctionnalité de SpABC dans <i>L. lactis</i> .....	245
4.4.1. Expression de SpABC dans <i>L. lactis</i> .....	245
4.4.2. Fonctionnalité de SpABC dans <i>L. lactis</i> .....	246
5. Discussion et Perspectives.....	247
5.1. Production de SpABC fonctionnel : un long parcours semé d'embûches.....	247
5.1.1. Expression hétérologue de SpABC .....	247
5.1.2. SpABC est-il un transporteur ABC qui ne transporte pas ? .....	248
5.2. Caractérisation fonctionnelle de SpABC.....	250
5.2.1. Purification et activité d'hydrolyse de SpABC .....	250
5.2.2. ATP et/ou GTP : quelle énergie pour le fonctionnement de SpABC ? .....	252

6. Conclusion.....	253
Partie IV : Annexes .....	255
Annexe 1 : Séquences des systèmes BceAB-BceRS de <i>B. subtilis</i> et <i>S. pneumoniae</i> .....	256
Annexe 2 : Protocole de l'analyse protéomique des souches R6 <i>wt</i> et R6 $\Delta$ <i>spTCS</i> .....	259
1. Digestion des échantillons .....	259
2. Marquage au TMT et fractionnement.....	259
3. Analyse LC-MS/MS .....	260
4. Analyse des données.....	260
Annexe 3 : Séquences des protéines exprimées .....	261
1. Protéines clonées dans le vecteur pRSFDuet-1 .....	261
2. Protéines clonées dans le vecteur pERL.....	261
Annexe 4 : Tableau des protéines significativement surexprimées ou sous-exprimées dans le protéome des souches R6 <i>wt</i> et R6 $\Delta$ <i>spTCS</i> traitées à la bacitracine .....	262
1. Expérience 1 .....	262
2. Expérience 2 .....	269
Annexe 5 : Tableau des protéines significativement surexprimées ou sous-exprimées dans le protéome des souches R800 <i>wt</i> et R800 $\Delta$ <i>hk</i> PcomX <i>hk</i> traitées à la bacitracine .....	276
Partie V : Références .....	294

# Liste des figures

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Chronologie retraçant l'utilisation de divers antibiotiques comme traitement thérapeutique et l'apparition des résistances</b> .....	32
<b>Figure 2 : Représentation schématique de pompes à efflux</b> .....	35
<b>Figure 3 : Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif (A) et à Gram négatif (B)</b> .....	38
<b>Figure 4 : Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram + et Gram -</b> .....	39
<b>Figure 5 : Facteurs de virulence de <i>S. pneumoniae</i></b> .....	41
<b>Figure 6 : Diversité de structures des PAMs</b> .....	53
<b>Figure 7 : Différents mécanismes d'action des peptides antimicrobiens</b> .....	54
<b>Figure 8 : Représentation schématique des modèles de perméabilisation des membranes cellulaires par les PAMs</b> .....	56
<b>Figure 9 : Structure de la gramicidine</b> .....	57
<b>Figure 10 : Structure primaire de la nisine</b> .....	58
<b>Figure 11 : Mode d'action de la nisine</b> .....	59
<b>Figure 12 : Structure de la bacitracine A</b> .....	60
<b>Figure 13 : Structure chimique du lipide II</b> .....	60
<b>Figure 14 : Schéma du cycle de biosynthèse du peptidoglycane et mécanisme d'action de la bacitracine</b> .....	61
<b>Figure 15 : Structure de l'actagardine</b> .....	62
<b>Figure 16 : Structure de la vancomycine et son interaction avec le motif D-Ala-D-Ala du peptidoglycane</b> .....	62
<b>Figure 17 : Différents mécanismes de résistance aux PAMs</b> .....	64
<b>Figure 18 : Structures tridimensionnelles de la glycoprotéine-P (A) en conformation « inward facing » (PDB 3G61) et de Sav1866 (B) en conformation « outward facing » (PDB 2HYD)</b> .....	69
<b>Figure 19 : Motifs conservés des NBDs visualisés sur la structure de MaIK du transporteur du maltose MaIEFGK2</b> .....	71
<b>Figure 20 : Les différents types de transporteurs ABC</b> .....	74
<b>Figure 21 : Modèle « ATP-switch » du mécanisme de transport d'un exportateur</b> .....	78
<b>Figure 22 : Modèle contact constant</b> .....	79
<b>Figure 23 : Représentation schématique d'un système à deux composants (TCS)</b> .....	81
<b>Figure 24 : Représentation schématique des mécanismes de détection des signaux par les HK</b> .....	82
<b>Figure 25 : Représentation génomique des TCS de <i>S. pneumoniae</i></b> .....	85
<b>Figure 26 : Schéma représentant le rôle des TCS du <i>S. pneumoniae</i> en réponse à des signaux environnementaux</b> .....	87
<b>Figure 27 : Familles de transporteurs de PAMs (SunT, LanFEG, NisT, BcrAB)</b> .....	96
<b>Figure 28 : Modèle de fonctionnement du module de résistance BceRS-AB</b> .....	99
<b>Figure 29 : Module contrôlant la détection de la bacitracine et de la nisine et leur résistance dans <i>S. aureus</i></b> .....	101
<b>Figure 30 : Module contrôlant la détection des PAMs et leur résistance chez <i>S. mutans</i></b> .....	103

Figure 31 : Les différents stades de l'infection de <i>G. mellonella</i> .....	109
Figure 32 : Système d'expression T7-Lac inducible par l'IPTG .....	113
Figure 33 : Mutations observées au niveau du promoteur lacUV5 et de l'opérateur lac des souches BL21 (DE3), C41 (DE3) et C43 (DE3) .....	114
Figure 34 : Fonctionnement des souches Lemo21 (DE3) .....	115
Figure 35 : Système d'expression protéique inducible par la nisine chez <i>L. lactis</i> .....	116
Figure 36 : Caractéristiques des détergents .....	117
Figure 37 : Structure de l'amphipol A8 – 35.....	120
Figure 38 : Extraction des protéines membranaires par des SMA .....	121
Figure 39 : Différents types de liposomes .....	122
Figure 40 : Courbe de déstabilisation des liposomes par ajouts progressifs de détergents .....	124
Figure 41 : Méthode de reconstitution des protéines purifiées dans les liposomes.....	125
Figure 42 : Préparation des nanodisques ayant incorporé les protéines d'intérêt .....	126
Figure 43 : Cartes des plasmides utilisés .....	138
Figure 44 : Principe de la mutagenèse dirigée selon le kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis.....	140
Figure 45 : Construction du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC sans étiquette histidine .....	142
Figure 46 : Mesure de l'hydrolyse de l'ATP grâce à un système enzymatique couplé .....	154
Figure 47 : La cellule de Malassez .....	168
Figure 48 : Analyse utilisée pour identifier le couple SpABC/SpTCS.....	173
Figure 49 : Prédiction de la topologie des TMDs de la sous-famille BceAB chez <i>B. subtilis</i> et <i>S. pneumoniae</i> .....	177
Figure 50 : Croissance des souches R6 WT, $\Delta$ SpABC, $\Delta$ SpTCS et $\Delta$ SpABC/ $\Delta$ SpTCS en absence et en présence de bacitracine .....	179
Figure 51 : Structures de différents PAMs substrats du système de résistance SpABC/SpTCS .....	182
Figure 52 : Quantification de l'expression de SpABC dans <i>S. pneumoniae</i> en présence de bacitracine (A) ou de vancomycine (B).....	184
Figure 53 : Analyse de la surexpression de SpABC-GFP dans <i>S. pneumoniae</i> traité à la bacitracine	185
Figure 54 : Volcano plots montrant les analyses protéomiques des souches R6 wt et $\Delta$ TCS en absence et en présence de bacitracine .....	188
Figure 55 : Analyse de l'expression de SpABC-GFP dans les souches R800 spABC-gfp, et spABC-gfp, $\Delta$ tcs01, PcomX rr*.....	191
Figure 56 : Volcano plots montrant les analyses protéomiques des souches R800 wt et $\Delta$ hk PcomX hk en absence et en présence de différentes concentrations de bacitracine.....	194
Figure 57 : Survie des larves de <i>G. mellonella</i> en fonction des inocula .....	196
Figure 58 : Taux de survie des <i>G. mellonella</i> après infection au cours du temps .....	197
Figure 59 : Survie de <i>S. pneumoniae</i> en milieu acide.....	199
Figure 60 : Organisation du début de l'opéron SpABC.....	200
Figure 61 : Repliement du peptide Sp36 en présence d'eau ou de TFE .....	202
Figure 62 : Résistance des bactéries <i>S. aureus</i> RN4220, <i>B. subtilis</i> 168 et <i>E. coli</i> $\Delta$ acrAB/ $\Delta$ acrEF .....	204
Figure 63 : Survie des cellules A549 et 16HBE en présence des peptides Sp36 et « Sp36 scrambled »	206
Figure 64 : Visualisation des cellules A549 et 16HBE traitées avec les peptides Sp36 et « Sp36 scrambled » .....	207
Figure 65 : Détection du peptide Sp36 par Western blot.....	208
Figure 66 : Détection du peptide Sp36 via son interaction avec l'héparine .....	209
Figure 67 : Détection du peptide Sp36.....	210
Figure 68 : Sites d'action des PAMs substrats de SpABC .....	213
Figure 69 : Module de fonctionnement du système SpABC/SpTCS impliqué dans la résistance aux PAMs et dans la virulence .....	217

<b>Figure 70 : Différence entre les systèmes de résistance aux PAMs chez <i>S. pneumoniae</i> et d'autres firmicutes.....</b>	<b>219</b>
<b>Figure 71 : Tests d'expression de SpABC dans les souches d'<i>E. coli</i> BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), C44(DE3) et C45(DE3) (Di Cesare et al. Methods Mol. Biol., sous presse) .....</b>	<b>222</b>
<b>Figure 72 : Surexpression de SpABC WT et mutants dans la souche BL21(DE3) d'<i>E. coli</i>.....</b>	<b>223</b>
<b>Figure 73 : Solubilisation et Purification du transporteur SpABC WT en LMNG, DDM et UDM ....</b>	<b>225</b>
<b>Figure 74 : Activités ATPases du transporteur SpABC (WT et K48A) en détergents, en protéoliposomes et en présence de PAMs.....</b>	<b>226</b>
<b>Figure 75 : Profil de chromatographie d'exclusion stérique de SpABC purifié en LMNG .....</b>	<b>227</b>
<b>Figure 76 : Stabilité des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A au cours du temps.....</b>	<b>228</b>
<b>Figure 77 : Tests de solubilisation du transporteur SpABC WT en LMNG.....</b>	<b>229</b>
<b>Figure 78 : Optimisation de la purification des transporteurs SpABC WT, K48A et E170Q en LMNG .....</b>	<b>230</b>
<b>Figure 79 : Surexpression de SpABC WT et SpABC K48A dans la souche C43(DE3) <math>\Delta</math>acrAB <math>\Delta</math>ompF et Purification en LMNG .....</b>	<b>232</b>
<b>Figure 80 : Activité ATPase des transporteurs SpABC WT, K48A et E170 en LMNG et en protéoliposomes .....</b>	<b>234</b>
<b>Figure 81 : Purification des protéoliposomes par gradient de sucrose .....</b>	<b>234</b>
<b>Figure 82 : Activités ATPases des protéoliposomes SpABC WT et SpABC K48A après purification par gradient de sucrose.....</b>	<b>235</b>
<b>Figure 83 : Activités ATPases des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A en présence de PAMs substrats .....</b>	<b>236</b>
<b>Figure 84 : Activité ATPase des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A en présence de PAMs non transportés .....</b>	<b>237</b>
<b>Figure 85 : Test de perméabilité des liposomes par suivie de fluorescence.....</b>	<b>238</b>
<b>Figure 86 : Activités ATPases et GTPases de SpABC en LMNG et en protéoliposomes.....</b>	<b>240</b>
<b>Figure 87 : Mesure des activités ATPase et GTPase des protéoliposomes de SpABC WT suivant la concentration de nucléotides utilisée.....</b>	<b>241</b>
<b>Figure 88 : Expression de SpABC WT et SpABC K48A sans étiquette poly-histidine dans la souche BL21(DE3).....</b>	<b>242</b>
<b>Figure 89 : Tests de transport de SpABC WT et SpABC K48A sans étiquette histidine réalisé avec différentes températures .....</b>	<b>243</b>
<b>Figure 90 : SDS-PAGE des cellules entière de C43(DE3) <math>\Delta</math>acrAB <math>\Delta</math>macAB après les tests de résistance à la bacitracine .....</b>	<b>244</b>
<b>Figure 91 : SDS-PAGE des vésicules de membranes de C43 <math>\Delta</math>acrAB <math>\Delta</math>macAB .....</b>	<b>245</b>
<b>Figure 92 : Expression de SpABC WT et SpABC K48A dans les membranes de <i>L. lactis</i> .....</b>	<b>246</b>
<b>Figure 93 : Croissance des souches de <i>L. lactis</i> transformées avec SpABC WT et SpABC K48A .....</b>	<b>247</b>
<b>Figure 94 : Schéma du système de résistance BceAB-BceRS .....</b>	<b>249</b>
<b>Figure 95 : Schéma du mécanisme moléculaire permettant la sécrétion des substrats par la pompe à efflux MacAB-TolC .....</b>	<b>249</b>



# Liste des tableaux

## Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des pathogènes constituant une menace réelle par ordre de priorité .....	33
Tableau 2 : Caractéristiques des HK composant les TCS de <i>S. pneumoniae</i> .....	86
Tableau 3 : Caractéristiques des RR composant les TCS de <i>S. pneumoniae</i> .....	86
Tableau 4 : Nomenclature et fonction des TCSs et de RR14 de <i>S. pneumoniae</i> .....	93
Tableau 5 : Nomenclature des gènes codant le transporteur BceAB et le TCS BceRS dans différentes souches de <i>S. pneumoniae</i> .....	104
Tableau 6 : Structures et caractéristiques de quelques détergents .....	119
Tableau 7 : Noms et Codes UNIPROT protéines utilisées pour les BLAST et les alignements .....	130
Tableau 8 : Souches de <i>S. pneumoniae</i> utilisées pour l'étude in vivo du couple SpABC/SpTCS .....	131
Tableau 9 : Souches utilisées pour l'expression des protéines de l'étude .....	134
Tableau 10 : Composition des milieux de culture utilisés pour l'expression des protéines de l'étude .....	135
Tableau 11 : Plasmides utilisés pour l'expression des protéines de l'étude .....	137
Tableau 12 : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de SpABC .....	139
Tableau 13 : Liste des amorces utilisées pour introduire NcoI et EcoRI .....	140
Tableau 14 : Conditions utilisées lors des tests de solubilisation avec LMNG du transporteur SpABC .....	148
Tableau 15 : Pourcentage de détergent utilisé pour les étapes de solubilisation et de purification .....	150
Tableau 16 : Plan de la plaque 96 puits pour la réalisation du test ELISA .....	165
Tableau 17 : Résultats des recherches de Blastp dans <i>B. subtilis</i> en utilisant l'HK 01 de <i>S. pneumoniae</i> D39 comme référence .....	173
Tableau 18 : Résultats des recherches de Blastp dans <i>B. subtilis</i> en utilisant le RR 01 de <i>S. pneumoniae</i> D39 comme référence .....	174
Tableau 19 : Résultats des recherches de Blastp dans <i>S. pneumoniae</i> en utilisant les TMDs YvcS, YxdM et BceB de <i>B. subtilis</i> .....	174
Tableau 20 : Résultats des recherches de Blastp dans <i>S. pneumoniae</i> en utilisant les NBDs YvcR, YxdL et BceA de <i>B. subtilis</i> .....	175
Tableau 21 : Nomenclature des protéines BceRS et BceAB dans différentes souches de <i>S. pneumoniae</i> .....	175
Tableau 22 : Homologie de séquences entre différentes protéines de <i>S. pneumoniae</i> et <i>B. subtilis</i> .....	176
Tableau 23 : CMI de différents PAMs contre la souche R6 .....	180
Tableau 24 : CMI de différents PAMs contre la souche D39 .....	181
Tableau 25 : CMI de différents PAMs contre la souche R800 .....	181
Tableau 26 : Résistance de différentes souches R800 mutantes à la bacitracine .....	192
Tableau 27 : CMI de divers PAMs substrats contre la souche R800 $\Delta$ hk PcomX hk .....	193
Tableau 28 : Pourcentage de structures secondaires du peptide Sp36 en présence d'eau et de TFE ..	202
Tableau 29 : Rendement de purification de SpABC en fonction des détergents utilisés .....	225
Tableau 30 : Stimulation de l'activité ATPase des protéoliposomes de SpABC WT en présence de bacitracine .....	227
Tableau 31 : Rendements de purification de SpABC WT, SpABC K48A et SpABC E170Q en LMNG .....	231

<b>Tableau 32 : Rendement de purification en LMNG de SpABC WT et SpABC K48A exprimés dans la souche C43(DE3) <math>\Delta</math>acrAB <math>\Delta</math>ompF.....</b>	<b>232</b>
<b>Tableau 33 : CMI de la bacitracine contre la souche C43(DE3) <math>\Delta</math>acrAB <math>\Delta</math>macAB .....</b>	<b>244</b>

# Abréviations

<b>7-AAD</b>	Aminoactinomycine D
<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette
<b>AcrAB</b>	Acriflavine Resistance Protein A and B
<b>APS</b>	Persulfate d'ammonium
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>BCA</b>	Acide Bicinchoninique
<b>BceAB</b>	BaCitracin Efflux AB
<b>BmrA</b>	Bacillus Multidrug Resistance ATP
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CAT</b>	Chloramphenicol acetyltransferase
<b>CDC</b>	Center for Disease Control and Prevention
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
<b>CHAPS</b>	3-[(3-CHolamidopropyl)diméthylAmino]-1-PropaneSulfonate
<b>CMC</b>	Concentration Micellaire Critique
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DDM</b>	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranoside
<b>DHFR</b>	DiHydroFolate Reductase
<b>DHPS</b>	Deoxyhypusine Synthase
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagles Medium
<b>DMSO</b>	DiMéthylSulfOxyde
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DTT</b>	DiThioTréithol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>ECF</b>	Energy Coupling Factor
<b>EDTA</b>	Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid
<b>FC-12</b>	Fos Choline 12
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>HEPES</b>	N-[2-HydroxyEthyl]Piperazidin-N'-[2-EthanSulfonic acid]
<b>ICL</b>	IntraCellular Loop
<b>IPTG</b>	IsoPropyl- $\beta$ -D-Thio-Galactopyranoside
<b><math>k_{cat}</math></b>	Constante catalytique
<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>Km</b>	Constante de Michaelis –Menten
<b><i>L. lactis</i></b>	<i>Lactococcus Lactis</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LMNG</b>	Lauryl Maltose Neopentyl Glycol
<b>LmrA</b>	<i>Lactococcus</i> Multidrug Resistance
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MATE</b>	Multidrug And Toxic compound Extrusion
<b>MCS</b>	Multiple Cloning Site

<b>MDR</b>	MultiDrug Resistance
<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily
<b>MRP</b>	Multidrug Resistance-associated Protein
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADH</b>	NAD réduit
<b>NAG</b>	N-AcetylL-D-Glucosamine
<b>NBD</b>	Nucleotide Binding Domain
<b>NisK</b>	Nisin biosynthesis sensor protein NisK
<b>NisR</b>	Nisin biosynthesis regulatory protein NisR
<b>NTP</b>	Nucleotide TriPhosphate
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ON</b>	OverNight
<b>PA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PACE</b>	Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux
<b>PAGE</b>	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>PAM(s)</b>	Peptide(s) AntiMicrobien(s)
<b>P-BLAST</b>	Protein-Basic <i>Local Alignment Search Tool</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PE</b>	PhosphatidylEthanolamine
<b>PEP</b>	Phosphoenolpyruvate
<b>P-gp</b>	P-GlycoProtein
<b>PK</b>	Pyruvate Kinase
<b>P<sub>lac</sub></b>	Promoteur lactose
<b>PLP</b>	protéines de liaison à la pénicilline
<b>Psi</b>	Pound Square Inch
<b>PVDF</b>	PolyVinylidene DiFluoride
<b>RND</b>	Resistance Nodulation Division
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>Rpm</b>	Rotations par minute
<b>S</b>	Svedberg
<b><i>S. agalactiae</i></b>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. mutans</i></b>	<i>Streptococcus mutans</i>
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>SBP</b>	Substrate-Binding Protein
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>SirRH</b>	Stress-Induced Response
<b>SMA</b>	Styrene Maleic Acid
<b>SMALP</b>	Styrene-Maleic Acid Lipid Particles
<b>SMR</b>	Small Multidrug Resistance
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Fœtal
<b>TEMED</b>	N,N,N,N-TetraMethylEthylene Diamine
<b>TMD</b>	TransMembrane Domain
<b>Tris</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>Triton X-100</b>	Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether
<b>U</b>	Unité enzymatique
<b>UDM</b>	n-UnDécyl-β-Maltoside
<b>UPP ou C55-PP</b>	Undécaprényl-pyrophosphate
<b>v/v</b>	Volume/volume
<b>WT</b>	Wild type, sauvage

**XTT** Sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy6-nitro) benzène acide sulfonique hydraté  
**Zn<sup>2+</sup>** Ions Zinc

Partie I :

Rappels

bibliographiques

# 1. La résistance aux agents antimicrobiens, un problème majeur de santé publique

## 1.1. Contexte actuel

La découverte ainsi que l'administration thérapeutique des agents antimicrobiens pour le traitement des infections ont eu un impact majeur dans la médecine moderne, sauvant ainsi de nombreuses vies. En effet, cette découverte a permis de traiter des maladies jusqu'ici jugées pratiquement incurables telles que la tuberculose, la pneumonie, la septicémie et la syphilis.

L'« antibiose », introduit par le bactériologiste français Jean Paul Vuillemin en 1889, est le 1<sup>er</sup> terme utilisé pour décrire les propriétés inhibitrices de ces agents antimicrobiens (Foster et Raoult 1974). Ce phénomène n'était toutefois pas nouveau car il est reconnu depuis l'époque de l'Égypte antique où les Égyptiens appliquaient un cataplasme de pain moisi sur les plaies infectées en ignorant le lien entre les propriétés bactéricides de la moisissure et le traitement des maladies. Par la suite, le terme « antibiotique » proprement dit a été utilisé pour la 1<sup>ère</sup> fois par le microbiologiste américain Selman Waksman et ses collaborateurs en 1942. Il englobe toutes les substances naturellement produites par les bactéries et les champignons capables d'inhiber la croissance des microorganismes lorsqu'elles sont diluées. Cependant, le terme « antibiotique » a évolué et est appliqué actuellement à tous médicaments, indépendamment de son origine (naturelle, synthétique ou semi-synthétique), capables de tuer les bactéries ou d'inhiber leur croissance.

Toutefois, l'ère des antibiotiques modernes a débuté en 1928 lorsqu'un scientifique écossais nommé Alexander Fleming découvre accidentellement les propriétés bactéricides de la moisissure (Fleming 1929). En 1939, Howard Florey, Ernst Chain et Norman Heatley isolent la pénicilline (Gaynes 2017). A partir de ce moment, cette molécule est produite en masse pour traiter les infections. Elle a permis de soigner les infections bactériennes contractées par les soldats lors de la seconde guerre mondiale (Sengupta et al. 2013). De plus, les survivants du « Coconut Grove fire », une boîte de nuit qui a brûlé en 1942 à Boston, sont les premiers grands brûlés à être traités avec succès par la pénicilline (Lee et al. 2014).

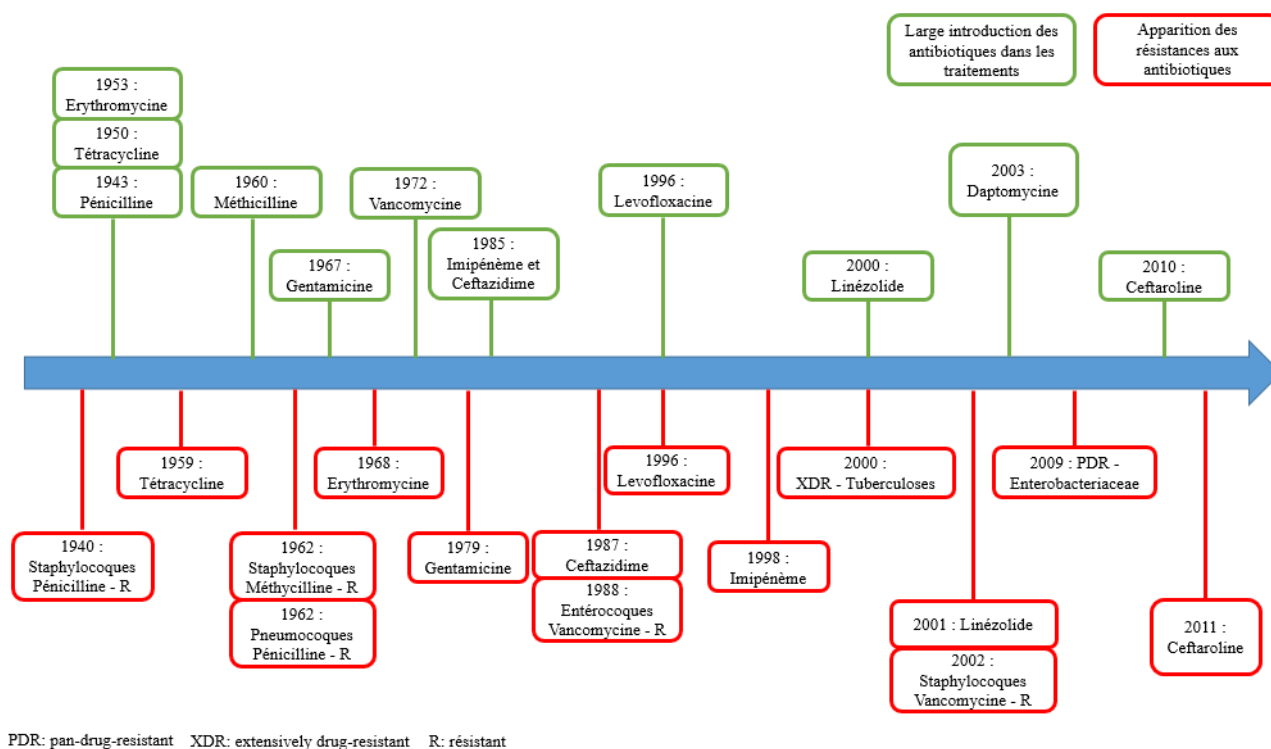
« Plus la quantité d'antibiotiques utilisée augmente, plus les bactéries résistantes ont des chances de dominer la population bactérienne ». Ces propos consignés dans le rapport du « Centre for Disease Dynamics Economics & Policy (CDDEP) » de 2015 (« The State of the World's Antibiotics, 2015 ») résumant parfaitement la situation actuelle. En d'autres termes, l'utilisation abusive et irraisonnée des antibiotiques a abouti à une émergence rapide de bactéries résistantes

rendant inefficaces ces molécules qui ont sauvé des millions de vies au cours des dernières décennies (Ventola 2015). En 1945, Fleming a déclaré qu'il n'était pas difficile de créer des microbes résistants à la pénicilline. Il suffit seulement de les exposer à des concentrations de pénicilline qui ne peuvent pas les tuer. Le même scénario survient aussi dans l'organisme. Dans beaucoup de pays, 80% des antibiotiques sont achetés et utilisés sans prescription pour les humains et l'élevage (Kotwani et Holloway 2011), accentuant ainsi ce phénomène de résistance aux antibiotiques qui cause de plus en plus de morts.

Aux Etats-Unis, « the Center for Disease Control and Prevention (CDC) » estime que plus de 2,8 millions de personnes sont atteintes d'une infection causée par un germe antibiorésistant et que plus de 35000 personnes en meurent chaque année. De l'autre côté de l'océan, le gouvernement britannique a commandé une étude de ce phénomène à un économiste, Lord Jim O'Neill. Ce dernier, aidé de son équipe, publie en 2014 un rapport suggérant qu'en 2050, le nombre de morts dans le monde dû à la résistance aux antimicrobiens pourrait atteindre plus de 10 millions chaque année. Cette même année, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en avant l'apparition d'une période post-antibiotique dans laquelle des infections courantes ainsi que des blessures mineures pourraient entraîner la mort. Cette réelle possibilité pouvant survenir au cours du 21<sup>ème</sup> siècle pose des risques considérables et inimaginables pour la santé humaine et animale (WHO 2014). D'après ces données alarmantes, l'OMS a classé la résistance aux antibiotiques en tant que problème majeur de santé publique.

Bien avant l'utilisation intensive de la pénicilline, certaines bactéries avaient la capacité de dégrader cette molécule (Abraham et Chain 1940). En effet, la nature a doté les bactéries de mécanismes d'adaptation aux changements de leur environnement. Ainsi, plus une bactérie est en contact constant et prolongé avec des molécules antibiotiques, plus elle s'adapte et devient résistante. Entre les années 1940 et 2000, de nombreux antibiotiques ont été découverts ou synthétisés. Mais, ce nombre diminue depuis, alors que les bactéries présentent de plus en plus des résistances aux antibiotiques (**Figure 1**).





**Figure 1 : Chronologie retraçant l'utilisation de divers antibiotiques comme traitement thérapeutique et l'apparition des résistances**

(D'après (Ventola 2015))

Cette antibiorésistance concerne de nombreux pathogènes bactériens et fongiques connus. En 2017, l'OMS a publié une liste de 12 pathogènes bactériens menaçant la santé humaine en les classant par ordre de priorité (**Tableau 1**) :

<b>Priorité critique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacter baumannii</i>, résistant aux carbapénèmes</li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, résistant aux carbapénèmes</li> <li>• <i>Enterobacteriaceae</i>, résistant aux carbapénèmes et produisant des <math>\beta</math>-lactamases à spectre étendu (ESBLs)</li> </ul>
<b>Priorité élevée</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Enterococcus faecium</i>, résistant à la vancomycine</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i>, résistant à la méthicilline et la vancomycine</li> <li>• <i>Helicobacter pylori</i>, résistant à la clarithromycine</li> <li>• <i>Campylobacter spp.</i>, résistant aux fluoroquinolones</li> <li>• <i>Salmonellae</i>, résistant aux fluoroquinolones</li> <li>• <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, résistant aux céphalosporines et aux fluoroquinolones</li> </ul>

<b>Priorité moyenne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus pneumoniae</i>, non sensible à la pénicilline</li> <li>• <i>Haemophilus influenzae</i>, résistant à l'ampicilline</li> <li>• <i>Shigella spp.</i>, résistant aux fluoroquinolones</li> </ul>
-------------------------	--

**Tableau 1: Classification des pathogènes constituant une menace réelle par ordre de priorité**

## 1.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les bactéries ont une génétique remarquable qui leur permet de s'adapter aux changements environnementaux et de faire face aux menaces telles que la présence des antibiotiques. Au contact des antibiotiques, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance sophistiqués.

### 1.2.1. Modification ou Destruction de l'antibiotique

Les bactéries peuvent modifier l'antibiotique pour empêcher sa fixation sur sa cible. Pour cela, la bactérie produit des enzymes capables d'ajouter des groupements chimiques sur l'antibiotique, rendant ce dernier incapable de se lier à sa cible. C'est le cas des aminoglycosides qui subissent des modifications grâce à l'action des « aminoglycoside-modifying enzymes » les rendant incapables de se fixer sur le site A du ribosome (Wright 2005).

Les bactéries peuvent aussi produire des enzymes capables de dégrader les antibiotiques. C'est le cas des  $\beta$ -lactamases sécrétées par les bactéries et qui ont la particularité de cibler le cycle  $\beta$ -lactame, détruisant notamment ainsi l'action des pénicillines et des céphalosporines (Wright 2005).

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

La modification de la cible des antibiotiques est un mécanisme mis en place par les bactéries pour contrer l'action antimicrobienne. Le remplacement du motif D-Alanine terminal de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane par un motif D-Lactate est un exemple concret, car cela empêche la fixation de la vancomycine, inhibant ainsi son action antibiotique (Gebhard 2012). Toujours dans la même optique, certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) produisent une nouvelle protéine liant la pénicilline (PBP2a) ayant une très faible affinité avec les antibiotiques  $\beta$ -lactames (Lowy 2003).

Les bactéries peuvent exprimer des méthylases codées par les gènes *emr* qui méthylent les ribosomes au niveau du site de fixation de certains antibiotiques tels que les macrolides, les lincosamides, les streptogramines B (Bozdogan et al. 2004; Del Grosso et al. 2007). En effet, pour résister aux macrolides, les bactéries utilisent les méthyltransférases de type Erm qui vont méthyler

l'ARN 23S du ribosome induisant ainsi une baisse de l'affinité du macrolide pour le ribosome (Bailey et al. 2008).

Les bactéries peuvent aussi changer la composition des cibles des antibiotiques en modifiant la charge de sa surface cellulaire. Face à des antibiotiques chargés positivement, les bactéries peuvent réduire la charge négative de la paroi bactérienne, entraînant ainsi une répulsion électrostatique induit par deux charges de même nature (Guilhelmelli et al. 2013).

### 1.2.3. Limiter la pénétration des molécules antibiotiques

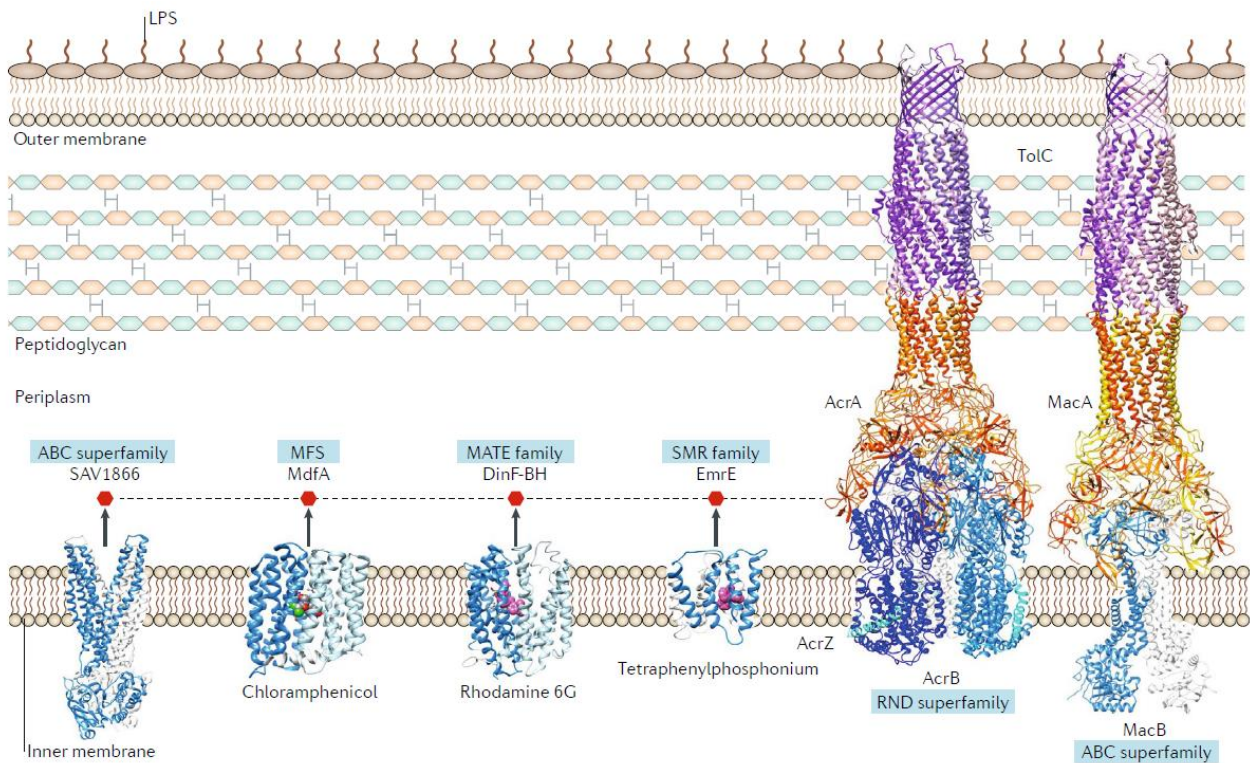
Une autre stratégie des bactéries consiste à limiter la pénétration des molécules antibiotiques.

Pour cela, les bactéries peuvent modifier la perméabilité de leur membrane externe en diminuant le nombre de porines présent ou en mutant les porines changeant ainsi leur sélectivité (Kumar et Schweizer 2005). Certaines entérobactéries deviennent résistants aux carbapénèmes en réduisant leur nombre de porines (Cornaglia et al. 1996). D'autres bactéries, telles que *Neisseria gonorrhoeae* présentent une mutation chromosomique sur le locus *penB* qui code pour une porine. Cette mutation induit la réduction de la perméabilité de la porine aux antibiotiques hydrophiles permettant ainsi à la bactérie de résister aux  $\beta$ -lactames et aux tétracyclines (Gill et al. 1998).

La formation de biofilm permet aussi aux bactéries de limiter la pénétration des molécules antibiotiques. L'épaisseur du biofilm due à la matrice polysaccharidique procure aux bactéries une protection contre les attaques de l'organisme hôte notamment les agents antibactériens (Acker et al. 2014). De ce fait, il faudrait de plus grandes concentrations d'antibiotiques pour avoir un résultat efficace. Toutefois, dans les biofilms, les bactéries ont tendance à adopter un métabolisme et une division cellulaire ralentis. Cela rend inefficace les antibiotiques ciblant ces processus (Mah 2012).

### 1.2.4. Pompes à efflux

Les bactéries présentent des pompes à efflux pour résister aux antibiotiques. Ils réduisent la concentration intrabactérienne des antibiotiques en les expulsant. Il existe différentes familles de pompes à efflux classées selon leurs structures et leurs sources d'énergie (**Figure 2**). On distingue :



**Figure 2 : Représentation schématique de pompes à efflux**

(Du et al. 2018)

- **Les transporteurs ABC** (ATP-Binding Cassette) : ils utilisent l'énergie procurée par l'hydrolyse de molécules d'ATP pour exporter ou importer des substrats. Ils transportent une large variété de substrats tels que des acides aminés, des ions, des polysaccharides, des antibiotiques, des molécules anticancéreuses, des protéines ... Ils sont généralement constitués de deux domaines transmembranaires (TMDs) et de deux domaines cytoplasmiques (NBDs) où se lient les nucléotides.
- **Les transporteurs MATE** (Multidrug And Toxic compound Extrusion proteins) : les transporteurs de cette famille utilisent les gradients de sodium  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{H}^+$  comme source d'énergie pour expulser entre autres des fluoroquinolones. En général, ces transporteurs comportent 12 à 14 hélices transmembranaires (TMs). La pompe NorM de *Vibrio parahaemolyticus* est le premier transporteur de cette famille à avoir été caractérisé (Morita et al. 2000).
- **Les transporteurs SMR** (Small Multidrug Resistance proteins) : les transporteurs de cette famille sont très hydrophobes et utilisent la force proton-motrice pour expulser une gamme réduite de substrats tels que les cations lipophiles. Ils confèrent généralement la résistance aux  $\beta$ -lactames et aux aminoglycosides. C'est le cas de la pompe EmrE

d'*Escherichia coli* (*E. coli*) qui transporte la vancomycine, l'érythromycine et la tétracycline (Yerushalmi et al. 1995).

- **Les transporteurs MFS** (Major Facilitator Superfamily) : les transporteurs de cette famille utilisent le gradient électrochimique d'ions  $H^+$  ou  $Na^+$  pour transporter des antibiotiques tels que les macrolides ou les tétracyclines, des sucres, des métabolites et des anions. Le transport de ces substrats se fait par symport, uniport ou antiport. NorA, le transporteur de chloramphénicol et de fluoroquinolones de *Staphylococcus aureus* appartient à cette famille (Kumar et al. 2013).
- **Les transporteurs RND** (Resistance-Nodulation-Division) : les transporteurs de cette famille sont répandus chez les bactéries à Gram négatif et utilisent l'énergie fournie par le gradient de protons  $H^+$  pour expulser des substrats tels que les détergents, les métaux lourds, les solvants ... via un mécanisme antiport. Ils fonctionnent dans un système tripartite. C'est le cas de la pompe MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) qui permet à la bactérie de résister aux  $\beta$ -lactames, au chloramphénicol, à la tétracycline, quinolones...(Pesingi et al. 2019). La protéine AcrB, un représentant typique des transporteurs RND est associée à la protéine adaptatrice AcrA et la porine TolC pour permettre à la bactérie *E. coli* de résister à de nombreux composés tels que les antibiotiques (macrolides,  $\beta$ -lactames, fluoroquinolones, chloramphénicol, rifampicine ...), d'exporter des solvants organiques tels que l'hexane, le cyclohexane, l'heptane ..., des détergents (SDS et Triton X-100), des sels biliaires (Hobbs et al. 2012; Okusu et al. 1996).
- **Les transporteurs PACE** (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux) : Il s'agit d'une famille de transporteurs récemment décrite. Ils confèrent une résistance à une variété de biocides utilisés comme désinfectants et antiseptiques. Ces transporteurs sont hautement conservés dans des bactéries pathogènes à Gram négatif telles que *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* et *Klebsiella pneumoniae* (Hassan et al. 2018). AceI est la 1ère protéine décrite comme faisant partie de la famille PACE. Elle confère une résistance à la chlorhexidine en l'expulsant hors de la bactérie (Hassan et al. 2018). AceI présente une masse moléculaire et une prédiction de structures secondaires semblables aux transporteurs SMR (Du et al. 2018).

### 1.3. Pathogènes bactériens : l'exemple de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)

Au cours de l'histoire de l'humanité, les pathogènes bactériens ont été une cause majeure de maladie et de mortalité. Parmi ces organismes, *S. pneumoniae* communément appelé le pneumocoque

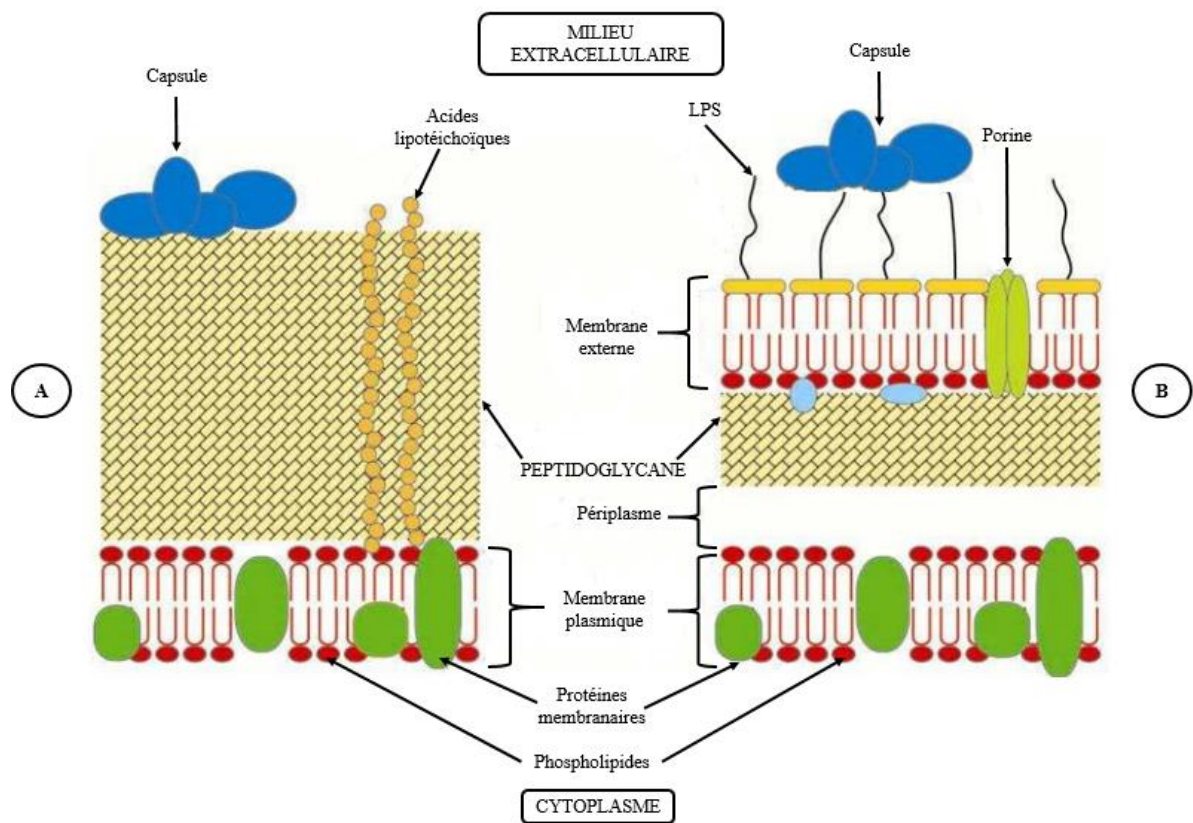
y tient une place privilégiée. Le pneumocoque est un pathogène humain majeur qui colonise les voies respiratoires supérieures et particulièrement le nasopharynx. Il est capable de s'adapter parfaitement à d'autres environnements tels que le sang, les articulations et le cerveau causant des affections bénignes telles que la sinusite ou l'otite et des infections graves comme la pneumonie, la septicémie et la méningite. Il constitue une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. En effet, le pneumocoque cause plus de 1,6 millions de morts chaque année dans le monde en ciblant particulièrement les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (Kadioglu et al. 2008).

### 1.3.1. Bref historique du pneumocoque

*S. pneumoniae* est une bactérie qui a été isolée et décrite indépendamment par deux scientifiques, Louis Pasteur et George Sternberg en 1881. A Paris, Pasteur a injecté à des lapins de la salive provenant d'enfants morts de la rage alors que Sternberg, en Amérique, a utilisé sa propre salive. Les deux chercheurs ont découvert des diplocoques dans le sang des lapins morts de l'infection bactérienne. Pasteur les a nommés « Microbe septicémique de la salive » alors que Sternberg a utilisé le terme *Micrococcus pasteuris* pour les décrire. Cinq années plus tard, Albert Fraenkel renomme ces bactéries « Pneumococcus » du fait de leur propension à causer des maladies pulmonaires. Entre 1920 et 1974, le nom de la bactérie est changé au profit de *Diplococcus pneumoniae*. Ce choix est dû au fait que la bactérie se présente sous forme d'une paire de coques accolées causant la pneumonie. Depuis 1974, le pneumocoque a été rebaptisé *Streptococcus pneumoniae* et ce nom perdure encore. Cette appellation est basée sur la caractéristique du pneumocoque à proliférer comme une chaîne de coques dans un milieu liquide.

### 1.3.2. Caractéristiques générales

*S. pneumoniae* est une bactérie à Gram positif encapsulée mesurant environ un micromètre. Elle comporte une paroi bactérienne qui joue un rôle de protection, donne à la bactérie sa morphologie finale et maintient la pression osmotique interne. Les bactéries à Gram positif dispose d'une membrane plasmique, d'une paroi composée d'une large couche de peptidoglycane et parfois d'une capsule. Par contre, la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée différemment. Elles disposent d'une membrane plasmique, d'un espace périplasmique surmonté d'une fine couche de peptidoglycane, d'une membrane externe et parfois d'une capsule (**Figure 3**). D'autres bactéries ne possèdent pas de paroi. C'est le cas des mycoplasmes qui produisent des stérols rendant leurs membranes cellulaires moins souples.



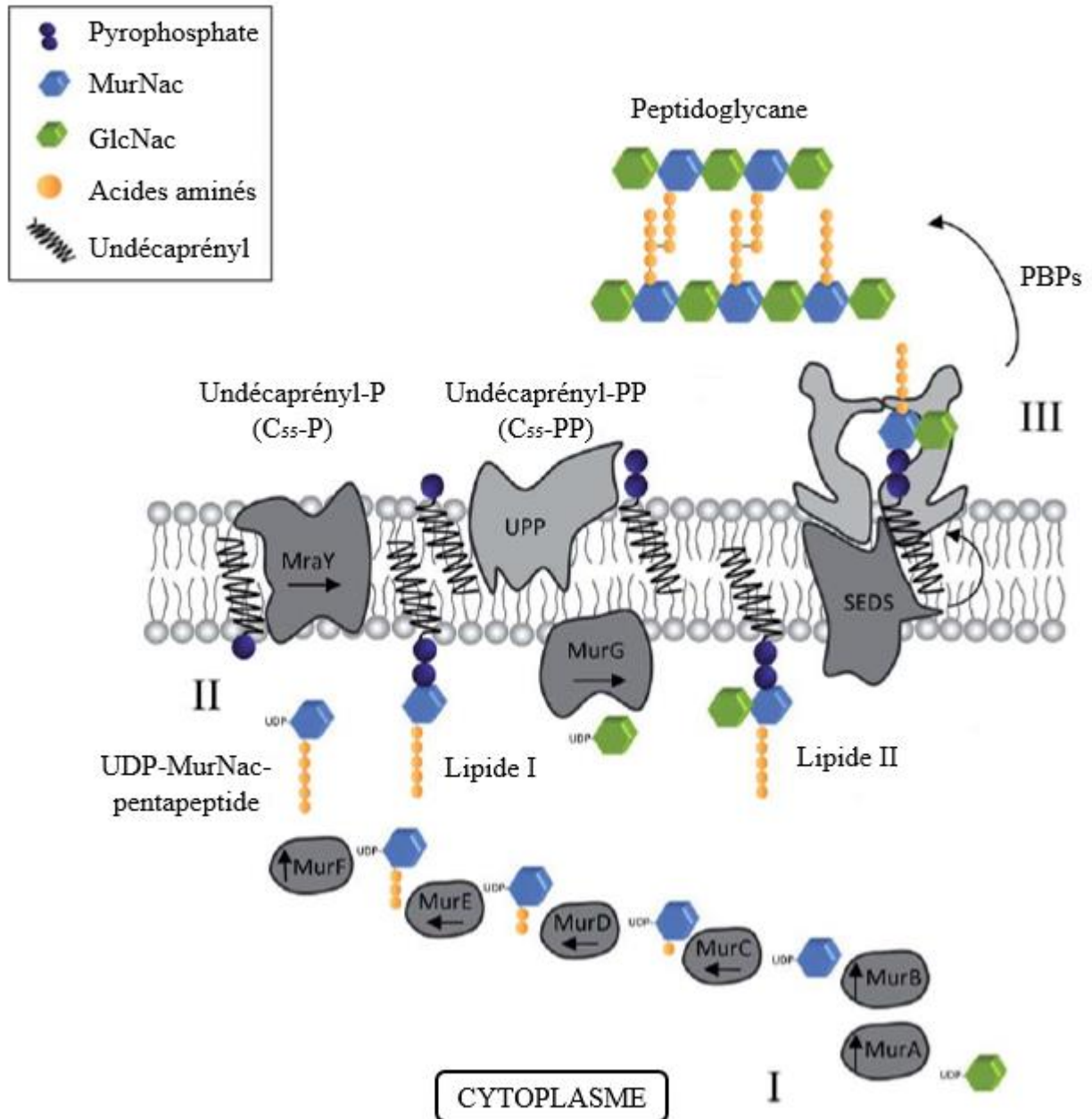
**Figure 3 : Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif (A) et à Gram négatif (B)**

(D'après le mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches de Cécile Morlot (Morlot 2017))

Cette différence entre les bactéries a été mise en évidence par la coloration de Gram. Cette technique, mise au point en 1884, utilise le cristal violet (aussi appelé violet de gentiane) pour colorer le cytoplasme des bactéries. Lors de l'étape de la décoloration avec l'alcool, les bactéries à Gram négatif possédant une fine couche de peptidoglycane sont perméables à l'alcool et présentent un cytoplasme décoloré. Par contre, les bactéries à Gram positif possédant une épaisse couche de peptidoglycane qui constitue une barrière imperméable à l'alcool ont un cytoplasme de couleur violette. Par la suite, les bactéries sont colorées de nouveau avec de la safranine ou de la fuchsine. Cette dernière étape permet de donner une teinte rosâtre aux bactéries à Gram négatif pour qu'elles soient visibles au microscope optique.

La synthèse de ce peptidoglycane est essentielle à la survie de la bactérie et se fait en plusieurs étapes. La 1<sup>ère</sup> étape permet la synthèse des précurseurs dans le cytoplasme qui sont par la suite rassemblés en disaccharide-pentapeptide (GlcNac-MurNac-L-Alanine-D-Glycine-L-Lysine-D-Alanine-D-Alanine). La 2<sup>ème</sup> étape s'effectue dans la membrane plasmique. Le monosaccharide-pentapeptidique (MurNac-L-Alanine-D-Glycine-L-Lysine-D-Alanine-D-Alanine) se lie à un phospholipide appelé undécaprényl-pyrophosphate pour former le lipide I. Par la suite, le N-

acétylglucosamine (GlcNac) est rattaché au lipide I pour former le lipide II. Lors de la 3<sup>ème</sup> étape, ce dernier est transféré du côté extracellulaire de la membrane plasmique où il s'attache à la chaîne glucidique de la paroi pré-existante. Des réactions de transpeptidation permettent aux différentes chaînes glucidiques d'être liées par des liaisons covalentes (**Figure 4**).



**Figure 4 : Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram + et Gram -**  
(Müller et al. 2017)

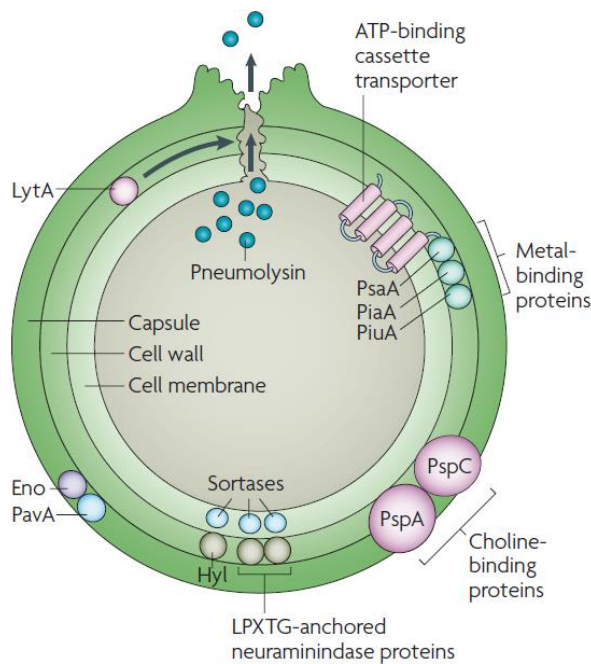


*S. pneumoniae* fait partie du phylum des *Firmicutes* qui englobent notamment les genres *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. La majorité des membres de ce phylum sont des bactéries à Gram positif dotées d'une faible quantité de bases guanine et cytosine (G+C) (Gebhard 2012). *S. pneumoniae* est une bactérie anaérobie/aérobie facultative qui peut survivre en conditions aérobies même si la condition anaérobie est optimale (Bridy-Pappas et al. 2005). Morphologiquement, le pneumocoque ne forme pas de spores. C'est un organisme non motile car dépourvu de flagelles mais possédant des pili. Du fait de sa capacité à oxyder l'hémoglobine et à causer l'alpha-hémolyse, le pneumocoque est facilement reconnaissable sur une gélose contenant du sang grâce à un halo brunâtre autour de chaque colonie. Grâce notamment à l'enzyme neuraminidase NanA située au niveau de la paroi bactérienne, le pneumocoque est capable de former des biofilms qui lui procurent un environnement protecteur (Allegrucci and Sauer, 2007; Chao et al., 2015; Wren et al., 2017). Déficient en catalase, une enzyme qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène, *S. pneumoniae* utilise ce peroxyde d'hydrogène comme agent bactéricide contre *S. aureus* qui colonise la même niche écologique (Regev-Yochay et al. 2006). Le mécanisme qui permet au pneumocoque de résister au peroxyde d'hydrogène est inconnu à ce jour. Toutefois, il a été montré que la pyruvate oxydase SpxB responsable de la production du peroxyde d'hydrogène endogène était nécessaire à la survie du pneumocoque exposé dans un environnement contenant 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pericone et al. 2003).

Il y a à ce jour 97 sérotypes qui ont été identifiés et caractérisés. Les différences observées sont basées sur la composition polysaccharidique de la capsule (Geno et al. 2015; Keller et al. 2016). Les génomes de certains de ces sérotypes ont été complètement séquencés. C'est le cas entre autres de la souche virulente TIGR4 (Tettelin et al. 2001), de la souche de laboratoire avirulente R6 (Hoskins et al. 2001; Lanie et al. 2007), de la souche 19F (Dopazo et al. 2001) et de la souche 11A (Chang et al. 2018). Des vaccins utilisant un certain nombre de sérotypes ont été élaborés. Le 1<sup>er</sup> vaccin, utilisé pour les enfants de moins de 2 ans, regroupe les 13 sérotypes qui causent 75 à 85% de tous les cas d'infections graves. Il s'agit d'un vaccin conjugué où les antigènes polysaccharidiques sont liés à une protéine non toxique dérivée de la toxine diphtérique. Un 2<sup>ème</sup> vaccin, produit en 1986, contenant 23 sérotypes est utilisé pour le traitement des personnes âgées ou immunodéprimées (Jackson et al. 2003). En effet, ce vaccin qui est polysaccharidique est peu immunogène chez les jeunes enfants, n'induit pas de mémoire immunitaire ni la diminution du taux de pneumocoques dans le nasopharynx. Malheureusement, à cause du grand nombre de sérotypes existant, il est impossible de se protéger de toutes les infections résultant du pneumocoque avec un seul vaccin (Robbins et al. 1983).

### 1.3.3. Pathogénicité du pneumocoque

*S. pneumoniae* est une bactérie commensale et opportuniste de l'Homme que l'on retrouve chez pratiquement 60% des individus sains (Mitchell 2003). Lorsqu'elle devient pathogène, la bactérie se propage au niveau des voies respiratoires inférieures et d'autres organes et tissus. En absence d'un fort système immunitaire pour endiguer la propagation du pneumocoque, cette situation atteindra le stade de la maladie (CDC 2019). A l'instar de nombreux autres pathogènes, *S. pneumoniae* produit des molécules qui peuvent être nocives pour l'organisme hôte. Ces molécules appelées toxines jouent un rôle très important dans la pathogénicité du pneumocoque.



**Figure 5 : Facteurs de virulence de *S. pneumoniae***  
(Kadioglu et al. 2008)

**LytA** : Autolysin A

**Eno** : Enolase

**PavA** : Pneumococcal adherence and virulence factor A

**PsaA** : solute-binding lipoprotein of manganese transporter

**PiaA** et **PiuA** : membrane-anchored substrate-binding protein

**PspA** et **PspC**: Pneumococcal Surface Protein A and B

l'opsonophagocytose médiée par les cellules immunitaires innées de l'hôte grâce à des interactions électrostatiques (Abeyta et al. 2003). Toutefois, une grande épaisseur de la capsule empêche le

Le pneumocoque possède de nombreux facteurs de virulence qui lui permettent d'adhérer aux cellules de l'hôte, de résister aux mécanismes de défense de l'hôte et d'envahir les cellules épithéliales (Jedrzejask 2001; Kadioglu et al. 2008) (**Figure 5**).

La **capsule polysaccharidique** est un des plus importants facteurs de virulence du pneumocoque (Hyams et al. 2010). Elle permet de différencier les sérotypes de *S. pneumoniae*. De plus, ces sérotypes sont indépendamment reconnus par l'organisme hôte et peuvent induire des mécanismes de réponse différents (Bogaert et al. 2004; Hackel et al. 2013). Entourant la bactérie, la capsule lui permet d'inhiber l'activation du complément et la reconnaissance par les immunoglobulines. De par sa charge négative due aux polysaccharides acides et aux phosphates, la capsule permet au pneumocoque d'échapper aux neutrophiles contenus dans le mucus nasal et de résister à

pneumocoque d'adhérer et d'envahir les cellules de l'hôte (Kadioglu et al. 2008). De ce fait, la bactérie, en contact avec les cellules épithéliales, réduit l'épaisseur de sa capsule permettant ainsi les interactions entre les protéines de la paroi et leurs récepteurs situés sur les cellules hôtes (Weiser et al. 2018). Lorsque la capsule est délétée ou mutée, la virulence du pneumocoque est atténuée (Gupta et al. 2013). C'est le cas de la souche R6 dérivée de la souche D39 pathogène. Du fait de la délétion de sa capsule polysaccharidique, la souche R6 est avirulente, ce qui rend son utilisation en laboratoire (de type P1) possible (Hoskins et al. 2001).

Les **composants de la paroi bactérienne** (peptidoglycane, acides téichoïques et acides lipotéichoïques) peuvent provoquer une réponse inflammatoire de l'hôte. Ils possèdent une partie phosphocholine (PCho) qui sert d'ancrage aux CBPs (Choline-Binding Proteins) (Fischer 2000). Ces CBPs sont très importants pour l'interaction hôte – pathogène car le pneumocoque les utilise pour échapper aux réponses immunitaires (Gosink et al. 2000).

La **pneumolysine** est une toxine cytoplasmique libérée lors de la lyse du pneumocoque. Elle se lie aux membranes pourvues de cholestérol et forme des pores conduisant à la lyse de la cellule hôte (Hotomi et al. 2016). La pneumolysine active le complément et module la production de chimiokines et de cytokines. De par sa capacité à induire la pro-inflammation, cette toxine améliore la chaîne de transmission de l'infection et augmente la virulence du pneumocoque (Zafar et al. 2017).

L'**autolysine** (LytA) est une enzyme produite par le pneumocoque. Elle dégrade le peptidoglycane en clivant le N-actétyl-muramoyl-L-alanine conduisant à la lyse suicide de la bactérie (Howard et Gooder 1974) et à la libération de la pneumolysine (Mellroth et al. 2012). Grâce à cela, l'autolysine est l'un des principaux acteurs de la virulence du pneumocoque.

Les **protéines de surface** du pneumocoque représentent un important groupe de protéines différentes situées à la surface de la bactérie et impliquées dans la virulence. Il s'agit entre autres de la protéine A, de la protéine liant la choline (CbpA), PsaA, LytB, LytC, CbpC, CbpG (Bergmann et Hammerschmidt 2006). Ces protéines agissent comme des adhésines et se lient aux récepteurs situés sur la membrane plasmique des cellules hôtes (IgA). Par cette action, ces protéines de surface permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Rosenow et al. 1997; Steel et al. 2013). De plus, le pneumocoque produit des protéases spécifiques aux récepteurs IgA sabotant ainsi les effets protecteurs de ces récepteurs. En effet, les IgA représentent une des 1ères lignes de défense de l'organisme face aux infections en inhibant l'adhésion des bactéries et des virus aux cellules épithéliales, en neutralisant les toxines et en éliminant les pathogènes et les antigènes (Janoff et al. 2014). L'énolase (Eno) et la protéine « pneumococcal adhesion and virulence A » (PavA) sont des adhésines situées à la surface du pneumocoque permettant de se lier respectivement à la

plasminogène et la fibronectine, des composants de la matrice extracellulaire. Lorsque ces deux protéines sont délétées ou mutées, une atténuation de la virulence du pneumocoque est constatée (Bergmann et al. 2001; Holmes et al. 2001). Les sortases sont des transpeptidases qui reconnaissent la séquence d'acides aminés LPXTG (X = acide aminé quelconque) à la surface des protéines. Elles jouent un rôle dans l'adhésion du pneumocoque aux cellules humaines ainsi que la colonisation du nasopharynx (Kharat et Tomasz 2003; Paterson et Mitchell 2006).

*S. pneumoniae* présentent d'autres facteurs de virulence. Les **pili** jouent un rôle dans l'adhérence et la colonisation des cellules épithéliales du nasopharynx. Ils inhibent aussi la phagocytose médiée par les cellules immunitaires de l'hôte. La **neuraminidase** est une enzyme liée à la paroi bactérienne capable de cliver les acides sialiques des lactoferrines empêchant ainsi son action bactéricide (Boekhorst et al. 2005). Elle catalyse la formation de biofilm qui permet au pneumocoque d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte, de faciliter la persistance et la dissémination de la bactérie. De plus, ce biofilm permet aussi à la bactérie de résister à certains antibiotiques. La **production de bactériocines** appelées pneumocines empêche la croissance des bactéries compétitrices et contribue à la colonisation de la niche écologique (Dawid et al. 2007). Les pneumocines sont des PAMs produites par le pneumocoque et codées au niveau du locus *blp*. Elles appartiennent à la classe des bactériocines de type II-B. Les peptides de cette classe sont constitués de deux peptides différents dont les gènes sont adjacents sur un même opéron (Nissen-Meyer et al. 2010). Elles sont synthétisées avec un peptide signal de 15 à 30 acides aminés reconnu par les transporteurs BlpAB et ComAB permettant la sécrétion des pneumocines (Wholey et al. 2019).

#### 1.3.4. Antibiorésistance de *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* est un important pathogène humain qui, malheureusement, présente de plus en plus de résistances à une variété d'antibiotiques.

##### 1.3.4.1. Résistance aux $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines représentent une large classe d'antibiotiques bactéricides pourvus d'un noyau  $\beta$ -lactame. Ce groupe englobe la pénicilline et ses dérivés, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase. Le mode d'action des  $\beta$ -lactamines consiste à se lier aux protéines PLPs (Protéines Liant les Pénicillines) qui sont essentielles à la biosynthèse du peptidoglycane, entraînant ainsi la mort de la bactérie.

Depuis son introduction dans les traitements médicaux, la pénicilline a été très efficace sur le pneumocoque. Malheureusement, en 1967, la 1<sup>ère</sup> souche de *S. pneumoniae* résistante à la pénicilline a été isolée à partir d'un patient australien (Appelbaum 2002). Ces souches résistantes présentent des

PLPs ayant une faible affinité pour la pénicilline et d'autres  $\beta$ -lactamines (Cornick et Bentley 2012). De ce fait, la présence de l'antibiotique n'interfère pas avec la synthèse du peptidoglycane (Nichol et al. 2002).

#### 1.3.4.2. Résistance aux macrolides

Les macrolides sont des antibiotiques bactériostatiques avec un spectre d'activité étroit. Ils possèdent des cycles de lactone associés à des sucres à structure normale ou aminée. Cette classe comprend entre autres l'érythromycine, la spiramycine, l'azithromycine et la clarithromycine. Le mécanisme d'action des macrolides consiste à se fixer sur la sous-unité 50S du ribosome bloquant ainsi la synthèse protéique par une obstruction du tunnel de sortie des polypeptides.

La résistance aux macrolides a été rapportée depuis les années 1980. Ces souches résistent en transportant les antibiotiques grâce à des pompes d'efflux ou à des enzymes modifiant une base de l'ARN 23S du ribosome, empêchant ainsi la fixation de l'antibiotique. Cette altération est médiée par des méthylases ribosomales codées par les gènes de la famille *emr* (Fyfe et al. 2016; Vázquez-Laslop et Mankin 2018). Les kétolidés sont des macrolides de dernière génération qui sont efficaces dans le traitement des infections dues aux souches de pneumocoque résistantes à la pénicilline (Zhanel et al. 2001).

#### 1.3.4.3. Résistance aux lincosamides

Les lincosamides sont une famille d'antibiotiques initialement produites par *Streptomyces lincolnensis*. La clindamycine, produite en 1967, est le seul antibiotique de cette classe à être utilisé dans le traitement des patients. C'est une molécule semi-synthétique dérivée de la lincomycine (Birkenmeyer et Kagan 1970). La clindamycine compromet la synthèse protéique en empêchant la réaction de transpeptidation. Pour cela, elle se lie à la sous-unité 50S du ribosome bactérien favorisant entre autres la dissociation du ribosome avec l'ARNt.

Structurellement, la clindamycine est différente des macrolides mais le pneumocoque utilise un mécanisme de résistance similaire aux macrolides pour contrer l'action de cet antibiotique : altération de la cible par une méthylase ribosomale codée par les gènes de la famille *erm*.

#### 1.3.4.4. Résistance aux quinolones

Découvert en 1962 par Leshner et ses collaborateurs, l'acide nalidixique isolé d'une préparation de chloroquine a permis de synthétiser par voie chimique les fluoroquinolones grâce à l'addition d'un groupement fluoré (Leshner et al. 1962). Cette classe d'antibiotiques non naturels englobe entre autres des molécules telles que la ciprofloxacine, la norfloxacine et la moxifloxacine qui inhibent l'action

de deux enzymes importantes dans la réplication de l'ADN chez la bactérie : l'ADN gyrase (topoisomérase II) et la topoisomérase IV. Ils présentent un large spectre d'activité. Cependant, en 2019, l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) a jugé, après réévaluation des risques indésirables graves induits par ces molécules chez les patients, de ne les prescrire que dans les cas où d'autres types d'antibiotiques ne peuvent être utilisés.

Le pneumocoque résiste aux fluoroquinolones par 3 mécanismes (Jones et al. 2010) :

- Mutations des gènes codant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV réduisant ainsi l'affinité de l'antibiotique pour ses cibles.
- Surexpression de pompes à efflux, notamment le transporteur ABC PatA-PatB (Smith et al. 2002).
- Acquisition de plasmides codant pour la protéine Qnr qui protège la cible (Jacoby et al. 2015).

Actuellement, la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones est faible. Toutefois, elle augmente de plus en plus.

#### 1.3.4.5. Résistance aux tétracyclines

Découverte en 1948, la tétracycline est une molécule antibiotique produite par des bactéries de type *Streptomyces* possédant 4 cycles alignés. Elle cible de nombreux microorganismes tels que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les chlamydies, les mycoplasmes et les rickettsies. Grâce à sa capacité à pénétrer dans les cellules eucaryotes, elle est particulièrement utilisée dans le traitement des infections résultant d'une bactérie parasite intracellulaire (Hoerauf et al. 1999). La tétracycline a un mode d'action bactériostatique. Elle se lie à la sous-unité 30S du ribosome bactérien, empêchant la fixation de l'ARNt et inhibant ainsi la synthèse protéique.

*S. pneumoniae* présente deux mécanismes pour résister à l'action de la tétracycline (Chopra et Roberts 2001; Dönhöfer et al. 2012) :

- Les pompes à efflux de la famille des MFS qui réduisent la concentration intrabactérienne en tétracycline.
- La protection des ribosomes par des RPPs (Ribosomal Protection Proteins) dont les mieux caractérisées sont TetM et TetO.

#### 1.3.4.6. Résistance aux triméthoprim-sulfaméthoxazole (TMP-SMX)

Le TMP-SMX encore appelé cotrimoxazole est une combinaison d'antibiotiques bactériostatiques: le triméthoprim et le sulfaméthoxazole, qui, utilisés ensemble, deviennent

bactéricides. Développé en 1968, ces deux molécules agissent synergiquement en bloquant deux enzymes bactériennes essentielles à la synthèse de l'acide folique qui permet la production des acides nucléiques (Burchall 1973). Le sulfaméthoxazole inhibe d'abord la dihydroptéroate synthétase (DHPS) puis le triméthoprim cible la dihydrofolate réductase (DHFR).

Au début des années 1980, les 1<sup>ers</sup> cas de résistance au TMP-SMX ont été décrits chez le pneumocoque. Cette résistance se présente par les mutations des gènes codant la DHPS et la DHFR qui permettent de réduire l'affinité de l'antibiotique pour ses cibles (Huovinen 2001).

#### 1.3.4.7. Résistance au chloramphénicol

Le chloramphénicol, isolé en 1947 de la bactérie *Streptomyces venezuelae*, est un antibiotique de la famille des phénicolés ayant une action bactériostatique. Il présente un spectre d'activité très large et est utilisé dans le traitement de la méningite du fait de leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (Nau, Sörgel, et Eiffert 2010). Le chloramphénicol se fixe sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien bloquant ainsi l'élongation de la chaîne peptidique.

La résistance du pneumocoque à cet antibiotique est médiée par l'acquisition du gène *cat* codant la chloramphénicol acétyltransférase. Cette enzyme catalyse la réaction permettant de produire des dérivés O-acétoxylés du chloramphénicol qui ont une faible affinité pour le ribosome (Dang-Van et al. 1978).

#### 1.3.4.8. Multi-résistance aux antibiotiques

Lorsque le pneumocoque est résistant à au moins 3 classes d'antibiotiques, il est considéré comme multi-résistant. En 1977, les 1<sup>ères</sup> souches multi-résistantes aux phénicolés (chloramphénicol), tétracyclines,  $\beta$ -lactamines (pénicilline), macrolides (érythromycine), clindamycine et triméthoprim-sulfaméthoxazole ont été isolées en Afrique du Sud (Jacobs et al. 1998). La résistance aux antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines semble être plus commune chez les souches de *S. pneumoniae* insensibles à la pénicilline (Butler et al. 1996; Hofmann et al. 1995).

Entre les années 1930 et 1960, de nombreux antibiotiques ont été découverts (pénicilline, tétracycline, érythromycine, méthicilline). Toutefois, l'apparition de souches bactériennes de plus en plus résistantes aux antibiotiques actuels, alliée à la difficulté de trouver de nouvelles molécules antibiotiques, représentent un grand problème de santé publique, nécessitant l'introduction d'approches innovantes (Aslam et al. 2018). L'une des alternatives prometteuses aux antibiotiques traditionnels est l'utilisation de peptides antimicrobiens (PAMs).

## 2. Les Peptides AntiMicrobiens (PAMs) : une lueur d'espoir ?

### 2.1. Généralités sur les PAMs

Les peptides antimicrobiens ont été découverts à la fin des années 1930 par le microbiologiste René Dubos qui a extrait d'une souche de la bactérie *Bacillus* un agent antimicrobien capable de protéger les souris d'une infection à pneumocoques (Dubos 1939). L'année suivante, avec la collaboration de Rollin Hotchkiss, Dubos a identifié deux peptides antimicrobiens appelés gramicidine et tyrocidine issus de *Bacillus brevis*. Au cours des années qui ont suivies, de nombreux PAMs ont été découverts. C'est le cas des défensines qui sont les premiers PAMs d'origine animale à être rapportés (Hirsch 1956). Dans les années 1970, Erspammer et ses collaborateurs ont montré que la peau des amphibiens était riche en peptides dotés d'activités antibactériennes, antivirales et antifongiques (Erspamer et Cei 1970). A la même période, des PAMs synthétisés par des plantes sont mis en évidence (Tam et al. 2015). Les découvertes de nouvelles sources de PAMs s'accélérent aux cours des décennies suivantes et actuellement, plus de 2500 peptides antimicrobiens d'origine naturelle ont été répertoriés dans la banque de données des peptides antimicrobiens (APD) (Wibowo et Zhao 2019).

Les peptides antimicrobiens sont des polypeptides naturellement synthétisés par tous les organismes notamment les bactéries, les champignons, les archées, les plantes, les animaux et les humains. Ces molécules ubiquitaires jouent un rôle très important dans la défense immunitaire innée de diverses espèces (Gupta et al. 2018) et dans le processus de colonisation d'une niche écologique par un organisme donné (Hassan et al. 2012). Ils affichent un large spectre d'action et ciblent les bactéries à Gram positif et/ou à Gram négatif, les champignons, les parasites, les virus (Hancock et al. 2006) ou les cellules cancéreuses (Schweizer 2009). La grande majorité des PAMs sont des peptides amphiphiles dont le nombre de résidus est inférieur à 100 acides aminés. Ces molécules sont souvent cationiques et présentent une charge globale positive due aux acides aminés basiques (arginine, lysine et histidine). Toutefois, il existe des PAMs anioniques découverts en 1997 (Brogden et al. 1997). Les PAMs sont codés sur des gènes inductibles par des facteurs externes spécifiques. L'utilisation des PAMs présentent de nombreux avantages tels que l'étendue de leurs spectres d'activité, leurs efficacités à faibles doses sur des bactéries multi-résistantes, leurs effets synergiques avec des antibiotiques traditionnels permettant de neutraliser des endotoxines et leurs grands potentiels d'action contre les biofilms et les bactéries persistantes. De plus, ils présentent relativement peu d'effets secondaires toxiques (Mahlapuu et al. 2016).



## 2.2. Classification des PAMs

Au cours des dernières années, de nombreux types de classification des PAMs ont vu le jour suivant l'évolution des découvertes. Ces classifications sont faites selon l'origine des peptides, leurs cibles mais aussi leurs charges, leurs structures et leurs compositions en acides aminés. Toutefois, à l'heure actuelle, un classement universel des PAMs n'a pas encore été établi.

### 2.2.1. Classification selon l'origine

Les premiers PAMs découverts ont été classés et nommés selon l'organisme qui les a produits. De ce fait, on observe plusieurs familles de PAMs.

#### 2.2.1.1. Défensines

Les défensines sont de petits peptides cationiques d'une masse moléculaire comprise entre 3 et 5 kDa. Riches en cystéines, ces peptides sont typiquement pourvus de 3 ponts disulfures intramoléculaires (Amerikova et al. 2019). Elles constituent une importante famille de PAMs synthétisée par les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages et les leucocytes. Retrouvées chez les mammifères, les insectes et les plantes, les défensines affichent une double fonction. Elles présentent une activité antimicrobienne en formant des pores au niveau de la membrane bactérienne, en ciblant le lipide II et en perturbant la machinerie intracellulaire des pathogènes telle que la réplication de l'ADN (ex : Human  $\alpha$ -Defensin 5 ou HD-5) ou la synthèse protéique (ex : Defensin Human Neutrophil Peptide-1 ou HNP-1) (Guilhelmelli et al. 2013). Elles peuvent aussi intervenir dans la réponse immunitaire innée en modulant la production de cytokines et de chémokines. Il existe trois types de défensines :  $\alpha$ -défensines,  $\beta$ -défensines et les  $\theta$ -défensines. Ces dernières sont retrouvées uniquement chez les primates non humains (Hazlett et Wu 2011). Les  $\alpha$ -défensines et les  $\beta$ -défensines diffèrent par la position de leurs ponts disulfures intramoléculaires (Oppenheim et al. 2003).

#### 2.2.1.2. Cathélicidines

Les cathélicidines représentent, comme les défensines, une importante famille de PAMs impliquée dans la défense immunitaire innée des organismes. Ce sont de petits peptides cationiques très diversifiés avec un pro-domaine commun nommé cathéline. Les cathélicidines sont synthétisées et conservées sous la forme de précurseurs inactifs. Lorsque l'organisme détecte un pathogène, le peptide signal des cathélicidines situé du côté N-terminal est clivé grâce à une élastase et les cathélicidines sont sécrétées sous la forme de peptides matures capable de remplir leurs fonctions. Outre leurs activités antimicrobiennes liées à la perméabilisation des membranes des pathogènes, les

cathélicidines déclenchent la sécrétion des médiateurs inflammatoires (Kościuczuk et al. 2012). Le peptide LL-37 est le membre le plus étudié de cette famille de PAMs et est actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. C'est un peptide humain de 37 acides aminés synthétisé par les macrophages et les leucocytes (Lee et al. 2011).

#### 2.2.1.3. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides bactériens avec un large spectre d'action. Elles jouent un rôle important dans la conquête de la niche écologique. Les bactériocines ciblent la membrane bactérienne en créant des pores conduisant à la mort de la cellule. Elles peuvent aussi inhiber l'activité enzymatique de certaines protéines bactériennes. Les bactériocines sont subdivisées en deux catégories. La catégorie I, appelée lantibiotique, est produite par un grand nombre de bactéries à Gram positif dont le genre *Streptococcus* et subit des modifications post-traductionnelles, notamment la formation de ponts thioéthers entre des acides aminés inhabituels tels que la lanthionine ou la méthyllanthionine. Ces ponts thioéthers stabilisent le peptide et le rendent moins sensibles aux peptidases (Yount et Yeaman 2013). Ces modifications jouent un rôle très important dans l'efficacité de l'activité antimicrobienne de ces peptides. L'une des bactériocines les mieux caractérisées de ce groupe est la nisine mais on y trouve aussi la duramycine, l'épidermine, la gallidermine, l'actagardine ou la mersacidine. La catégorie II est représentée par de petits peptides de moins de 10 kDa thermodynamiquement stables et ne présentant pas de modifications post-traductionnelles. Parmi ce groupe, on peut distinguer la pédiocine PA-1, l'entéroccine et la lactococcine.

Toutefois, les bactéries sont immunisées contre leurs propres bactériocines. Cette propriété est médiée par l'action de protéines d'immunité spécifique. C'est le cas de *Lactococcus lactis* qui produit la nisine et qui ne souffre pas de son action bactéricide (Cotter et al. 2005). NisI est une lipoprotéine située sur le côté extracellulaire de la membrane plasmique qui forme un complexe avec la nisine l'empêchant ainsi de se fixer sur sa cible. NisFEG est un transporteur ABC capable de détacher la nisine de la membrane plasmique (Stein et al. 2003).

#### 2.2.1.4. Peptides antimicrobiens non-ribosomaux

Il s'agit de peptides synthétisés par des complexes multi-enzymatiques appelés NRPSs (Non Ribosomal Peptide Synthetases). Ces peptides peuvent être cycliques ou branchés avec des acides aminés non usuels tels que les D - acides aminés. Ils peuvent aussi porter des modifications comme des glycosylations, acylations ou méthylations. Ce groupe comporte de nombreux membres tels que la bacitracine et d'autres comme la polymixine B, la vancomycine, la colistine qui sont utilisées en dernier recours dans le traitement contre des germes multi-résistants et (Zhang et Gallo 2016).

#### 2.2.1.5. Magainines

Les magainines représentent une classe de PAMs cationiques d'une vingtaine d'acides aminés que l'on retrouve sur la peau de grenouilles telles que *Xenopus laevis* (Zasloff 1987). Ils présentent des activités bactéricides et tumoricides. Déstructurés en milieu aqueux, ces peptides acquièrent une structure en hélices  $\alpha$  lorsqu'ils se fixent à leurs cibles. Ils perméabilisent la membrane plasmique induisant la mort cellulaire.

#### 2.2.1.6. Cécropines

Les cécropines sont des PAMs cationiques d'une trentaine d'acide aminés qui ont été tout d'abord découverts dans l'hémolymphe du papillon *Hyalophora cecropia* d'où son nom. Ils représentent une part importante de la défense des insectes. Les cécropines forment des pores dans la membrane plasmique en adoptant une structure en hélices  $\alpha$  (Silvestro et al. 2000).

### 2.2.2. Classification selon les organismes cibles

Les PAMs ont différentes cibles telles que les bactéries, les champignons, les virus, les parasites et les cellules cancéreuses. Cependant, un même PAM peut cibler plusieurs micro-organismes.

#### 2.2.2.1. Peptides antibactériens

Les peptides antibactériens ciblent souvent la membrane plasmique en formant des pores ou en inhibant la synthèse de la paroi mais peuvent aussi inhiber des procédés indispensables pour la cellule tels que la réplication de l'ADN ou la synthèse protéique.

#### 2.2.2.2. Peptides antifongiques

Les peptides antifongiques tels que la drosomycine, la polyoxine et l'histatine ciblent la membrane ainsi que les composants intracellulaires des champignons (Matejuk et al. 2010). Cependant, à la différence des bactéries, les membranes des champignons sont pourvues de chitine qui en est l'un des composants majeurs. Les peptides antifongiques ont souvent la capacité de se lier à cette chitine, leur permettant de déstabiliser la membrane (Pushpanathan et al. 2012).

#### 2.2.2.3. Peptides antiviraux

Les peptides antiviraux neutralisent les virus. Ils peuvent s'intégrer à l'enveloppe virale pour la déstabiliser rendant le virus incapable d'infecter la cellule hôte. Ils peuvent aussi se lier aux récepteurs situés à la surface des cellules hôtes réduisant ainsi l'affinité du virus pour sa cible. C'est

le cas des défensines qui se lient aux glycoprotéines du virus de l'herpès le rendant incapable de se fixer sur la cellule de l'hôte (Yasin et al. 2004).

#### 2.2.2.4. Peptides antiparasitaires

Les peptides antiparasitaires sont peu nombreux et ciblent les parasites en perforant leurs membranes cellulaires. Parmi eux, on distingue les dermaseptines actives contre *Plasmodium falciparum*, la cécropine A et la mélittine qui ciblent certaines espèces de *Leishmania* et les cathélicidines qui agissent sur *Trypanosoma brucei* (Pretzel et al. 2013).

#### 2.2.2.5. Peptides anticancéreux

Les peptides anticancéreux ciblent les membranes des cellules tumorales. Les membranes des cellules cancéreuses présentent une charge nette négative comparée aux cellules saines (Schweizer 2009). De ce fait, les peptides cationiques anticancéreux, par interactions électrostatiques, ciblent sélectivement les cellules tumorales. De plus, les membranes des cellules cancéreuses étant plus fluides que celles des cellules normales du fait de leur faible concentration en cholestérol, le passage des peptides cationiques est facilité. Parmi les peptides anticancéreux, on peut citer les cécropines et les magainines (Gaspar et al. 2013).

### 2.2.3. Classification selon la charge, la structure et la composition en acides aminés

Les PAMs peuvent être classés en plusieurs catégories basées sur leurs charges globales, leurs structures secondaires et leurs compositions en acides aminés.

Tout d'abord, on peut distinguer les peptides cationiques qui sont largement majoritaires et les peptides anioniques. Les PAMs cationiques présentent une charge positive globale qui favorisent leurs interactions avec les phospholipides anioniques de la membrane bactérienne (Epanand et Vogel 1999). Les PAMs anioniques, comme les PAMs cationiques, sont synthétisés par de nombreux organismes pour leur propre défense. Cette synthèse peut être ribosomale ou enzymatique. Ils ont un grand nombre d'acides aminés chargés négativement tels que les aspartates et les glutamates. On distingue les microcines chez les bactéries à Gram négatif, les bactéricones, les lantibiotiques chez les bactéries à Gram positif et les halocines chez les archées. Ces peptides anioniques présentent généralement un spectre d'activité restreint limité aux organismes proches de leurs producteurs. Beaucoup de PAMs anioniques utilisent des ions métalliques pour acquérir leur activité antimicrobienne (Huan et al. 2020). C'est le cas de la daptomycine qui est l'un des peptides les mieux caractérisés de cette catégorie. La daptomycine est synthétisée par *Streptomyces roseosporus* et

nécessite la présence d'ions calcium pour être fonctionnelle et cibler les bactéries à Gram positif (Miller et al. 2016). En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  permet la formation des oligomères de daptomycine, la rendant ainsi fonctionnelle et créant une forte concentration du peptide au niveau de la membrane cellulaire. Par la suite, les composants de l'environnement membranaire induisent la dissociation des oligomères entraînant l'insertion de la daptomycine dans la bicouche lipidique, la formation de pores et la dépolarisation de la membrane par l'efflux de potassium (Taylor et Palmer 2016). La microcine J25 (MccJ25) est l'une des mieux caractérisées. Elle est produite par *E. coli* puis exportée par le transporteur ABC McjD dont la structure a été résolue (Choudhury et al. 2014). Pour accéder au cytoplasme de la bactérie cible, MccJ25 détourne la voie de translocation médiée par les protéines FhuA – TonB – ExbBD ainsi que la protéine SbmA. Arrivée à l'intérieur de la bactérie, la microcine inhibe l'activité de l'ARN polymérase (Smits et al. 2020).

Les PAMs présentent différentes structures secondaires et des compositions en acides aminés variées. De plus, certains PAMs ne sont repliés qu'en présence de leurs cibles. En effet, lorsqu'ils ne sont pas liés à leurs cibles, ils ne présentent pas une structure définie. On peut distinguer plusieurs grandes classes : les PAMs en hélices  $\alpha$ , les PAMs en feuillets  $\beta$ , les PAMs en hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ , les PAMs à structures complexes, ou les PAMs ayant une forte proportion d'un acide aminé particulier (Koehbach et Craik 2019) (**Figure 6**).

#### 2.2.3.1. Les PAMs en hélices $\alpha$

La plupart des PAMs adoptent une structure en hélices  $\alpha$  lorsqu'ils sont en contact avec leurs cibles. Généralement, ils sont formés de moins de 40 acides aminés et ont un fort caractère amphiphile. Parmi cette classe, on distingue les cécropines des insectes, la mélittine du venin d'abeille, les cathélicidines dont le LL-37 (**Figure 6**) et les PAMs découverts chez les amphibiens tels que les magainines et la bombinine (Diamond et al. 2009).

#### 2.2.3.2. Les PAMs en feuillets $\beta$

Ce groupe est constitué de PAMs présentant plusieurs cystéines qui forment des ponts disulfures stabilisant ainsi la structure du peptide en feuillets  $\beta$ . On peut trouver jusqu'à 5 ponts disulfures dans ces peptides. On distingue particulièrement dans ce groupe les  $\alpha$ -défensines (Koehbach et Craik 2019) (**Figure 6**).

#### 2.2.3.3. Les PAMs avec hélices $\alpha$ et feuillets $\beta$

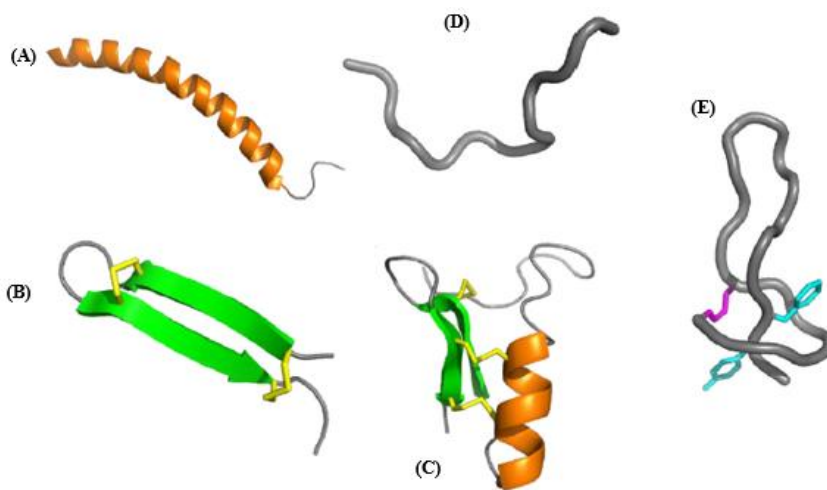
Certains PAMs présentent à la fois des structures en hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ . C'est le cas des  $\beta$ -défensines et de la phormicine (Koehbach et Craik 2019) (**Figure 6**).

#### 2.2.3.4. Les PAMs à structures complexes

Dans ce groupe, on distingue des PAMs cycliques tels que la bacitracine, des peptides qui peuvent aussi avoir des ponts thioéthers ou des ponts disulfures additionnels comme respectivement la nisine (qui est aussi cyclique) et la  $\theta$ -défensine. Certains peuvent présenter une structure en lasso où la chaîne latérale d'un acide aminé se lie à la chaîne polypeptidique formant ainsi un lasso. C'est le cas de la microcine J25 (**Figure 6**) et de la citrocine produite respectivement par *E. coli* et par des entérobactéries du genre *Citrobacter* (Cheung-Lee et al. 2019). D'autres PAMs subissent des modifications post traductionnelles.

#### 2.2.3.5. Les PAMs ayant une forte proportion d'un acide aminé particulier

Certains PAMs n'adoptent pas une structure tridimensionnelle particulière mais possèdent une forte proportion d'un type d'acides aminés dans leur séquence. Il peut s'agir d'acides aminés tels que la proline, la glycine, le tryptophane, l'arginine, la cystéine ou l'histidine. Dans ce groupe, on peut distinguer l'indolicidine riche en tryptophane (**Figure 6**), le PR-39 du porc riche en proline et en arginine ou l'histatine riche en histidine. Certains peptides peuvent être en plus O-glycosylés. C'est le cas des PAMs isolés des insectes notamment la drosocine synthétisée par la drosophile (Koebach et Craik 2019).



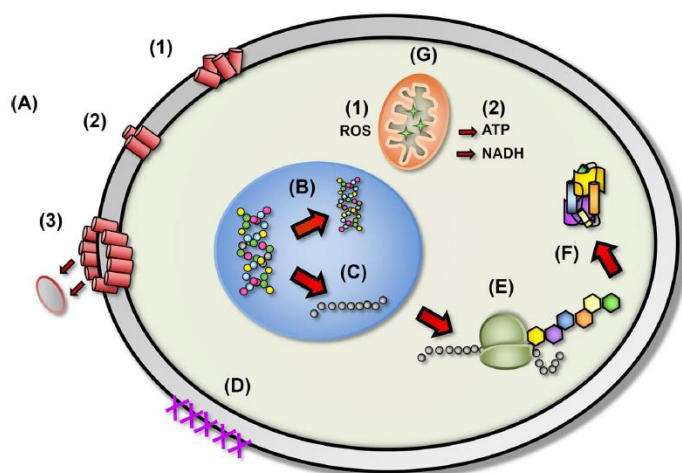
**Figure 6 : Diversité de structures des PAMs**

(D'après (Koebach et Craik 2019))

- (A) Structure en hélices  $\alpha$  (LL-37 ; ID PDB : 2K6O)
- (B) Structure en feuillets  $\beta$  (Gomésine ; 1KFP)
- (C) PAMs en hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  (Phormicine ; 1ICA)
- (D) PAMs riches en acide aminé particulier (Indolicidine ; 1G89)
- (E) Structure en lasso (Microcine J25 ; 1Q71)

## 2.3. Mode d'action des PAMs

Le mécanisme d'action classique des PAMs implique leur capacité à causer des dégâts au niveau de la membrane plasmique en formant des pores. Cependant, d'autres modes d'action existent qui consiste en l'inhibition de la synthèse de la paroi, des acides nucléiques, des protéines et de l'activité enzymatique (**Figure 7**).



**Figure 7 : Différents mécanismes d'action des peptides antimicrobiens**

(Amerikova et al. 2019)

Perméabilisation de la membrane plasmique (A)

Inhibition respectivement de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, du peptidoglycane et des protéines (B, C, D et E)

Inhibition de chaperonnes (F)

Inhibition de la mitochondrie (G)

### 2.3.1. Perméabilisation de la membrane cellulaire

Les PAMs cationiques interagissent de manière électrostatique avec la charge négative à la surface des bactéries portées par les acides téichoïques et lipotéichoïques chez les bactéries à Gram positif et par les lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif. Par la suite, ils traversent la paroi bactérienne et interagissent avec la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Broden 2005; Yount et Yeaman 2013). A ce stade, le comportement des peptides va être régi par le ratio entre les quantités de lipides et de peptides antimicrobiens. Lorsque le ratio peptides/lipides est faible, les PAMs se lient parallèlement à la membrane plasmique. Puis, lorsque le ratio atteint une valeur élevée, les PAMs s'orientent perpendiculairement à la membrane et s'insèrent dans cette dernière formant des pores (Lee et al. 2004). Différents modèles d'insertion des PAMs dans la membrane plasmiques ont été décrits (Yeaman et Yount 2003) (**Figure 8**).

#### 2.3.1.1. Modèle « Barrel Stave »

Il s'agit du 1<sup>er</sup> modèle de perméabilisation de la membrane plasmique qui est décrit. Dans ce modèle, les PAMs en hélices s'associent à la surface membranaire et s'organisent en tonneaux formant ainsi un pore aqueux dans la membrane. La partie hydrophobe des hélices est en contact avec la bicouche lipidique alors que la partie hydrophile s'oriente vers l'intérieur du pore. Le recrutement

de monomères de peptides augmente la largeur du pore permettant la fuite du contenu cytoplasmique (Ehrenstein et Lecar 1977) (**Figure 8 A**).

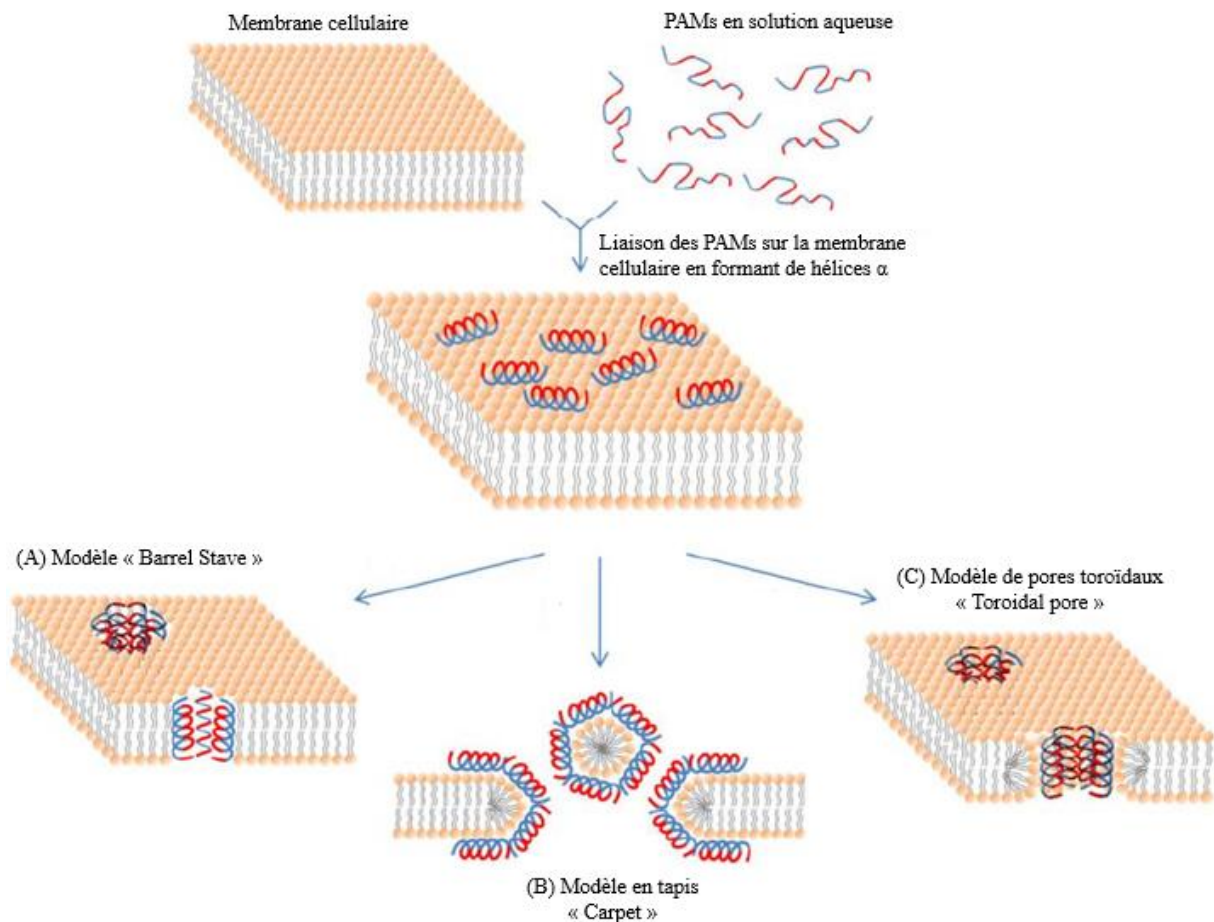
#### 2.3.1.2. Modèle en tapis

Les PAMs se fixent à forte concentration à la surface de la membrane plasmique par des interactions électrostatiques avec la tête polaire des phospholipides. Les peptides ne s'insèrent pas dans la bicouche lipidique, ils forment un tapis qui recouvre la membrane plasmique et provoque son effondrement lorsque la quantité de PAMs est en excès. Par la suite, les peptides qui sont amphiphiles agissent comme des détergents et se positionnent autour des bouts de membrane, mettant en contact leurs parties hydrophiles et la tête polaire des lipides (Dean et al. 2010) (**Figure 8 B**).

#### 2.3.1.3. Modèle de pores toroïdaux

Dans ce modèle, les PAMs créent une déformation de la bicouche lipidique en formant des pores dans la membrane. En effet, lors de l'insertion des peptides restés fixés aux têtes polaires des phospholipides, il y a une invagination des lipides qui se crée, entraînant la fusion des feuillettes externe et interne de la membrane (Wimley 2010). En cela, le modèle de pores toroïdaux diffère du modèle « Barrel stave ». Ce processus est communément utilisé par les magainines, un PAM isolé de la peau de grenouille, les protégrines produites par les leucocytes porcins et les mélittines trouvées dans le venin d'abeilles (Brogden 2005) (**Figure 8 C**).





**Figure 8 : Représentation schématique des modèles de perméabilisation des membranes cellulaires par les PAMs**

(D'après (Bahar et Ren, 2013))

- Modèle « Barrel Stave » (A)
- Modèle en tapis « Carpet » (B)
- Modèle de pores toroïdaux (C)

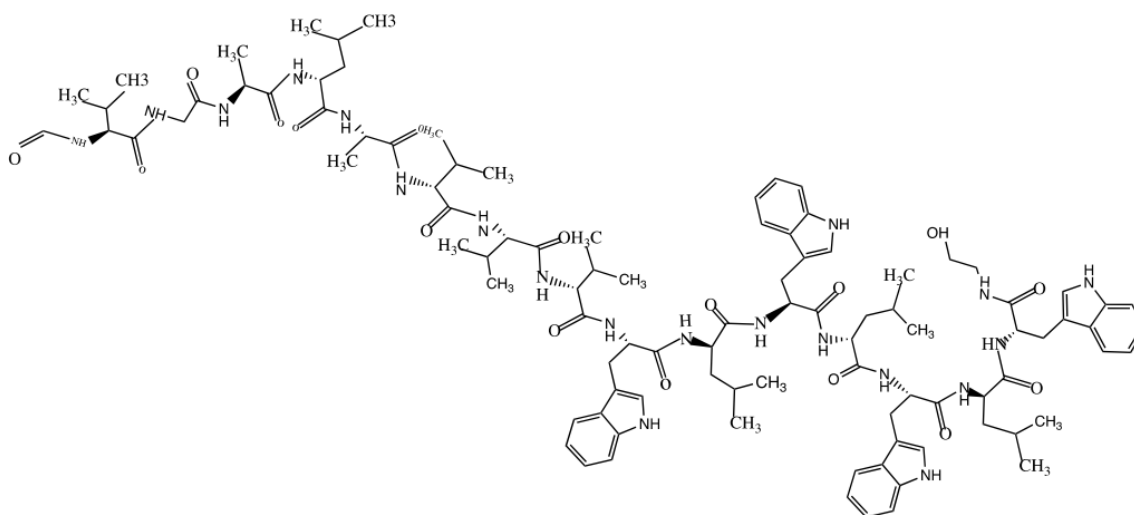
#### 2.3.1.4. Modèle de canal agrégé

Ce modèle est le dernier décrit à ce jour. Les PAMs s'insèrent dans la membrane et se regroupent en agrégats qui déstabilisent la bicouche lipidique. Ces agrégats forment des pores non structurés de formes et de tailles hétérogènes avec des orientations non spécifiques. Associés à des molécules d'eau, ils établissent des canaux de fuite d'ions et de plus grosses molécules à travers la membrane (Li et al. 2012). Ce mécanisme est utilisé par un PAM appelé maculatine 1.1 isolé d'une rainette australienne *Litoria genimaculata*.

De nombreux PAMs utilisent les modèles précédemment décrits pour perméabiliser la membrane plasmique de leurs cellules cibles.

### 2.3.1.5. Gramicidine

La gramicidine est un PAM cyclique de quinze acides aminés produit par *Bacillus brevis* (**Figure 9**). Organisé en dimère d'hélices  $\beta$  (Koepe et al. 1992), la gramicidine forme dans la membrane plasmique un canal perméable aux cations déstabilisant ainsi la balance physiologique  $K^+/Na^+$  de la cellule. Elle cible les bactéries à Gram positif, les champignons et les protozoaires. La gramicidine est l'un des premiers antibiotiques utilisés dans les traitements cliniques. Toutefois, du fait de ses effets secondaires hémolytiques, elle est uniquement prescrite en thérapie humaine pour traiter des infections au niveau de la peau, des yeux, du nez et de la gorge. De plus, il peut être associé à d'autres peptides et molécules antibiotiques comme la polymyxine B et la néomycine pour traiter synergiquement des infections ophtalmologiques (Stevenson 2009).

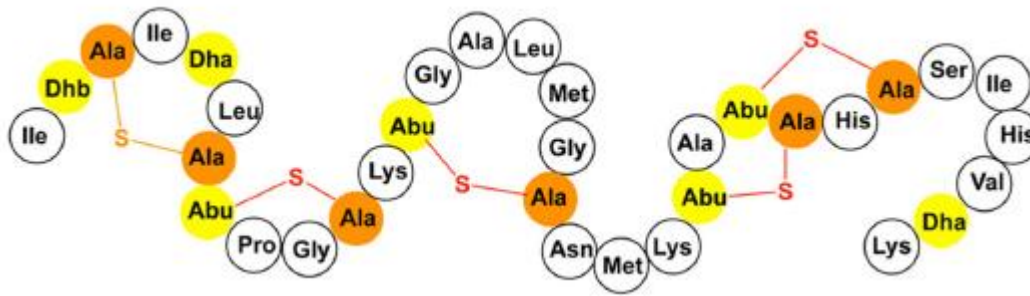


**Figure 9 : Structure de la gramicidine**

(Chen et al. 2019)

### 2.3.1.6. Nisine

La nisine est une bactériocine polycyclique de classe I produite par *L. lactis* (**Figure 10**). Elle présente une double action. La nisine peut se lier au lipide II et empêcher la biosynthèse du peptidoglycane en inhibant la translocation des précurseurs du cytosol vers la paroi bactérienne. De plus, elle peut former des pores en s'insérant au niveau de la paroi bactérienne et utilise le lipide II comme une molécule d'ancrage. Cela conduit à une déstabilisation du potentiel de membrane, un efflux de petits métabolites tels que le potassium des cellules affectées et, finalement, la mort cellulaire (Cotter et al. 2005) (**Figure 11**).



**Figure 10 : Structure primaire de la nisine**

(Clemens et al. 2018)

Dha : Dehydroalanine

Dhb : Dehydrobutyrine

Abu : acide aminobutyrique

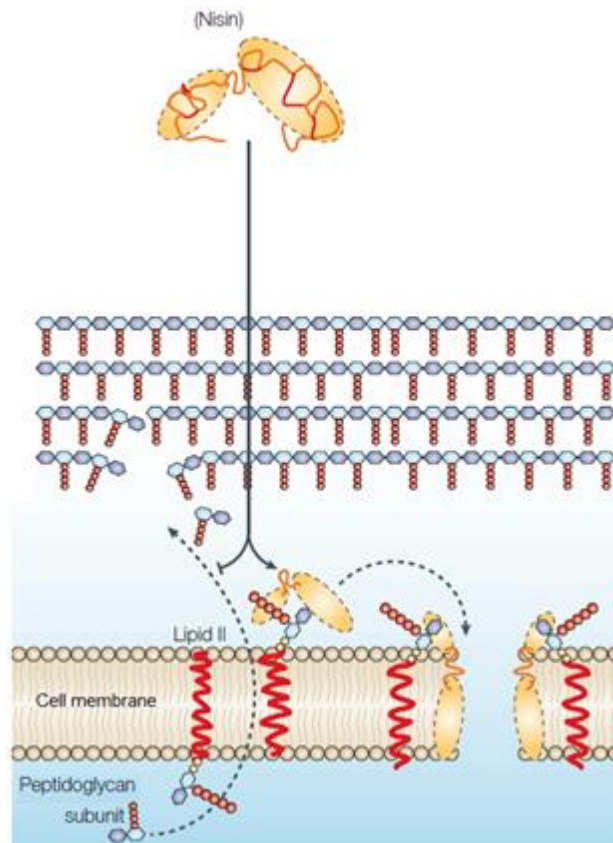
Ala : alanine

Les acides aminés déshydratés sont surlignés en jaune.

Les résidus alanine réticulés sont surlignés en orange.

Les ponts lanthionine et méthyl-lanthionine sont respectivement représentés en orange et en rouge.

La nisine est utilisée comme additif alimentaire sous le numéro E234 dans les industries de transformation des fromages, des viandes, des boissons, etc... En 2002, Brumfitt et ses collaborateurs ont montré que la nisine, combinée à des inhibiteurs de la biosynthèse des peptidoglycanes tels que la ramoplanine, était efficace dans le traitement des *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) et des entérocoques résistant à la vancomycine (VRE) (Brumfitt 2002).



**Figure 11 : Mode d'action de la nisine**

(D'après Cotter et al., 2005)

### 2.3.2. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

La biosynthèse de la paroi bactérienne est l'une des plus importantes cibles des thérapies antibactériennes. L'interférence des PAMs avec une des étapes de cette biosynthèse peut en perturber le processus conduisant à la mort cellulaire. Chez les bactéries à Gram positif, le lipide II est considéré comme le « talon d'Achille » de la synthèse du peptidoglycane. En effet, le lipide II est la cible centrale de nombreux PAMs (Schneider et Sahl 2010). Le lipide II est très conservé et présente une disponibilité limitée à raison de quelques milliers de molécules par cellule. De ce fait, son recyclage est important (Kramer et al. 2004).

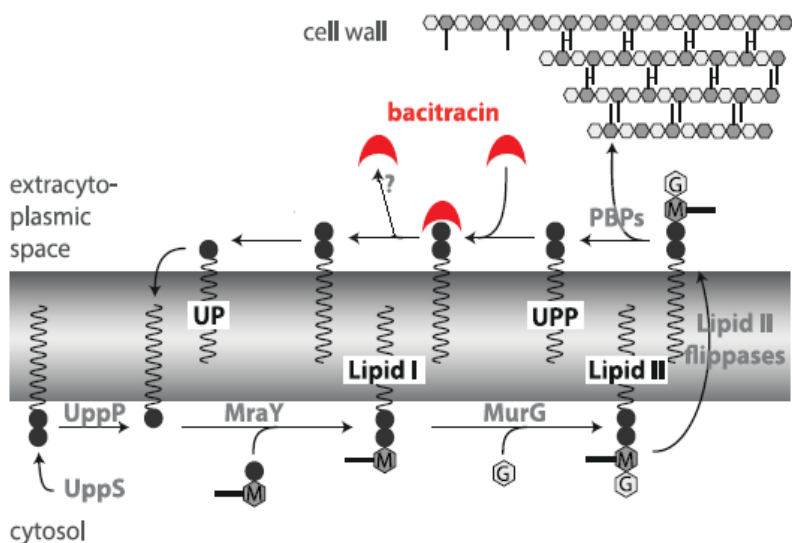
#### 2.3.2.1. Bacitracine

La bacitracine est un peptide cyclique non ribosomal découvert en 1943 et synthétisé par *Bacillus licheniformis* et certaines souches de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (**Figure 12**). Elle agit sur la membrane des bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane (Rietkötter et al.



(D'après (Kim et al. 2018))

Dans le domaine thérapeutique, la bacitracine est utilisée en application locale pour traiter des infections cutanées et ophtalmologiques.



**Figure 14 : Schéma du cycle de biosynthèse du peptidoglycane et mécanisme d'action de la bacitracine**

(D'après (Radeck et al. 2016))

**UppP:** undecaprenyl pyrophosphate phosphatase,

**UppS:** undecaprenyl pyrophosphate synthase,

**MraY:** transférase de l'acide N-acétyl-phosphomuramique-pentapeptide,

**MurG:** transférase de la N-acétyl glucosamine,

**M:** acide N-acétyl muramique,

**G:** N-acétylglucosamine,

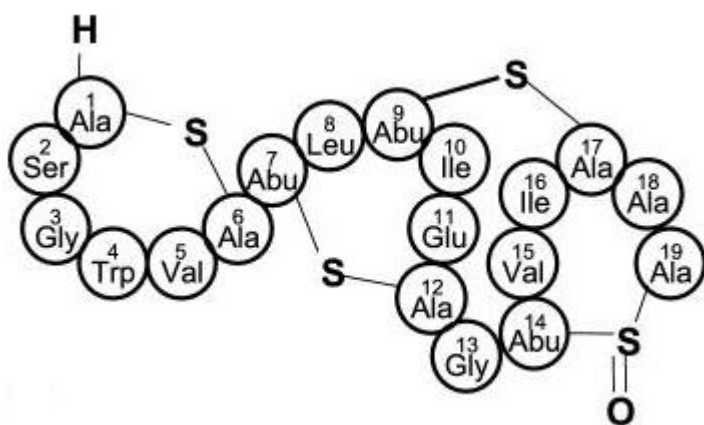
**UP:** undecaprenyl phosphate,

**UPP:** undecaprenyl pyrophosphate,

**PBPs:** penicillin binding proteins

### 2.3.2.2. Actagardine

L'actagardine est un lantibiotique tétracyclique (**Figure 15**). Il est structurellement similaire à la mersacidine. Ce PAM est naturellement synthétisé par différents espèces d'actinomycètes telles que *Actinoplanes liguriae*. Elle inhibe la biosynthèse du peptidoglycane en formant un complexe avec le lipide II en se liant au MurNAc-GlcNAc pyrophosphate (Staroń et al. 2011). De ce fait, l'actagardine empêche les précurseurs de s'insérer dans la chaîne de peptidoglycane naissante.



**Figure 15 : Structure de l'actagardine**

(Holtsmark et al. 2006)

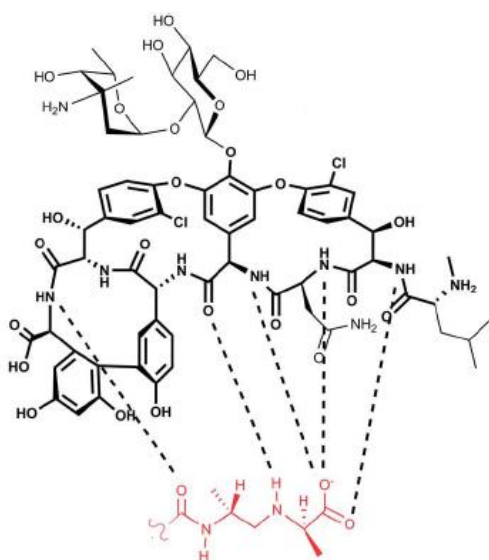
Abu : acide aminobutyrique

Ala : alanine

### 2.3.2.3. Vancomycine

La vancomycine est un glycopeptide produit par *Amycolatopsis orientalis*, une bactérie du groupe actinomycète. Elle est synthétisée par un système non ribosomal et est composée de 3 cycles accolés (**Figure 16**). La vancomycine est utilisée dans le traitement des bactéries résistantes comme le MRSA (Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) même si des souches résistantes sont apparues depuis le début des années 2000 (Tang et al. 2015; van Hal et Fowler 2013).

La vancomycine, comme d'autres glycopeptides tels que la teicoplanine, diffuse à travers la paroi bactérienne et forme un complexe stable avec le motif D-Ala-D-Ala du motif disaccharide-pentapeptide (**Figure 16**). Cela bloque la synthèse du peptidoglycane en inhibant les étapes de transglycosylation et de transpeptidation.



**Figure 16 : Structure de la vancomycine et son interaction avec le motif D-Ala-D-Ala du peptidoglycane**

(Müller, Klöckner, et Schneider 2017)

La vancomycine est représentée en noir. Le motif D-Ala-D-Ala est représenté en rouge. Les traits tirés représentent les ponts d'interaction.

### 2.3.3. Cibles intracellulaires

Les peptides antimicrobiens présentent une large variété de mécanismes d'action autres que la déstabilisation de la membrane plasmique et celle de la paroi bactérienne. Certains PAMs peuvent diffuser à travers les membranes bactériennes (Bahar et Ren 2013). Grâce à cela, les PAMs peuvent avoir accès à leurs cibles intracellulaires et ainsi inhiber l'activité enzymatique de certaines protéines ou la synthèse des acides nucléiques et des protéines.

La buforine II par exemple traverse la membrane plasmique sans la perméabiliser et se lie à l'ADN et à l'ARN avec une forte affinité qui est due à l'identité de séquence existant entre ce PAM et la région N-terminale de l'histone H2A. Cet histone est connu pour interagir directement avec les acides nucléiques (Cho et al. 2009).

L'indolicidine et la puroindoline sont des peptides riches en tryptophane. Du fait de la charge positive de ces PAMs, ils peuvent se lier aux groupements phosphate des acides nucléiques compromettant ainsi l'étape de transcription des ARNm (Park et al. 1998; Uytterhoeven et al. 2008). Il existe des PAMs riches en proline et participent à la défense de nombreux organismes. Ils sont activement transportés à l'intérieur des bactéries où ils se lient aux ribosomes et inhibent la synthèse protéique (Gagnon et al. 2016). Le peptide Api137, dérivé de l'apidaecine, un PAM d'insectes, se lie aux ribosomes et empêche la libération de la chaîne polypeptidique naissante bloquant ainsi la traduction (Florin et al. 2017). D'autres PAMs riches en proline tels que Bac71 -35, Pyrrocoricines, Metalnikowines, oncocines ciblent les ribosomes 70S des bactéries (Gagnon et al. 2016).

L'apidaecine est un PAM uniquement actif contre les bactéries à Gram négatif. Ce peptide est activement transporté à l'intérieur de la bactérie et cible les composants de la synthèse protéique, probablement le ribosome (Castle et al. 1999). Certains PAMs peuvent inhiber les protéases de la bactérie cible. C'est le cas de l'histatine 5 qui empêche la destruction des tissus parodontaux en inhibant la protéase synthétisée par *Bacteriocides gingivalis* (Nishikata et al. 1991). De plus, ce même peptide peut aussi inhiber l'activité de l'ATP synthase F1-F0 située au niveau de la mitochondrie causant la baisse de la synthèse de l'ATP et la mort du parasite protozoaire *Leishmania* (Luque-Ortega et al. 2008)

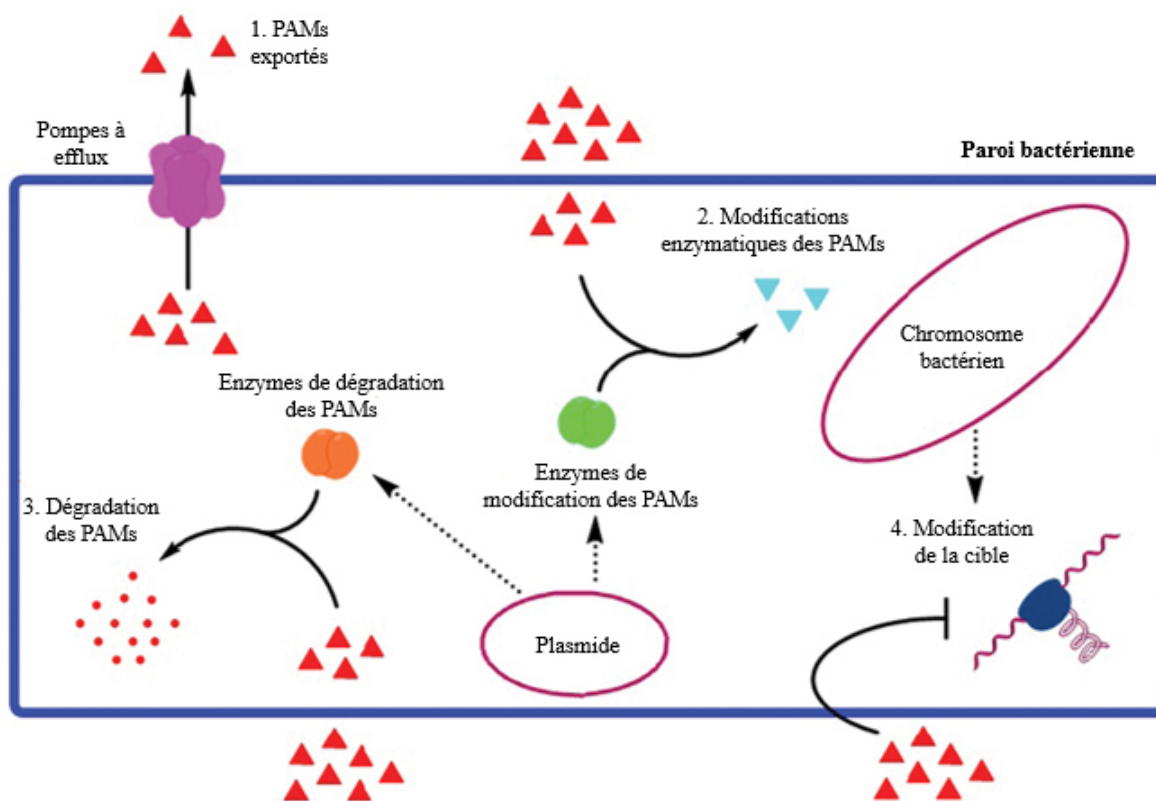
Ces PAMs ne sont pas toujours limités à une seule cible. Ils peuvent inhiber l'action de plusieurs cibles intracellulaires. C'est le cas de la séminalplasmine qui inhibe la synthèse de l'ARN en se fixant sur l'ARN polymérase et peut aussi activer l'autolysine de la bactérie cible entraînant la mort de la cellule (Chitnis et al. 1987; Scheit et al. 1979).



Outre leurs activités antimicrobiennes, certains PAMs sont aussi capables d'induire l'apoptose et la nécrose des cellules. C'est le cas de la magainine qui induit la mort programmée en augmentant la production de ROS et l'activité de la caspase-3 dans les cellules cancéreuses (Cruz-Chamorro et al. 2006). La tachyplésine induit l'apoptose des cellules cancéreuses en modifiant la concentration intracellulaire du potassium indépendamment de l'activation de la cascade de caspases (Zhang et al. 2006). La défensine PvD(1) produite par la graine de la plante *Phaseolus vulgaris* est très active contre la levure *Candida albicans*, un pathogène humain. Ce PAM perméabilise la membrane plasmique et active la production de ROS et de monoxyde d'azote induisant ainsi un stress oxydant qui aboutit à la mort cellulaire (Melo et Castanho 2012).

## 2.4. Mécanismes de résistance aux PAMs

Les micro-organismes ont une prodigieuse capacité à s'adapter à leur environnement. Même si les PAMs sont nettement moins susceptibles aux mécanismes de résistance que les antibiotiques classiques, les micro-organismes ont développé des systèmes leur permettant de se défendre face aux PAMs. Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en place (**Figure 17**).



**Figure 17 : Différents mécanismes de résistance aux PAMs**

(D'après (Aslam et al. 2018))

- 1) Export des PAMs via des pompes à efflux
- 2) Modifications enzymatiques des PAMs
- 3) Dégradation des PAMs
- 4) Modifications de la cible

#### 2.4.1. Modification de la surface des cellules bactériennes

La majorité des PAMs étant chargés positivement, les bactéries peuvent mettre en place des moyens permettant de réduire la charge négative de la paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram positif, l'ajout de résidus D-Alanine dans les acides téichoïques et lipotéichoïques ou de résidus lysine au niveau des phosphatidylglycérol entraînent une augmentation de la charge positive de la paroi et de la membrane bactérienne respectivement. De ce fait, l'action des PAMs est limitée grâce à la répulsion électrostatique induite par deux charges de même nature (Guilhelmelli et al. 2013). C'est le cas de *S. epidermidis* qui exprime en plus des adhésines chargées positivement formant une barrière répulsive contre des PAMs tels que le LL-37 et la  $\beta$ -défensine humaine 3 (Vuong et al. 2004). Chez les bactéries à Gram négatif, la baisse de la phosphorylation, la substitution des sucres et l'addition de lipides au niveau des lipopolysaccharides (LPS) entraînent les mêmes effets (Jain et Darveau 2010). En effet, les bactéries *E. coli*, *Salmonella* et *Haemophilus influenza* réduisent la charge anionique de leurs membranes externes en acétylant les lipides A (Brogden 2005). D'autres bactéries sont entourées d'une capsule polysaccharidique qui limite les interactions entre les PAMs et leurs cibles. C'est le cas de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* (Campos et al. 2004). Toutefois, chez *S. pneumoniae*, la capsule cause une sensibilité de la bactérie aux  $\alpha$ -défensines 1 à 3 humaines. Les auteurs émettent l'hypothèse que la présence de cette capsule masque la modification des charges à la surface bactérienne (Beiter et al. 2008). Un autre moyen de résister aux PAMs consiste à exprimer des molécules chargées très négativement et les sécréter dans le milieu extracellulaire. Ces molécules vont se fixer sur les PAMs cationiques pour qu'ils ne puissent plus atteindre leurs cibles (Bahar et Ren 2013).

#### 2.4.2. Modification de la structure des molécules cibles

Ce mécanisme consiste à modifier la structure ou la composition de la cible de telle sorte que le PAM ne puisse plus se fixer ou ait moins d'affinité pour elle. C'est le cas par exemple du remplacement du motif D-Alanine terminal de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane par un motif D-Lactate qui réduit la fixation de la vancomycine, inhibant ainsi son action antibiotique

(Gebhard 2012). *B. subtilis* produit une phosphatase nommée BcrC qui convertit l'UPP en UP réduisant ainsi l'affinité de la bacitracine pour sa cible (Stratton 2000).

### 2.4.3. Production de protéases et formation de biofilms

Les bactéries produisent des protéases capables de dégrader les PAMs qui sont principalement sous la forme linéaire. Ces protéases ont un vaste spectre d'action contre les PAMs. Ce procédé est utilisé par les pathogènes humains tels que *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *S. aureus* notamment pour digérer la cathélicidine LL-37 (Guilhelmelli et al. 2013).

Les biofilms sont des associations de cellules adhérentes et accrochées à une surface définie. Ils sont très résistants à divers traitements physico-chimiques et antimicrobiens. Ces biofilms sont responsables de nombreuses infections persistantes. Toutes ces caractéristiques confèrent aux biofilms la capacité de résister à l'action des peptides antimicrobiens. En effet, les biofilms formés par *P. aeruginosa* lui permettent par exemple de résister à la colistine (Folkesson et al. 2008).

### 2.4.4. Utilisation de pompes à efflux

Un autre mécanisme de résistance aux peptides antimicrobiens consiste à surexprimer des pompes à efflux qui vont transporter les PAMs à l'extérieur de la bactérie avant qu'ils n'agissent sur leurs cibles. C'est le cas des transporteurs RND, des transporteurs MFS et les transporteurs ABC. Il s'agit d'un des mécanismes majeurs de résistance utilisés.

Les **transporteurs RND** sont très répandus chez les bactéries à Gram négatif. Ils fonctionnent dans un système tripartite comprenant le transporteur localisé dans la membrane interne, une protéine adaptatrice située dans le périplasma et une porine insérée dans la membrane externe de la bactérie. Ils utilisent un système de translocation antiport dépendant du gradient de protons pour transporter les composés hors de la bactérie via la porine de la membrane externe.

Les **transporteurs MFS** sont ubiquitaires et utilisent un gradient de protons ou d'ions pour transporter différents substrats tels que des peptides. Ils peuvent réaliser des transports uniport, symport ou antiport.

Les **transporteurs ABC** utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour transporter des composés à travers les membranes biologiques. Comme décrit plus loin dans ce mémoire, les transporteurs ABC sont un des mécanismes de résistance les plus importants pour les peptides antimicrobiens.

*Klebsiella pneumoniae* résiste à l'action de la polymyxine B en exportant ce dernier via le transporteur RND AcrAB (Padilla et al. 2010). Rieg et ses collaborateurs ont montré que les pompes à efflux peuvent expulser des PAMs spécifiques. En effet, lorsqu'ils ont surexprimé respectivement

des transporteurs tels que AcrAB, MexAB et NorA dans les bactéries suivantes : *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, ils n'ont pas constaté une résistance envers les PAMs tels que la cathélicidine LL-37, les  $\alpha$ -défensines neutrophiles HNPs-1 et 3,  $\alpha$ -défensine HD-5 et les  $\beta$ -défensines hBD-2 et 3 (Rieg et al. 2009).

#### 2.4.5. Import et dégradation intracellulaire

Il existe un autre type de mécanisme permettant de résister aux PAMs. Les bactéries détoxifient leur environnement en important les PAMs à l'intérieur des bactéries. Cet import est suivi d'une dégradation de ces peptides dans le cytoplasme (Caspari et Lafontaine 2021). Un exemple typique de ce type de détoxification est le transporteur ABC Sap (Sensitivity to Antimicrobial Peptides) de *Haemophilus influenza* situé au niveau de la membrane interne. La SBP appelée Sap4 lie le PAM substrat et le présente au transporteur Sap qui l'importe (Shelton et al. 2011).

### 3. Les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette)

Les transporteurs ABC forment une des plus grandes familles de protéines membranaires présente chez tous les organismes vivants. Leur rôle consiste à utiliser l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP pour le transport unidirectionnel de différents substrats à travers la membrane. Il s'agit d'un transport permettant soit d'exporter ces molécules soit de les importer. Ces ATPases transportent des substrats de natures variées : depuis de petites molécules organiques et inorganiques tels que des acides aminés, sucres, vitamines, et métaux jusqu'à de grands composés organiques comprenant des peptides, protéines, molécules lipidiques et polysaccharidiques (Wilkens 2015). Le terme de transporteur ABC a été introduit pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1992 par Christopher Higgins qui se base sur la présence d'une séquence hautement conservée nommée « ATP-Binding Cassette » spécifique à cette famille de protéines (Higgins 1992). Les humains ont 48 transporteurs ABC qui ont été classés dans sept sous-familles (ABCA  $\rightarrow$  ABCG) (Dean et al. 2010). Les transporteurs ABC sont particulièrement présents chez les bactéries, représentant par exemple 5% du génome d'*E. coli* (Linton et Higgins 1998).

Les transporteurs ABC jouent des rôles fondamentaux dans les processus biologiques ainsi que dans l'apparition de plusieurs maladies et complications thérapeutiques :

- **Pathologies** : lorsque des transporteurs ABC sont inactivés, mutés ou présentent une fonctionnalité anormale, ils provoquent des pathologies génétiques (Borst et Elferink 2002; Gottesman et Ambudkar 2001; Štefková et al. 2003). C'est le cas de la

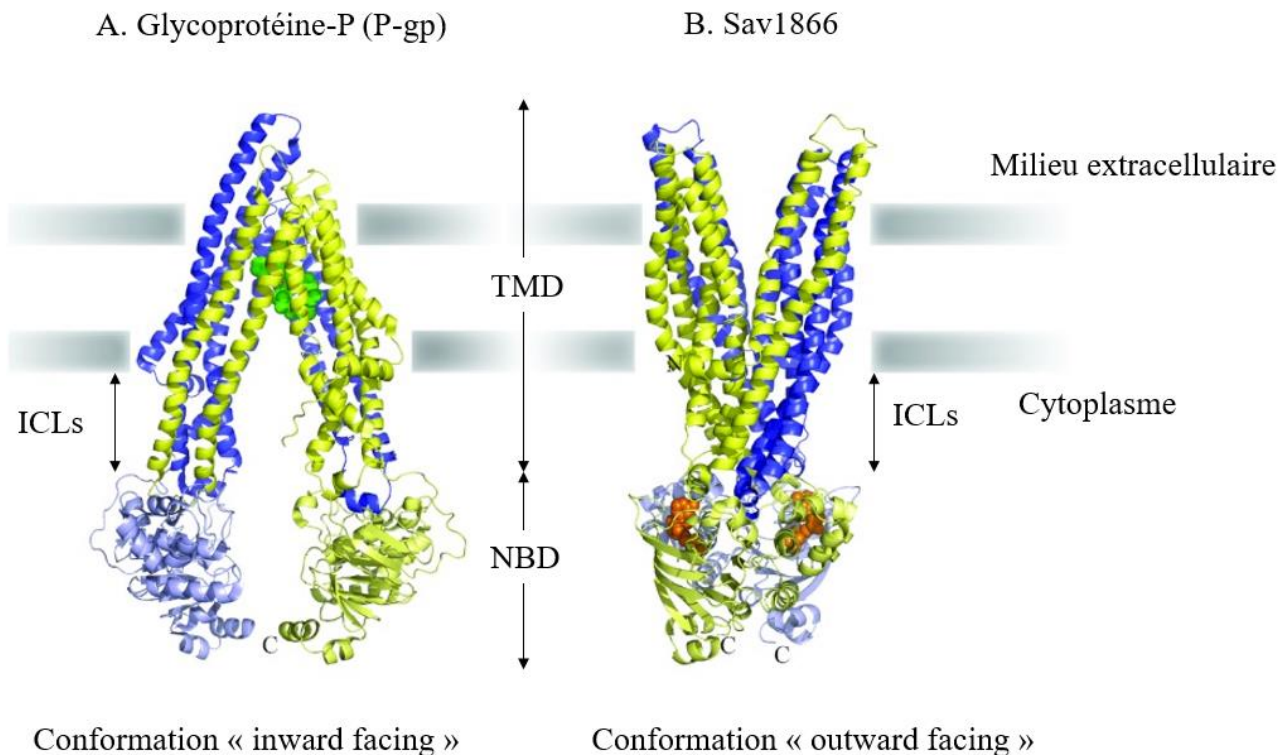
mucoviscidose causée par la mutation du gène codant CFTR/ABCC7 (Cystic Fibrosis, Transmembrane conductance Regulator), qui forme un canal pour les ions chlorure.

- **Virulence des pathogènes** : certains transporteurs ABC permettent l'export de facteurs de virulence des micro-organismes pathogènes. C'est le cas de l' $\alpha$ -hémolysine, une exotoxine produite par *E. coli* et exportée hors de la bactérie par le transporteur HlyB (Niu et al. 2013). De plus ces pathogènes utilisent aussi les transporteurs ABC pour importer des nutriments qui leur sont essentiels comme les sucres, le fer... (Ahuja et al. 2015)
- **Résistance des cellules cancéreuses** : ce phénomène est à l'origine de nombreux échecs de chimiothérapie (Sun et al. 2012). En effet, les cellules tumorales surexpriment des transporteurs ABC capables d'exporter les drogues cytotoxiques et de conférer une résistance aux cellules cancéreuses. C'est le cas de la Glycoprotéine P/ABCB1(P-gp) (Lehne 2000), de MRP1/ABCC1 (Munoz et al. 2007) et ABCG2 (Nakanishi et Ross 2012). Ce phénotype est appelé la résistance aux multiples drogues (MDR).
- **Résistance aux antimicrobiens** : actuellement, il existe de plus en plus une émergence de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques, ce qui pose de graves problèmes de santé publique. L'un des mécanismes de résistance aux antimicrobiens utilisés par les pathogènes est l'export de ces molécules par des transporteurs ABC (Munita et Arias 2016; Orelle et al. 2019).

### 3.1. Architecture générale d'un transporteur ABC

Les transporteurs ABC présentent une topologie commune constituée au minimum de quatre domaines, deux domaines transmembranaires ou TMDs (« TransMembrane Domains ») et deux cytoplasmiques ou NBDs (« Nucleotide-Binding Domains »), qui peuvent être portés par un ou plusieurs polypeptides. Les transporteurs comme la P-gp, MRP1, ou CFTR ont les quatre domaines fusionnés au sein d'un même polypeptide (Ambudkar et al. 1998) (**Figure 18**). D'autres transporteurs présentent leurs différents domaines sous la forme de deux, trois ou quatre polypeptides différents.

Les TMDs permettent la reconnaissance et le transport des substrats à travers la bicouche lipidique alors que les NBDs fixent et hydrolysent les molécules d'ATP.



**Figure 18 : Structures tridimensionnelles de la glycoprotéine-P (A) en conformation « inward facing » (PDB 3G61) et de Sav1866 (B) en conformation « outward facing » (PDB 2HYD)**

(D'après (Vinothkumar et Henderson 2010))

Le substrat (en vert) se lie à l'interface des deux domaines transmembranaires de la P-gp. Sav1866 a été cristallisé en présence d'ADP (orange) montrant une conformation ouverte vers l'extérieur.

### 3.1.1. Les domaines transmembranaires (TMD)

Les TMDs sont des domaines qui divergent au niveau de la séquence des hélices transmembranaires (TMs). Cette divergence est due à la diversité des molécules transportées. En effet, les TMDs représentent une voie de translocation des molécules qui peut être accessible soit du côté intracellulaire pour l'export des molécules soit du côté extracellulaire pour l'import des substrats. Un TMD « typique » est généralement pourvu de six hélices transmembranaires mais ce nombre peut varier de 5 à 10 hélices par TMD. D'après Locher et ses collaborateurs, il faudrait un minimum de 10 hélices transmembranaires pour former le chemin permettant la translocation des molécules (Locher et al. 2002). Les TMDs contiennent les sites de liaison des substrats. Pour certains transporteurs ABC, il existe plusieurs sites de fixation des substrats, c'est le cas de la P-gp/ABCB1 (Chufan et al. 2013).

Les TMDs possèdent aussi des régions cytoplasmiques appelées boucles intracellulaires (ICLs) contenant des hélices dites de couplage qui interagissent avec les NBDs (**Figure 18**). Situées à l'interface entre les TMDs et les NBDs, les ICLs permettent de coordonner les changements de conformation dus à l'hydrolyse des molécules d'ATP avec la translocation des substrats et vice versa (Jones et al. 2009).

### 3.1.2. Les domaines de liaison aux nucléotides (NBD)

Les NBDs sont les domaines les plus conservés des transporteurs ABC (Dassa et Bouige 2001). Ce sont des domaines cytoplasmiques qui permettent la liaison et l'hydrolyse des molécules d'ATP. Ils représentent un sous-groupe des NTPases à motif P-loop et dépendent des ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) pour la catalyse de la réaction d'hydrolyse (ter Beek et al. 2014). On retrouve dans ces domaines des motifs hautement conservés dans leur séquence caractérisant la « cassette » de fixation de l'ATP. Ainsi, les motifs A et B de Walker sont communs à beaucoup de protéines qui fixent des NTPs (Nucléosides TriPhosphates) tandis que le motif LSGGQ représente la signature spécifique à tous les transporteurs ABC. L'alignement de nombreuses séquences de NBDs a permis de repérer des motifs conservés dans ces domaines cytoplasmiques (**Figure 19**).

Les NBDs sont divisés en 2 sous-domaines (Chen et al. 2003):

- le sous-domaine catalytique RecA qui regroupe de nombreuses séquences conservées telles que le motif A de Walker, le motif B de Walker, la boucle A, la boucle D, la boucle H et la boucle X.
- le sous-domaine  $\alpha$ -hélicoïdal qui contient le motif signature des protéines ABC. La boucle Q démarque le début de ce sous-domaine.





néanmoins, toujours se fixer au niveau du NBD (Higgins et Linton 2004; Orelle et al. 2019) (**Figure 19 A et B**).

#### 3.1.2.2. Le motif A de Walker

Le motif A de Walker encore appelé boucle P pour « Phosphate » est riche en glycine (G) et contient un résidu lysine (K) hautement conservé. Il s'agit d'une boucle de liaison des phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP (ou  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ADP). La séquence de ce motif est la suivante : GXXGXGK(S/T) où X représente un acide aminé variable.

Ce motif est très important pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. De ce fait, la mutation de la lysine conservée rend le transporteur ABC souvent incapable d'hydrolyser l'ATP. En effet, cette lysine est impliquée dans le positionnement de la chaîne triphosphate de l'ATP qui est indispensable à l'hydrolyse (Byeon et al. 1995) (**Figure 19 A et B**).

#### 3.1.2.3. Le motif B de Walker

Le motif **Walker B** ( $\phi\phi\phi\phi D$  où  $\phi$  est un acide aminé hydrophobe) contient un aspartate conservé. Ce résidu permet la coordination de l'ion magnésium ( $Mg^{2+}$ ) nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP. Chez la plupart des ABC, ce motif est suivi d'un glutamate hyper-conservé qui active la molécule d'eau permettant l'hydrolyse de la liaison  $\gamma$  de l'ATP. Ce résidu glutamate est aussi appelé le résidu catalytique. La mutation de ce résidu abroge l'hydrolyse de l'ATP chez le transporteur de multiple drogues BmrA (Orelle et al. 2003) et les autres ABC (Orelle et al. 2019) (**Figure 19 A et B**).

#### 3.1.2.4. La boucle A

La boucle A contient un acide aminé aromatique conservé qui est le plus souvent une tyrosine. Ce résidu aide à positionner l'ATP grâce à une interaction  $\pi$ -stacking entre le cycle adénine et le cycle de l'acide aminé aromatique (Ambudkar et al. 2006; Geourjon et al. 2001) (**Figure 19**).

#### 3.1.2.5. La boucle D

La boucle D (SALD), contenant un résidu aspartate (D) conservé, se trouve en aval du motif B de Walker et est impliquée dans le transfert d'informations entre les deux NBDs. Le changement de conformation de cette boucle affecte la géométrie du site catalytique et aide à former le site d'hydrolyse de l'ATP (Jones et George 2012) (**Figure 19 A et B**).

#### 3.1.2.6. La boucle Q

La boucle Q est un motif constitué d'environ huit résidus avec une glutamine (Q) conservée à son extrémité N-terminale. Localisée à l'interface entre les sous-domaines RecA et  $\alpha$ -hélicoïdal, les

changements de conformation de la boucle Q permettent à la glutamine de s'orienter à l'intérieur et à l'extérieur du site catalytique durant le cycle d'hydrolyse, optimisant ainsi le site actif quand l'ATP-Mg<sup>2+</sup> est lié et propageant des changements conformationnels quand l'ATP est hydrolysé. La boucle Q est aussi un site majeur de l'interaction entre les NBDs et les TMDs (Zolnerciks et al. 2014) (**Figure 19 A et B**).

#### 3.1.2.7. La boucle H

La boucle H est dotée d'une histidine (H) très conservée qui interagit avec l'aspartate de la boucle D et le phosphate  $\gamma$  de l'ATP. Ces interactions aident à positionner la molécule d'eau, la base adénine et le magnésium. La mutation de cette histidine en alanine abolit l'activité ATPase du transporteur HlyB. Cela a permis la cristallisation du dimère de NBDs de ce transporteur en présence d'ATP. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le glutamate catalytique ainsi que l'histidine conservée de la boucle H fonctionnaient en tant que dyade (Zaitseva et al. 2005) (**Figure 19 A et B**).

#### 3.1.2.8. La boucle X

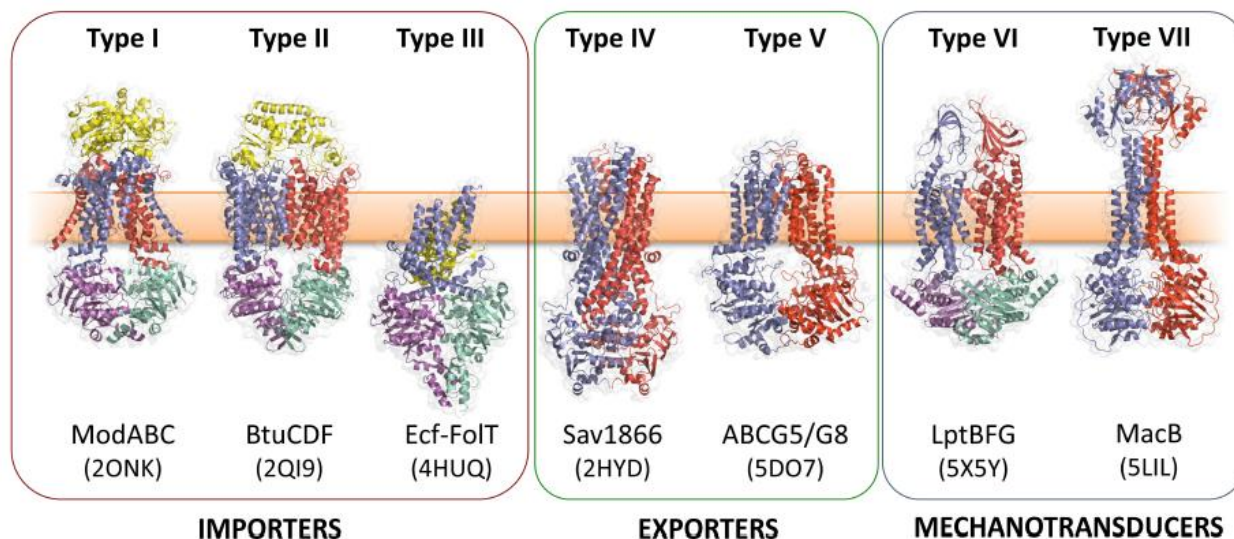
La boucle X n'existe que chez les exportateurs. Elle est localisée à proximité et en amont de la signature ABC. Ce motif est connu pour jouer un rôle dans la communication entre les NBDs et les TMDs (Oancea et al. 2009). En effet, une mutation dans ce motif de la boucle X (470-TEVGERG-476) induit un découplage entre l'activité de transport des substrats et l'activité d'hydrolyse de l'ATP du transporteur BmrA. Le mutant E474R est capable d'hydrolyser l'ATP mais ne peut pas transporter ses substrats. Cela s'explique par le fait que la mutation empêche le transporteur de propager à l'interface NBD/TMD une rigidification requise pour le transport (Lacabanne et al. 2019).

Les transporteurs ABC présentent au moins deux états de conformationnels différents (**Figure 18**). Lorsque les NBDs dimérisent en liant deux molécules d'ATP, le transporteur ABC adopte généralement une conformation ouverte vers l'extérieur appelée « outward facing ». La séparation des NBDs vraisemblablement sous l'effet de l'hydrolyse de l'ATP, entraîne un changement conformationnel et le transporteur adopte la conformation ouverte vers l'intérieur appelée « inward facing ».

## 3.2. Différents types de transporteurs ABC

Les transporteurs peuvent être divisés en deux groupes en fonction du sens de translocation des composés. Les importateurs que l'on retrouve essentiellement chez les procaryotes, les plantes et les archées transportent les molécules à l'intérieur de la cellule. Les exportateurs, que l'on retrouve aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes, expulsent les composés hors de la cellule. Cette

distinction a été faite grâce à la disponibilité de différentes structures de transporteurs ABC. Cependant, tout récemment, un troisième groupe de transporteurs ABC a émergé, les mécanotransmetteurs, différents des deux précédents tant sur le plan structural que fonctionnel (**Figure 20**).



**Figure 20 : Les différents types de transporteurs ABC**

(Greene et al. 2018)

### 3.2.1. Les importateurs

Les importateurs, comme leur nom l'indique, transloquent les composés à l'intérieur de la cellule. Ils jouent un rôle important dans l'absorption des nutriments essentiels à la survie cellulaire. Pour la plupart des importateurs, les substrats ne se lient pas directement aux TMDs du transporteur. Ils sont livrés au site de liaison grâce à une protéine soluble nommée « Substrate Binding Protein » (SBP) qui lie le substrat avec une affinité de l'ordre du nM au  $\mu$ M et le présente au transporteur ABC (Rice, Park, et Pinkett 2014). Les SBP peuvent être libres dans le périplasme des bactéries à Gram négatif, fusionnées aux TMDs ou liées à la membrane plasmique des bactéries à Gram positif et des archées par un segment transmembranaire ou par un lipide d'ancrage (Biemans-Oldehinkel et al. 2006). Ces protéines sont pourvues de deux domaines reliés par une charnière. Les substrats se fixent à l'interface des deux domaines (van der Heide et Poolman 2002). Les importateurs présentent une autre particularité. En effet, ils possèdent au niveau des ICLs, un motif conservé EAA dans les hélices de couplage et qui est impliqué dans la coordination des changements conformationnels dans les NBDs et les TMDs (Saurin et al. 1994).

La résolution de différentes structures d'importateurs a mis en avant une divergence existant dans ce groupe. En effet, trois sous-groupes ont été repérés selon les différentes architectures et le mécanisme de transport : type I, type II et type III (**Figure 20**).

#### 3.2.1.1. Les importateurs de type I

L'une des 1<sup>ères</sup> caractéristiques de ce groupe d'importateurs est la diversité topologique de leurs TMDs (**Figure 20**). Chez *E. coli*, la protéine MetNI est un importateur homodimérique de 10 hélices TMs (5 hélices TMs par TMD) alors que le transporteur du maltose qui est l'un des mieux caractérisés de ce groupe forme un hétérodimère (MaIF et MaIG) avec, respectivement, 8 et 6 hélices TMs. De plus, certains importateurs possèdent des domaines de régulation attachés aux NBDs qui contrôlent la fonction du transporteur (Oldham et al. 2007). Le mécanisme de transport utilisé est aussi une caractéristique des importateurs de type I. Ce mécanisme est subdivisé en 3 étapes (Mächtel et al. 2019) :

- La fixation du substrat maltose à la SBP permet de fermer cette dernière pour former un complexe de forte affinité. Chez le transporteur du maltose, on observe une constante de dissociation  $K_d$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$  pour le maltose.
- Le complexe SBP-maltose interagit avec les TMDs du transporteur et induit une dimérisation des NBDs en présence d'ATP. Ces changements conformationnels permettent d'activer l'hydrolyse de l'ATP du transporteur et d'initier la translocation du substrat via un accès alternatif au site de liaison situé dans les TMDs. Le transporteur adopte ainsi une conformation « outward-facing » qui permet de relarguer le maltose de la SBP vers l'intérieur du domaine transmembranaire.
- L'hydrolyse des molécules d'ATP restaure le transporteur dans la conformation « inward-facing » permettant ainsi la translocation du substrat dans le cytoplasme, le détachement de la SBP et la libération des produits de l'hydrolyse d'ATP.

#### 3.2.1.2. Les importateurs de type II

Il existe différentes caractéristiques qui distinguent les importateurs de type I et de type II. En effet, chez les importateurs de type II, l'association entre la SBP et le transporteur est affaiblie lorsque le substrat est lié (Lewinson et al. 2010; Vigonsky et al. 2013). Structuralement, les importateurs de type II présentent plus d'hélices transmembranaires et sont donc plus larges (Oldham et al. 2008) (**Figure 20**). L'étude de BtuCD de *E. coli* a permis d'émettre des hypothèses sur le fonctionnement des importateurs de type II. Ils utilisent un mécanisme de transport différent où le transporteur, en conformation de repos, présente ses TMDs ouverts vers l'extérieur. La SBP BtuF se lie aux TMDs et

relargue le substrat dans la cavité du transporteur. La fixation des molécules d'ATP dans les NBDs induit un changement conformationnel qui permet la translocation du composé dans le cytoplasme. S'ensuit l'hydrolyse de l'ATP qui permet au transporteur de revenir à sa conformation de repos (ter Beek et al. 2014).

### 3.2.1.3. Les importateurs de type III ou importateurs ECF

Contrairement aux groupes précédents d'importateurs, les ECF (Energy Coupling Factor) fonctionnent sans SBP. Les transporteurs ECF transportent généralement des micronutriments essentiels tels que des vitamines (riboflavine, thiamine, biotine etc.) et des ions métalliques de transition (nickel, cobalt etc.). Ils sont composés de deux NBDs (EcfA et EcfA'), d'un seul TMD appelé EcfT ou composant T représentant le domaine de couplage et d'une sous-unité membranaire EcfS ou composant S qui lie le substrat avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Santos et al. 2018) (**Figure 20**). Toutefois, un importateur ECF peut être associé à plusieurs composants S (Zhang et al. 2014). C'est le cas du transporteur de l'acide folique ECF-FolT de *Lactobacillus brevis* (Zhang et al. 2014). Découverts dans les années 1970, les importateurs de type III ont été classés comme un nouveau type de transporteur ABC au début des années 2000 (Henderson et al. 1979; Rempel et al. 2019; Rodionov et al. 2009).

### 3.2.2. Les exportateurs

Les exportateurs transportent généralement les composés hors de la cellule en étant localisés dans la membrane plasmique. Toutefois, on peut les retrouver au niveau des membranes des organites telles que la mitochondrie, la vacuole ou le péroxysome. Contrairement aux importateurs, les exportateurs n'ont pas besoin de SBP pour leur fonction. Ils sont connus pour jouer un rôle très important dans la résistance aux antimicrobiens ainsi que dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. Il est connu que les transporteurs ABC disposent de deux sites de liaison de l'ATP. Cependant, il peut arriver chez les exportateurs que l'un de ces sites soit dégénéré. Les résidus conservés tels que le glutamate adjacent au Walker B, l'histidine de la boucle H et d'autres acides aminés de la signature ABC d'un des deux NBDs y sont naturellement mutés (Zutz et al. 2011). Parmi ces transporteurs, on peut notamment distinguer CFTR, le transporteur SUR, PatA-PatB, LmrCD. Actuellement, on distingue deux types d'exportateurs dont la séparation est basée sur les différences structurales existant dans ce groupe : les exportateurs de type IV et de type V (**Figure 20**).

Les exportateurs de type IV présentent six hélices transmembranaires par TMD. Ils ont des hélices de couplage dans un monomère qui s'associent au NBD adjacent induisant un entrecroisement

des monomères. Ces hélices sont éloignées de la membrane. C'est le cas par exemple des transporteurs Sav1866 de *S. aureus*, MsbA de *E. coli*, TM287-TM288 de *Thermotoga maritima* et BmrA de *B. subtilis* étudié dans notre laboratoire (Dawson et Locher 2007; Hohl et al. 2012; Reyes et al. 2006; Orelle et al. 2019).

Les exportateurs de type V présentent une structure qui diffère du type IV. Les monomères ne présentent pas d'hélices de couplage qui s'entrecroisent et les NBDs sont moins éloignées de la membrane. La particularité de ces transporteurs réside dans le fait qu'ils possèdent un mélange des caractéristiques structurales des importateurs et des exportateurs. ABCG5/ABCG8 est le 1<sup>er</sup> transporteur de ce type dont la structure a été résolue (Lee et al. 2016). Par la suite, la détermination de la structure d'ABCG2 par Taylor et ses collaborateurs a aussi permis de classer ce transporteur ABC comme un exportateur de type V (Taylor et al. 2017).

### 3.2.3. Les mécanotransmetteurs

Très récemment, un nouveau type de transporteur ABC a été défini : les mécanotransmetteurs (Crow et al. 2017). C'est le cas de MacB synthétisé par *E. coli* et d'autres bactéries. L'analyse structurale de ce transporteur a montré qu'il n'existait pas une cavité membranaire suffisante pour le passage d'un substrat. Il faut un système tripartite fonctionnel constitué de MacB, MacA et de TolC pour exporter l'entérotoxine STII située dans le périplasma de la bactérie. De ce fait, MacB ne transporte pas les composés à travers la membrane cytoplasmique mais lie les substrats dans le périplasma et les expulse dans le milieu extracellulaire via le canal TolC de la membrane externe (Greene et al. 2018). La fixation des molécules d'ATP induit la dimérisation des NBDs ainsi que des changements conformationnels ou pas au niveau des TMDs comme pour les autres transporteurs ABC mais aussi au niveau du domaine périsplasmique. En se resserrant, le domaine périsplasmique expulse le substrat contenu dans la cavité à travers le système tripartite. LptB<sub>2</sub>FG, un autre transporteur ABC de *E. coli*, utilise aussi la mécanotransmission pour extraire les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane interne (Luo et al. 2017) (**Figure 20**).

## 3.3. Mécanismes de transport des transporteurs ABC

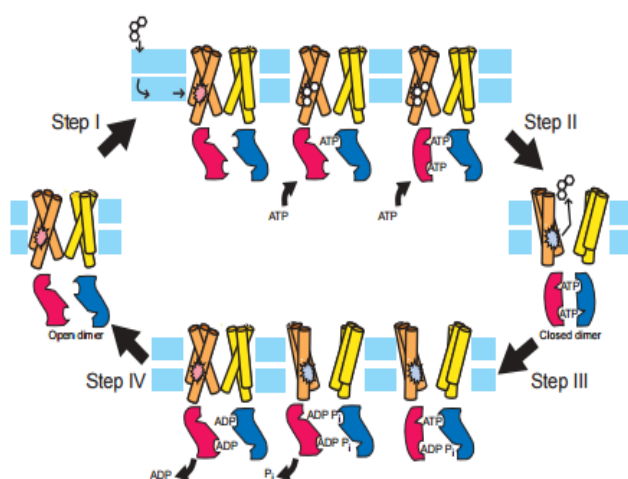
Les transporteurs ABC peuvent transporter les molécules à travers la bicouche lipidique contre leur gradient de concentration, ce qui nécessite un apport d'énergie. Actuellement, le mécanisme de transport n'est pas encore résolu. Du fait d'un manque de structures à haute résolution et de données de dynamique, les états intermédiaires adoptés par la protéine lors du transport demeurent hypothétiques. Toutefois, la diversité structurale des transporteurs ABC suggère une différence dans le cycle de transport des substrats (Wilkins 2015). Ainsi, plusieurs modèles décrivant le déroulement

du cycle ont été émis : le modèle « ATP-switch » et le modèle « contact-constant ». Ces modèles partagent une série d'étapes comme la liaison du substrat aux TMDs, la liaison et l'hydrolyse de deux molécules d'ATP au niveau des NBDs et les changements conformationnels entre l'état « inward facing » et l'état « outward facing » nécessaires à la translocation du substrat.

### 3.3.1. Le modèle « ATP Switch »

En 2004, Higgins et Linton ont proposé un modèle de transport qui, comme son nom l'indique, intègre un changement entre deux conformations principales : la dimérisation des NBDs à la suite de la fixation de deux molécules d'ATP dans le site catalytique et la dissociation des NBDs facilitée par l'hydrolyse des molécules d'ATP et la libération de l'ADP et du Pi (**Figure 21**). Les changements de conformation des NBDs en position fermée et ouverte induisent au niveau des TMDs des réorientations qui permettent le passage des composés à travers la bicouche lipidique (Higgins et Linton 2004).

- Etape 1 : le substrat se lie aux TMDs et déclenche le cycle de transport.
- Etape 2 : la fixation des deux molécules d'ATP induit la dimérisation des NBDs. Cette dimérisation entraîne un changement de conformation des TMDs qui se retrouvent en position ouverte vers l'extérieur. La drogue est libérée dans le milieu extracellulaire.
- Etape 3 : Il s'en suit une hydrolyse successive des deux molécules d'ATP.
- Etape 4 : Le relargage séquentiel des molécules d'ADP et de Pi permet au transporteur d'adopter à nouveau sa conformation initiale avec les deux NBDs dissociés.



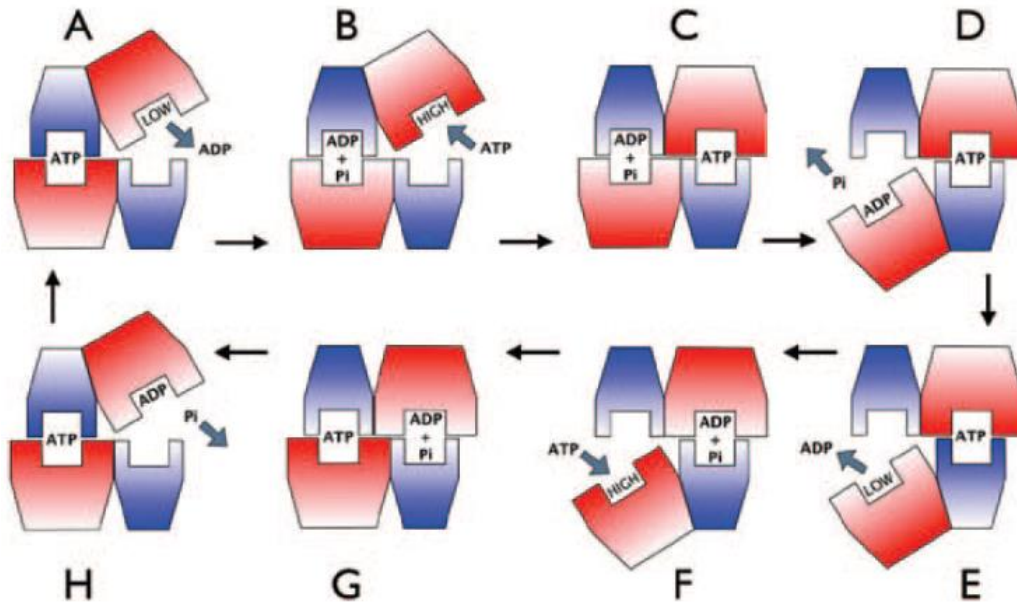
**Figure 21 : Modèle « ATP-switch » du mécanisme de transport d'un exportateur**  
(Higgins et Linton 2004)

Les cylindres jaune et orange représentent les TMDs, les NBDs sont en rouge et bleu et la molécule à trois cycles schématise le substrat du transporteur.

### 3.3.2. Le modèle contact constant

En 2009, un autre modèle de transport des composés a été proposé par Jones et Georges dans lequel les NBDs ne se dissociaient pas complètement pendant le cycle catalytique, ils seraient

constamment en contact d'où le nom de modèle à contact constant (Jones et George 2009). Les molécules d'ATP sont séquentiellement et alternativement hydrolysées dans chaque site. Cela induit une ré-orientation des sous-domaines RecA et  $\alpha$ -hélicoïdal des domaines nucléotidiques et ces changements conformationnels sont transmis aux TMDs (**Figure 22**).



**Figure 22 : Modèle contact constant**

(Jones et George 2013)

Les dimères de NBDs sont représentés en rouge et en bleu.

Les transporteurs ABC constituent une superfamille qui englobent des protéines fonctionnant différemment. Parmi elles, il existe une famille de transporteurs qui collaborent avec des systèmes à deux composants pour résister aux PAMs.

#### 4. Les systèmes de régulation à deux composants (TCS)

Les microbes sont des organismes fascinants capables de survivre dans des environnements hostiles ou extrêmes tels que les profondeurs marines ou les glaciers. Ils ont développé des moyens leur permettant de faire un relai d'informations entre les milieux extracellulaire et intracellulaire pour s'adapter aux différents changements qui peuvent survenir dans leur environnement. La capacité des bactéries à répondre à un stimulus extérieur ou intérieur est conférée par différents systèmes :

- un système à un composant constitué d'un détecteur membranaire de signaux extracellulaires lié à un domaine de liaison à l'ADN. Il représente l'un des plus simples systèmes transmembranaires de détection des signaux chez les bactéries (Jung et al. 2018).



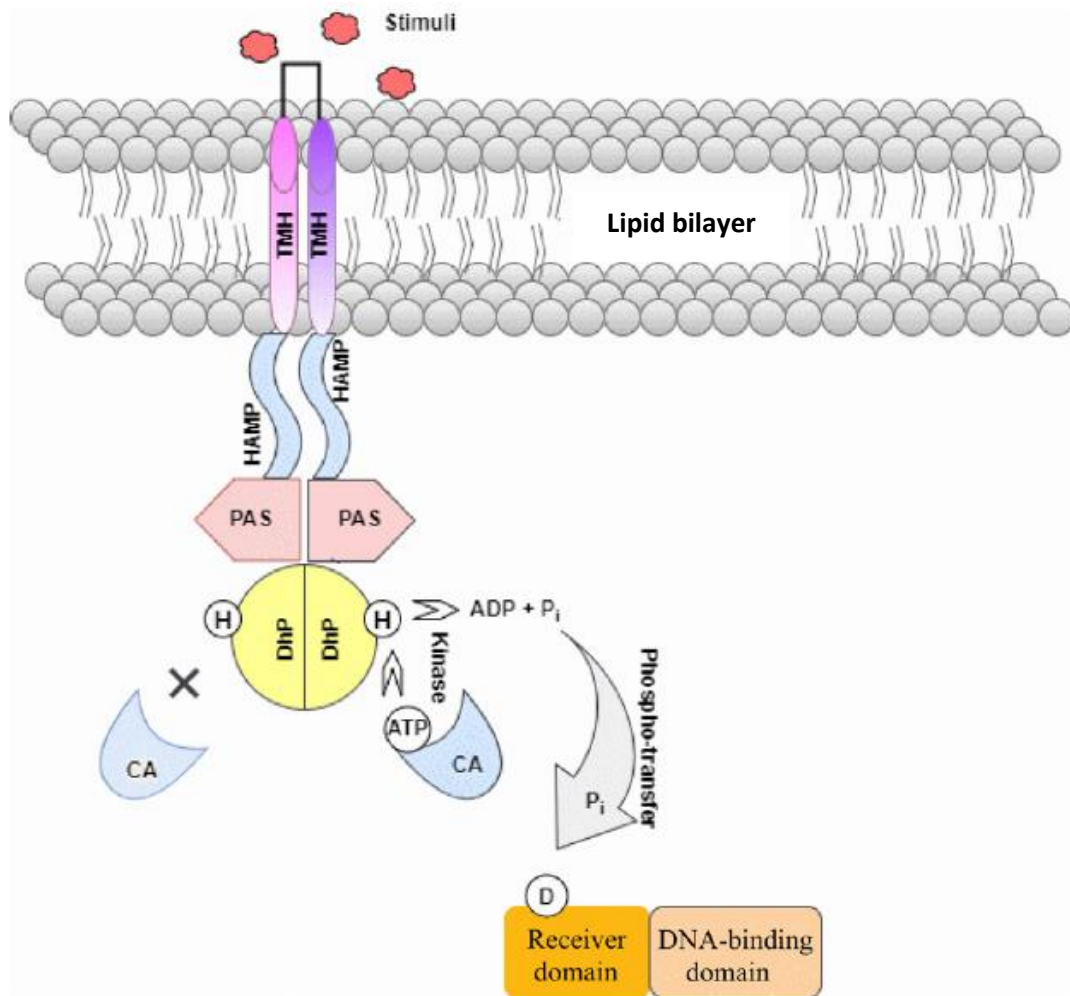
Dans les systèmes à un composant, le détecteur et le régulateur de réponse sont localisés sur la même chaîne polypeptidique. C'est le cas de LacI, le répresseur de l'opéron lactose, qui est un exemple classique de ce groupe de protéines (Marijuán et al. 2010). En effet, lorsque LacI détecte le lactose extracellulaire, il lève l'inhibition de l'opérateur *lac* permettant l'expression de ce dernier. Ces systèmes à un composant sont plus anciens, plus largement distribués chez les procaryotes et les archées et plus diversifiées que les systèmes à deux composants (Ulrich et al. 2005).

- un mécanisme de transduction du signal qui fait intervenir deux composants (Groisman 2016), d'où le nom de système de régulation TCS (« Two Components System »). Les TCS sont impliqués dans de nombreux aspects de la régulation bactérienne tels que le « quorum sensing », la résistance aux antimicrobiens, etc. Ce mécanisme sera détaillé dans la suite du manuscrit.
- un système de régulation à trois composants fait intervenir, en plus d'une histidine kinase et d'un régulateur de réponse cytoplasmique, une troisième protéine membranaire dépourvue de fonction kinase qui détecte le stimulus. Le détecteur transmet le signal à l'histidine kinase déclenchant ainsi la cascade de phosphorylation puis la réponse adaptée (Marijuán et al. 2010).
- un système de phospho-relais où l'histidine kinase détecte le signal, s'autophosphoryle sur une histidine hyper-conservée puis transfère le groupement phosphate sur un aspartate hyper-conservé du régulateur de réponse dépourvu de domaine effecteur. Ce régulateur de réponse transfère le groupement phosphate sur une protéine de phosphotransfert contenant une histidine qui, par la suite, transfère de nouveau le groupement phosphate à un régulateur de réponse terminal qui possède un domaine effecteur mettant ainsi en place une réponse adaptée (Mitrophanov et Groisman 2008).

#### 4.1. Généralités sur les systèmes de régulation à deux composants

Les TCS sont principalement retrouvés chez les bactéries, les archées et quelques eucaryotes comme les plantes et les champignons. Ils constituent un des mécanismes essentiels utilisés par les bactéries pour détecter et s'adapter aux différents changements environnementaux qui peuvent être les carences nutritionnelles, les molécules antimicrobiennes, l'osmolarité, le chimiotactisme, etc. Les TCS sont typiquement composés d'une histidine kinase (HK) transmembranaire et d'un régulateur de réponse (RR) cytoplasmique. L'HK détecte un signal puis s'autophosphoryle sur son histidine conservée. Il y a ensuite un transfert de ce phosphate vers une aspartate conservée du RR. Ce dernier se comporte généralement comme un régulateur transcriptionnel grâce à son domaine de liaison à

l'ADN et permet une réponse physiologique adaptée (**Figure 23**). La déphosphorylation du RR permet au système de revenir à son état de départ. Cependant, certains RR peuvent avoir des activités enzymatiques, se lier à d'autres protéines ou des ARN (Galperin 2010).



**Figure 23 : Représentation schématique d'un système à deux composants (TCS)**

(Ahmad, Majaz, et Nouroz 2020)

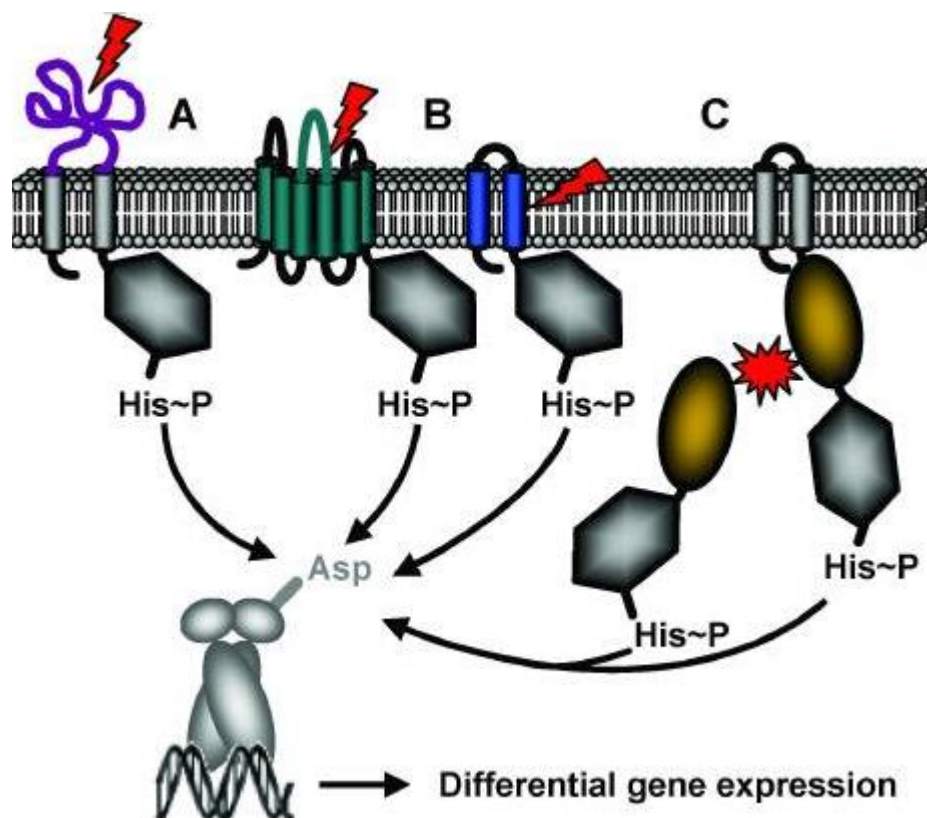
#### 4.1.1. Histidine Kinase (HK)

Généralement, les HK présentent des activités d'autophosphorylation, de transphosphorylation et de déphosphorylation (Stock et al. 2000). Ce sont des protéines transmembranaires qui sont généralement composées d'un domaine extracellulaire qui détecte les signaux et une région cytoplasmique conservée comprenant un domaine kinase liant l'ATP appelé CA et un domaine de dimérisation où l'on retrouve le site de phosphorylation avec son histidine conservé appelé DHp (Bhate et al. 2015). Le dimère de HK s'autophosphoryle en créant une liaison de haute énergie entre l'imidazole de l'histidine et le groupe phosphoryl de l'ATP. Cette étape

d'autophosphorylation est une étape transitoire mettant en jeu moins de 1% de la population totale de HK (Gao et Stock 2009) .



Les domaines de détection des HK, généralement localisés du côté N-terminal, perçoivent directement les signaux ou indirectement grâce à des interactions protéine-protéine. Toutefois des topologies communes ont été observées dans ces domaines ce qui a permis de classer les HK en trois grands groupes (Gao et Stock 2009) (**Figure 24**).

- Le 1<sup>er</sup> groupe (**Figure 24 A**) comprend le plus de membres et est caractérisé par un large domaine de détection extracellulaire qui perçoit les signaux et le transmet.
- Le 2<sup>ème</sup> groupe (**Figure 24 B**) est constitué de HK possédant des hélices TMs dont le nombre peut varier entre 2 et 20. Ils ne possèdent pas un domaine extracellulaire. Les hélices TMs sont reliées par de petites boucles d'une dizaine d'acides aminés. L'HK détecte les signaux provenant de la membrane et des gradients ioniques.
- Le 3<sup>ème</sup> groupe (**Figure 24 C**) présente des HK avec un domaine de détection cytoplasmique pour détecter les signaux intracellulaires.



**Figure 24 : Représentation schématique des mécanismes de détection des signaux par les HK**

(Mascher et al. 2006)

 Stimuli externes et intramembranaires       Stimuli cytoplasmiques

Cependant, certaines HK peuvent combiner des caractéristiques décrites dans chacun des groupes précédents (groupes A, B et C).

Il existe des domaines qui sont fréquemment trouvés dans les HK : le domaine PAS, le domaine HAMP et le domaine CHASE situé dans la partie extracellulaire (**Figure 23**).

#### 4.1.1.1. Le domaine PAS (Per-Arnt-Sim)

Le domaine PAS permet la détection du signal ainsi que sa transmission aux domaines partenaires via des changements conformationnels (Cheung et Hendrickson 2010). Le domaine PAS présente une variété de séquence mais a une structure secondaire hautement conservée. Il est constitué de 5 brins  $\beta$  antiparallèles formant un feuillet entourés par une longue hélice  $\alpha$  et 3 petites hélices  $\alpha$  (Henry et Crosson 2011). Certains domaines PAS ne lient pas directement le substrat. Ils ont besoin d'un cofacteur tels qu'un métabolite, ion, hème qui leur est associé (Möglich et al. 2009).

#### 4.1.1.2. Le domaine HAMP (Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases)

Le domaine HAMP, plus petit que le domaine PAS, joue un rôle très important dans la transmission du signal. Il est constitué de deux hélices  $\alpha$  reliées par une boucle et fonctionne toujours en dimère. Lorsque le système détecte le signal, les quatre hélices subissent des changements de conformation qui entraînent l'autophosphorylation du domaine catalytique de l'HK (Mascher et al. 2006).

#### 4.1.1.3. Le domaine CHASE (Cyclase/Histidine kinase Associated Sensing Extracellular)

Le domaine CHASE participe à la détection du signal extracellulaire et est associé aux domaines PAS et HAMP. Généralement, la structure de ce domaine présente quatre hélices  $\alpha$  séparées par le feuillet  $\beta$ . Il a une taille variable entre 150 et 300 acides aminés et est présent comme son nom l'indique dans la région N-terminale des HK et des adénylate cyclases (Mascher 2006).

### 4.1.2. Régulateur de Réponse (RR)

Les RR sont généralement des protéines multidomaines. Ils sont constitués d'un domaine régulateur conservé situé du côté N-terminal appelé REC et d'un domaine effecteur variable du côté C-terminal (**Figure 23**). Le domaine régulateur catalyse le transfert du groupe phosphoryl de l'HK vers son propre aspartate conservé grâce à une activité « autophosphatase » intrinsèque. La réponse physiologique qui sera mise en place après cette cascade de phosphorylation est déterminée par le niveau de phosphorylation du RR.

Le séquençage complet des génomes de microorganismes a montré la présence de nombreux gènes codant pour des RR et les analyses globales de ces protéines ont montré leurs rôles régulateurs. Le transfert du groupement phosphoryl entre l'HK et le RR est très important pour établir la réponse adaptée. Cependant, ces deux gènes ne sont pas toujours codés sur le même opéron (Mizuno 1997). Il peut arriver que plusieurs HK interagissent avec le même RR et vice versa. C'est le cas dans *B. subtilis* où des phosphorylations sont observées entre l'HK BceS et le RR PsdR (Rietkötter et al. 2008).

#### 4.1.2.1. Domaine régulateur REC

Ce domaine REC, très bien conservé, joue plusieurs rôles dans la cascade de transduction du signal. Il interagit avec l'histidine phosphorylé, catalyse le transfert du phosphate sur son résidu aspartate conservé et régule l'activité du domaine effecteur. Il peut aussi s'auto-déphosphoryler. Le domaine régulateur des RR est généralement constitué de cinq brins  $\beta$  parallèles qui forment un feuillet entourés par cinq hélices  $\alpha$  amphiphiles. Même s'il est associé à d'autres domaines effecteurs, ce domaine REC est capable de fonctionner seul. C'est le cas de protéine CheY de *E. coli* qui joue un rôle important dans le chimiotactisme (Gao et al. 2007).

#### 4.1.2.2. Domaine effecteur

Ce domaine est très variable d'un RR à l'autre car ils ont des cibles différentes. Il peut exister différents domaines effecteurs classés selon leur activité ou leur site de liaison.

##### a) Les domaines effecteurs qui se lient aux acides nucléiques

Ils se comportent comme des régulateurs transcriptionnels et représentent la majorité des RR. Ce groupe englobe différentes familles de protéines liant l'ADN telles que les OmpR, les NarL, les NtrC, les LytR et les AraC. On y distingue aussi des familles protéiques liant l'ARN telles que les ANTAR (« AmiR and NasR Transcription Antitermination Regulators ») qui utilisent un anti-terminateur pour contrôler l'expression génique (Ramesh et al. 2012). La famille OmpR possède le plus de membres (~ 1/3 des RR bactériens) et est la mieux caractérisée à ce jour. OmpR régule la pression osmotique chez *E. coli* en contrôlant des porines et son domaine de liaison à l'ADN est de type wHTH pour « winged Helix-Turn-Helix ». On y retrouve la protéine PhoB qui régule le mécanisme d'assimilation du phosphate chez *E. coli* et VanR qui contrôle la résistance à la vancomycine chez *Enterococcus faecium* (Martínez-Hackert et Stock 1997).

##### b) Les domaines effecteurs présentant une activité enzymatique.

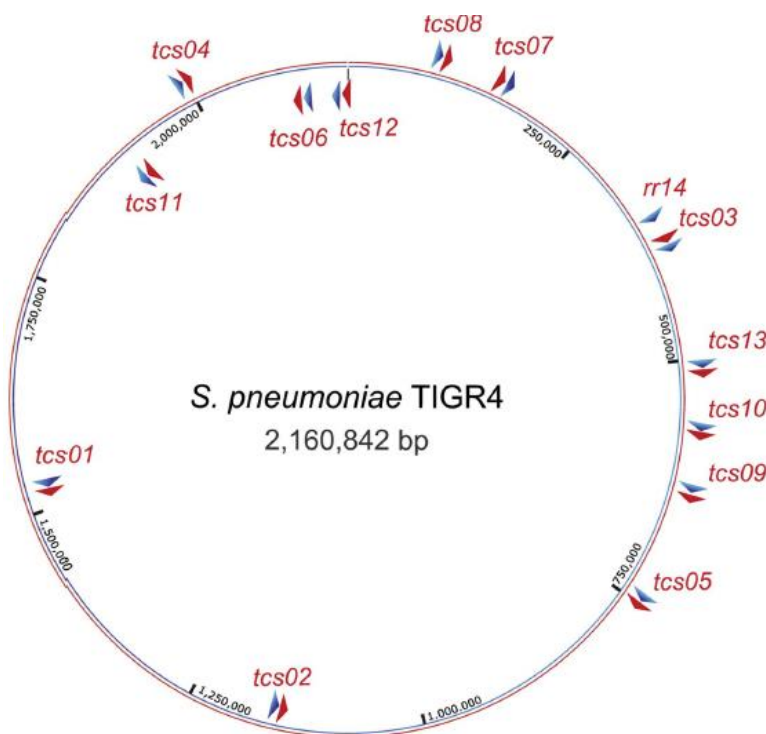
Ces domaines peuvent présenter des activités méthylestérases, adénylate cyclases, histidine/sérine/thréonine kinases, diguanylate cyclases, phosphatases etc. Par exemple, la protéine CheB impliquée dans le chimiotactisme de *E. coli* présente un domaine effecteur avec une fonction méthylestérase (Galperin 2010).

c) **Les domaines effecteurs qui se lient aux protéines.**

Il s'agit d'un groupe diversifié qui fonctionnent via les interactions protéine-protéine. Il a été montré que le RR PhyR de *Methylobacterium extorquens*, impliqué dans la régulation de la réponse au stress général et la colonisation des plantes, présente un domaine effecteur qui lie une petite protéine appelée NepR. NepR est un facteur anti-sigma qui se fixe aux facteurs sigma et inhibe la transcription. Cette séquestration de NepR permet donc la transcription des gènes impliqués dans le stress général (Francez-Charlot et al. 2009).

## 4.2. Fonctions régulées par les TCS de *S. pneumoniae*

Le génome du pneumocoque code treize TCS et un RR orphelin hautement conservé (Throup et al. 2000) (**Figure 25**). Le HK et le RR sont généralement en opéron et présentent soit une configuration HK-RR soit RR-HK.



**Figure 25 : Représentation génomique des TCS de *S. pneumoniae***

(Gómez-Mejía et al. 2018)

Les flèches rouges représentent les HK alors que les flèches bleues représentent les RR. La direction des flèches montre le sens de la transcription.

HK à détection intramembranaire de 2 à 6 hélices avec de petites boucles extracellulaires	HK à détection intramembranaire de 6 hélices avec de petites boucles extracellulaires (quorum sensing)	HK avec un large domaine extracellulaire	HK avec un TMD, une petite boucle extracellulaire et un grand « linker » cytoplasmique suivi d'un domaine PAS
HK 01, 03, 08 et 11	HK 12 et 13	HK 04, 05, 06, 07, 09 et 10	HK 02

**Tableau 2 : Caractéristiques des HK composant les TCS de *S. pneumoniae***

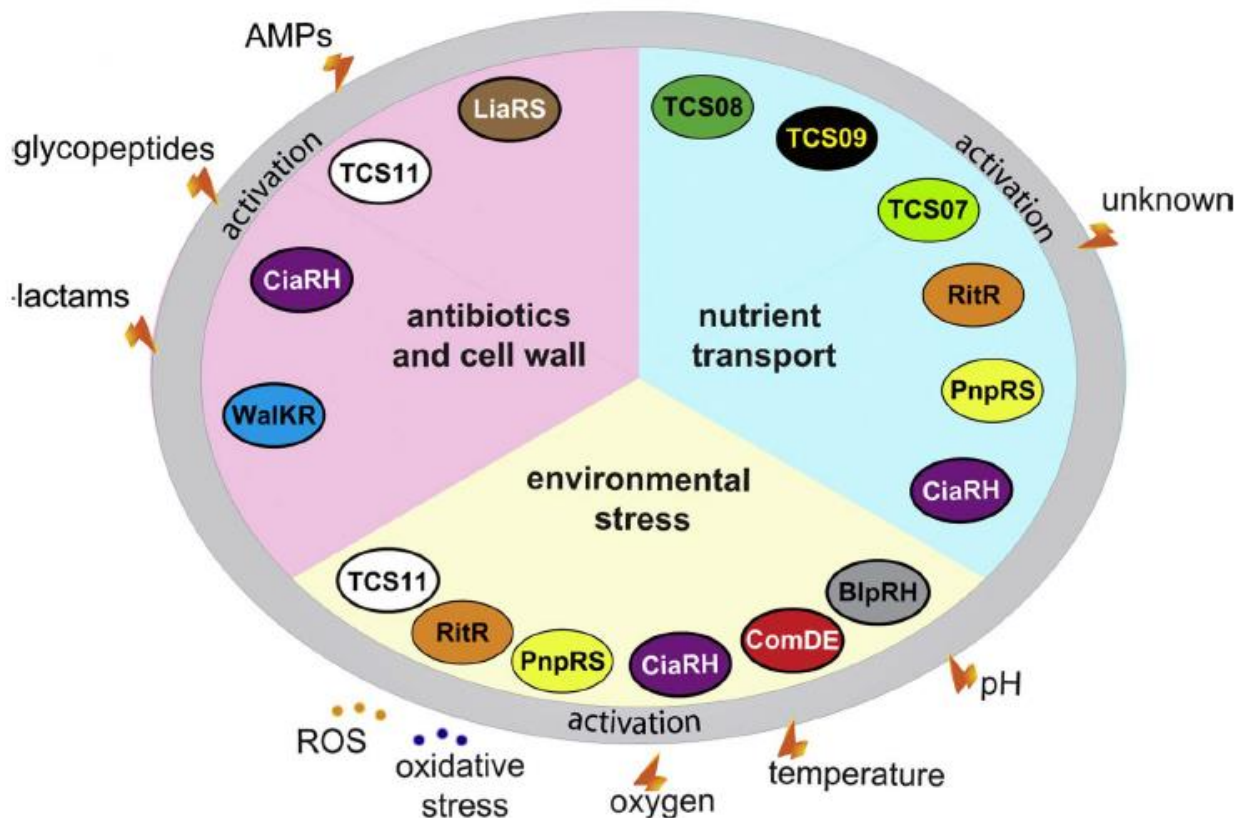
(D'après (Gómez-Mejia et al. 2018))

Famille <b>OmpR</b> avec un motif de liaison à l'ADN de type <b>wHTH</b>	Famille <b>NarL</b> avec un motif de liaison à l'ADN de type <b>HTH</b>	Famille <b>YesN</b> avec un motif de liaison à l'ADN de type <b>HTH-ARAC</b> (2 motifs HTH reliés par un linker)	Famille <b>LytR</b> qui ne présente pas un motif HTH mais un motif nommé <b>LytTR</b>
RR 01, 02, 04, 05, 06, 08, 10 et 14	RR 03 et 11	RR 07 et 09	RR 12 et 13

**Tableau 3 : Caractéristiques des RR composant les TCS de *S. pneumoniae***

(D'après (Gómez-Mejia et al. 2018))

Parmi les 13 couples de TCS découverts dans le génome de *S. pneumoniae*, sept d'entre eux (01, 05, 06, 07, 08, 09 et 13) ainsi que le RR14 ont été décrits comme jouant un rôle important dans la virulence de cette bactérie (Throup et al. 2000). A ce jour, les TCS05 et 12 sont les mieux caractérisés et sont impliqués dans la régulation de facteurs de virulence majeurs tels que la protéine HtrA (« high temperature requirement A »), l'antibiorésistance et la compétence bactérienne. Le TCS02 est aussi décrit comme étant impliqué dans la régulation de la compétence (**Figure 26**). Les TCS01, 10 et 11 sont les systèmes les moins bien caractérisés du pneumocoque. D'après les différents articles publiés à leurs propos, ils seraient peut-être impliqués dans la résistance aux antimicrobiens (Gómez-Mejia et al. 2018).



**Figure 26 : Schéma représentant le rôle des TCS du *S. pneumoniae* en réponse à des signaux environnementaux**  
(Gómez-Mejia et al. 2018)

#### 4.2.1. Compétence

La compétence est définie comme étant la capacité qu'a la bactérie d'intégrer dans son propre chromosome un ADN étranger. La compétence naturelle du pneumocoque a été mise en évidence par Griffith en 1928. Il a injecté à des souris vivantes un cocktail de pneumocoques non virulents et de pneumocoques virulents mais tués par la chaleur. A la suite de l'injection, les souris meurent et il découvre dans leur sang des pneumocoques virulents et vivants. Il en a déduit que les souches non virulentes ont acquis les propriétés virulentes des souches tuées par la chaleur (Griffith 1928). Cette compétence du pneumocoque lui permet d'acquérir des moyens de survie tels que la résistance aux antimicrobiens ou d'être plus virulent. Les TCS représentent un important système de contrôle de la compétence du pneumocoque.

Le TCS 12 encore appelé ComDE (opéron de compétence) est l'un des TCSs les mieux caractérisés. Il collabore avec un transporteur ABC (ComAB) et utilise le quorum sensing pour détecter, activer et contrôler la compétence bactérienne sous certaines conditions. En effet, ComC,



un peptide de signalisation de la compétence (CSP), est exporté par le transporteur ComAB (Gaustad et Morrison 1998). Ce peptide est une molécule autoinductrice. ComD détecte l'accumulation extracellulaire de ComC et déclenche la cascade de phosphorylations entraînant ComE à activer plusieurs gènes de compétence dont le transporteur ComAB (Martin et al. 2013). Il s'agit d'une boucle d'activation de compétence (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Le TCS05 encore appelé CiaRH (Competence Induction and Altered cefotaxime susceptibility) est l'un des TCS les mieux caractérisés du pneumocoque. Il est connu pour réprimer la compétence du pneumocoque. CiaRH active la surexpression du facteur de virulence HtrA qui dégrade le CSP extracellulaire grâce à son activité protéolytique (Cassone et al. 2012). De ce fait, CiaRH contrebalance l'activité de ComDE (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Le TCS02 porte aussi plusieurs autres noms tels que WalRK (nomenclature la plus utilisée), VicRK, YycFG, YycFG ou MicAB. Il serait impliqué dans la régulation de la compétence lorsque la concentration d'oxygène est basse. En effet, lorsqu'Echenique et ses collègues inactivent l'HK et activent constamment le RR grâce à une mutation phosphomimétique, ils remarquent une surexpression des gènes de compétence dans des conditions pauvres en oxygène. Les auteurs de cette étude suggèrent que WalRK détecte les signaux liés à la concentration d'oxygène (Echenique et Trombe 2001). Cependant, quatre années plus tard, deux autres groupes ont montré que l'absence du RR ou sa surexpression n'influent pas sur la compétence du pneumocoque (Mohedano et al. 2005; Ng et al. 2005). Avec ces différentes études dont les conclusions divergent, l'implication de WalRK dans la compétence est à ce jour non résolu.

Le TCS03 encore nommé LiaRS détecte le clivage des peptidoglycanes par des hydrolases impliquées dans l'autolyse du pneumocoque durant la compétence (Eldholm et al. 2010). Le TCS interagit avec une protéine LiaF. Cette dernière inhibe l'action de l'HK. Lorsque le peptidoglycane est clivé par LytA, CbpD et LytC, LiaF se détache de l'HK et permet à ce dernier de déclencher la cascade de phosphorylations qui active le RR. Le RR va moduler la réponse à ce stress et permettre la survie de la bactérie. La présence d'agents antimicrobiens tels que la bacitracine peut aussi provoquer la séparation de LiaF et de l'HK et induire l'activation du système LiaRS (Jordan et al. 2006). De ce fait, LiaRS détecte le stress causé par l'hydrolyse des peptidoglycanes et met en place la réponse adaptée (**Tableau 4** et **Figure 26**).

#### 4.2.2. Production de PAMs

De nombreuses bactéries produisent des PAMs pour coloniser leur niche écologique et tuer les microorganismes voisins comme mentionné dans le chapitre 2. Le pneumocoque produit

différentes bactériocines appelées pneumocines telles que BlpC, BlpN, BlpM et CibAB (Kjos et al. 2016).

La production de ces pneumocines est modulée par le TCS 13 encore appelé BlpRH qui sont, par la suite, exportées par le transporteur BlpAB. Il induit sa propre expression en utilisant le quorum sensing pour détecter le peptide autoinducteur BlpC (de Saizieu et al. 2000). Les pneumocines sont parfois produites lorsque les conditions de vie ne sont pas favorables. Lorsque la bactérie manque de nutriments ou est en présence de molécules antimicrobiennes, elle module ses mécanismes de compétence via les TCS ComDE et CiaRH induisant ainsi l'expression de ComDE, ComAB et de BlpRH (de Saizieu et al. 2000; Guiral et al. 2005). Dans ces conditions où le transporteur ComAB est surexprimé, il peut aussi exporter des pneumocines mais moins efficacement que BlpAB. ComE peut directement activer la transcription des gènes *blp* et le transporteur ComAB peut exporter le peptide BlpC en plus de ComC. Cela montre une étroite connexion entre le phénomène de compétence et la production de PAMs chez le pneumocoque (Wang et al. 2018) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

#### 4.2.3. Expression des facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont essentiels pour que la bactérie pathogène infecte son hôte. Le TCS06 encore appelé CbpRS contrôle l'expression de facteurs de virulence tels que les adhésines PspC et PspA (Standish et al. 2007). Les TCS03, 06, 08 et 09 sont impliqués de diverses manières dans la régulation du facteur de virulence Pilus-1. Le TCS08 régule aussi la protéine PavB qui est une adhésine importante impliquée dans le processus de colonisation de l'hôte par *S. pneumoniae* (Gómez-Mejia et al. 2018). Le TCS07 fait partie des TCS identifiés par Throup et ses collègues comme étant impliqué dans la virulence du pneumocoque (Throup et al. 2000). D'après Andreassen et ses collaborateurs, il détecte les glycanes de l'hôte et régule les protéines importantes pour le catabolisme des glycanes ainsi que l'import des glycanes libérés, augmentant ainsi la virulence du pneumocoque (Andreassen et al. 2020) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

#### 4.2.4. Stabilité de la membrane et résistance aux antimicrobiens

La membrane plasmique est un constituant vital de toutes cellules. Elle joue un rôle de protection et de maintien du compartiment intracellulaire. Chez les microbes, la paroi offre une protection supplémentaire. De ce fait, la membrane ainsi que la paroi microbienne constituent des cibles privilégiées pour les molécules antimicrobiennes. Les bactéries notamment le pneumocoque présentent alors des mécanismes de résistance aux antimicrobiens qui peuvent être régulés par des TCS.

Le TCS02 (WalRK) est le seul TCS à être indispensable à la survie du pneumocoque (Clausen et al. 2003). En effet, ce dernier régule l'expression de la protéine PcsB, une hydrolase importante pour la paroi bactérienne ainsi que la séparation des cellules filles (Bartual et al. 2014). Le TCS02 joue donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité cellulaire (**Tableau 4** et **Figure 26**).

CiaRH (TCS05) protège le pneumocoque lorsque des antimicrobiens inhibent la biosynthèse du peptidoglycane. Pour cela, il surexprime les gènes impliqués dans la biosynthèse du peptidoglycane et des acides téichoïques (Mascher et al. 2006) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

En 2000, Throup et ses collaborateurs ont montré que lorsque le TCS01 est délété, le pneumocoque est nettement moins virulent chez la souris, donc il est impliqué dans la pathogénicité du pneumocoque (Throup et al. 2000). Ce TCS est un homologue de BceRS impliqué dans la résistance de *B. subtilis* à la bacitracine (Becker et al. 2009). Toutefois, le TCS01 n'est pas affecté par la présence de la bacitracine ou d'autres PAMs (Majchrzykiewicz et al. 2010). Cependant, le rôle de ce TCS dans la résistance aux antimicrobiens n'a pas encore été établi et fait l'objet de mon sujet de thèse.

Le TCS10 appelé VncRS et le TCS11 sont aussi, à ce jour, très peu étudiés. Il a tout d'abord été proposé que VncRS soit impliqué dans la résistance à la vancomycine (Novak et al. 1999). Cependant, Haas et ses collaborateurs ont montré que ce n'était pas le cas (Haas et al. 2004) (**Tableau 4**). Dans une autre étude, Haas et ses collègues ont trouvé un lien entre le TCS 11 et la résistance à la vancomycine. Les auteurs ont comparé le profil d'expression du TCS dans des souches de pneumocoque sensible et résistante après un traitement à la vancomycine (Haas et al. 2005) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

#### 4.2.5. Réponse au stress environnemental

Détecter les changements environnementaux et établir la réponse adéquate est une propriété cruciale pour la survie de tout organisme vivant. Les bactéries subissent de nombreux stress environnementaux tels que le manque de nutriments, l'activité antibiotique ou le changement de température. Donc, elles doivent pouvoir répondre efficacement à ces changements.

Lorsque la bactérie subit des changements environnements qui induisent une instabilité de la membrane plasmique ou un mauvais repliement des protéines, le TCS05 (CiaRH) régule l'expression des chaperonnes et des protéines de choc thermique telles que HtrA (Cassone et al. 2012) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Le pneumocoque est aussi capable de résister au stress oxydant. Le TCS04 encore appelé PnpRS régule l'expression du transporteur ABC de manganèse PsaA. En effet, lorsque le TCS04 est absent, l'expression de PsaA ainsi que l'absorption du manganèse  $Mn^{2+}$  sont considérablement réduites. Le  $Mn^{2+}$  permet de détoxifier les cellules des ROS (Reactive Oxygen Species) tels que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . De ce fait, PnpRS est aussi impliqué dans la réponse au stress oxydant (Johnston et al. 2004; McCluskey et al. 2004) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Le RR14 appelé RitR (répresseur du transport de fer), est un régulateur de réponse dont le résidu aspartate est remplacé par une asparagine. Il est phosphorylé par StkP, l'unique sérine-thréonine kinase du pneumocoque. Le RR14 régule aussi le stress oxydant causé par les ROS, l'absorption de manganèse ainsi que le transport du fer (Ulijasz et al. 2009) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Une connexion a été trouvée entre le TCS 11 et le stress environnemental. En effet, ce TCS régule les gènes impliqués dans la formation de biofilm chez le sérotype 23F du pneumocoque lorsqu'il est soumis à la fumée de la cigarette (Cockeran et al. 2014) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Il a été montré dans une étude publiée en 2020, que le TCS01 était important pour la survie de *S. pneumoniae* dans les cellules infectées par le virus influenza. Il a été proposé que le TCS01 était impliqué dans la résistance du pneumocoque aux stress oxydant et acide liée à l'infection virale. D'après ces résultats, les auteurs de cette étude ont renommé le TCS01 par SirRH (Stress-Induced Response) où SirR désigne le RR et SirH l'HK (Reinoso-Vizcaíno et al. 2020). Toutefois, la fonction de ce TCS01 en absence d'infection virale est inconnue à ce jour.

#### 4.2.6. Absorption des nutriments

Les sucres sont un des nutriments les plus importants pour la bactérie. Les PTS (phosphoenolpyruvate phosphotransférase) sont des systèmes avec plusieurs composants qui prennent en charge le transport ainsi que le catabolisme des sucres.

Le TCS08 est impliqué dans le métabolisme de cellobiose (McKessar et Hakenbeck, 2007) ainsi que le transport et l'assimilation de nutriments essentiels tels que l'arginine ou la manganèse (Gómez-Mejía et al. 2018) (**Tableau 4** et **Figure 26**).

PnpRS (TCS04) régule l'absorption du  $Mn^{2+}$ . Le transport du fer ainsi que sa concentration cytoplasmique sont contrôlés par le RR14.

Les TCS régulent l'expression des gènes qui permettent à la bactérie de survivre dans un environnement donné. Toutefois, la plupart de ces TCS ne sont pas limités à un seul rôle et peuvent être impliqués dans plusieurs fonctions à la fois (**Tableau 4** et **Figure 26**).

Numéro des TCSs	Noms usuel	Fonctions
TCS01	SirRH (Stress-Induced Response)	Virulence, détection du stress et contrôle de la réponse adaptée pour la survie du pneumocoque dans l'hôte infecté par le virus influenza
TCS02	WalRK (nomenclature la plus utilisée), VicRK, YycFG, YycFG ou MicAB	Régulation de la compétence, indispensable à la survie du pneumocoque, maintien de l'intégrité de la paroi bactérienne
TCS03	LiaRS	Détection du stress causée par l'hydrolyse du peptidoglycane, compétence, régulation du facteur de virulence Pilus-1
TCS04	PnpRS	Réponse au stress oxydant, absorption du manganèse
TCS05	CiaRH	Répression de la compétence du pneumocoque, impliqué dans la virulence, réponse au stress environnemental, antibiorésistance
TCS06	CbpRS	Régule l'expression des facteurs de virulence
TCS07	/	Détection des glycanes de l'hôte et augmentation de la virulence
TCS08	/	Métabolisme de la cellobiose, régulation du facteur de virulence Pilus-1 et PavB, impliqué dans le transport et l'assimilation de nutriments essentiels
TCS09	/	Régulation du facteur de virulence Pilus-1
TCS10	VncRS	
TCS11	/	Résistance à la vancomycine, régulation du stress environnemental
TCS12	ComDE	Compétence
TCS13	BlpRH	Production de pneumocines
RR14	RitR	Régulation du stress oxydant causé par les ROS, l'absorption de manganèse ainsi que le transport du fer

**Tableau 4 : Nomenclature et fonction des TCSs et de RR14 de *S. pneumoniae***

## 5. Les transporteurs de peptides antimicrobiens

### 5.1. Généralités et classification des transporteurs de PAMs

Les bactéries ont développé de nombreux mécanismes leur permettant de se défendre contre l'action des peptides antimicrobiens. Toutefois, l'un des mécanismes de résistance les plus efficaces implique des transporteurs ABC. De manière intéressante, ces transporteurs ABC ont co-évolué avec des systèmes à deux composants qui régulent leur expression. Chez les *Firmicutes*, les transporteurs de PAMs sont divisés en cinq groupes en fonction de la prédiction de leur architecture (Gebhard 2012) (**Figure 27**). Le nom de chaque groupe provient de celui du membre le mieux caractérisé. On distingue :

#### 5.1.1. Le groupe SunT

Le groupe SunT représente les larges transporteurs ayant environ 700 acides aminés. Le TMD présente généralement cinq à six hélices TMs et est fusionné au NBD par son extrémité C-terminale. Du côté N-terminal, il existe un domaine peptidase de 39 acides aminés responsable du clivage de la séquence signal retrouvée sur les peptides substrats du transporteur (**Figure 27 A**). Ils ont donc un double rôle de maturation et sécrétion de peptides (Håvarstein et al. 1995). C'est le cas chez *B. subtilis* où le transporteur SunT clive le peptide signal de la sublancine 168 et puis l'exporte hors de la bactérie (Dubois et al. 2009). Toutefois, le groupe SunT ne transporte pas exclusivement des bactériocines mais aussi des peptides impliqués dans le quorum sensing. C'est le cas du transporteur ComAB de *S. pneumoniae* impliqué dans l'export du peptide ComC (CSP) déclenchant ainsi le phénomène de compétence (Gebhard 2012b; Hui et al. 1995). La protéine PCAT1 (« Peptidase-Containing ATP-binding Transporters ») produite par la bactérie *Clostridium thermocellum* est un transporteur homodimérique du groupe SunT cristallisée en 2015 (Lin et al. 2015). Grâce à son domaine peptidase, il clive le peptide signal et exporte un peptide antimicrobien de 66 acides aminés appelé Cthe\_0535 (CtA) (Smits et al. 2020).

Les transporteurs SunT sont régulés par des TCS ayant une HK avec six hélices TMs reliées par de petites boucles extracellulaires et un RR de la famille LytR ou de type XRE. Le TCS détecte les peptides exportés par le transporteur et induit l'expression de ce dernier (Mascher et al. 2006). En

effet, lorsque ComDE détecte la présence de ComC dans le milieu extracellulaire, il induit l'expression du transporteur ComAB.

### 5.1.2. Le groupe LanFEG

Les transporteurs de ce groupe comportent deux NBDs (LanF) et deux TMDs (LanE et LanG), chacun doté de six hélices TMs. Ils transportent les lantibiotiques de la membrane plasmique au milieu extracellulaire et participent ainsi à la protection des bactéries produisant ces peptides antimicrobiens (**Figure 27 B**). Certains de ces transporteurs peuvent être associés à la biosynthèse des lantibiotiques car ils sont codés dans un large opéron comprenant aussi les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces lantibiotiques. C'est le cas de la synthèse de la nisine chez *L. lactis*. Le spectre de substrats des transporteurs LanFEG est restreint et n'englobe que les peptides produits par les organismes dont ils sont issus ou les peptides présentant une structure similaire. Toutefois, les transporteurs ABC ne sont pas les seuls à protéger la bactérie, des protéines d'immunité telles que LanI ou LanH, liées à la membrane, jouent aussi ce rôle. Ces protéines d'immunité peuvent être codées sur le même opéron (Smits et al. 2020). De plus la résistance est accrue lorsqu'ils combinent leurs actions (Gebhard 2012).

Comme mentionné pour le premier groupe, les transporteurs de type LanFEG peuvent être régulés par des TCS ou des facteurs de transcription de type XRE.

### 5.1.3. Le groupe NisT

Le groupe NisT tire son nom du transporteur de la nisine (Kuipers et al. 2004). Ce groupe transporte des lantibiotiques sous leurs formes immatures car ils n'ont pas de domaine peptidase. Ils reconnaissent les séquences de signalisation de leurs substrats. Les peptides précurseurs sont ensuite clivés par une protéase située dans le milieu extracellulaire (Zheng et Sonomoto 2018). La spécificité de ce groupe NisT est déterminée par le peptide signal de leurs substrats. Le transporteur NisT peut transloquer des PAMs qui ne sont pas des lantibiotiques si ces derniers présentent un peptide signal identiques à celui de la nisine (Kuipers et al. 2004). Les transporteurs de type NisT sont des homodimères d'environ 600 acides aminés. Chaque monomère comporte un TMD et un NBD fusionnés (**Figure 27 C**).

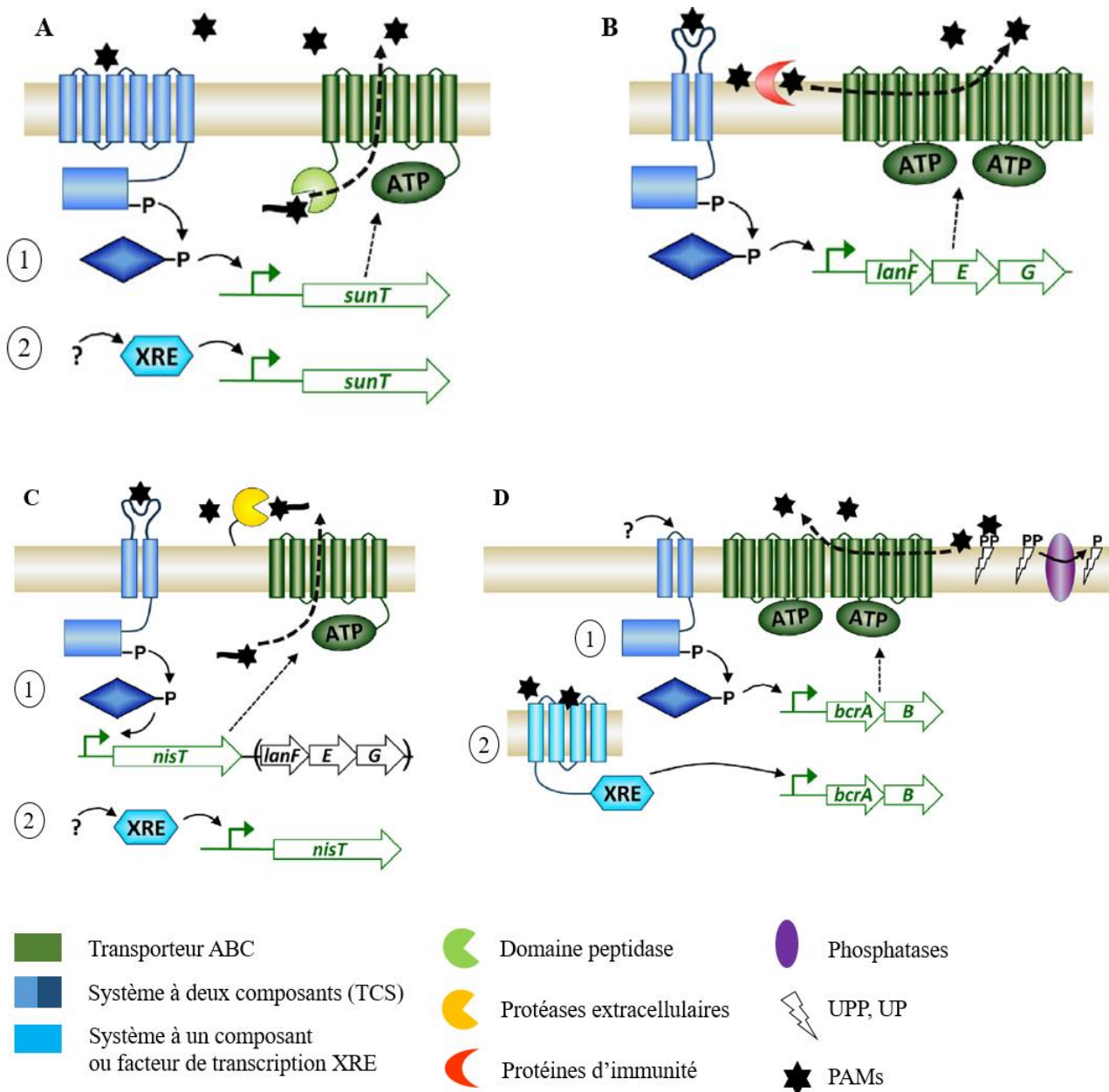
Les transporteurs de type NisT sont soit régulés par des TCS ayant une HK avec deux hélices TMs reliées par un domaine extracellulaire et un RR de la famille des OmpR soit par des régulateurs transcriptionnels de type XRE comme les transporteurs de type SunT. Toutefois, la régulation via le

TCS n'a été retrouvée que lorsque l'opéron contient aussi un transporteur de type LanFEG (Gebhard 2012).

#### 5.1.4. Le groupe BcrAB

Les transporteurs de type BcrAB sont des dimères constitués d'un TMD et d'un NBD dans chaque monomère. Ces transporteurs présentent un spectre très réduit car ils sont impliqués dans la résistance contre un PAM spécifique, la bacitracine. Chez *B. licheniformis*, bactérie productrice de la bacitracine, le transporteur BcrAB lui confère une protection contre son propre PAM (Gebhard 2012). La majorité des transporteurs de type BcrAB sont régulés par un TCS composé d'une HK à détection intramembranaire et d'un RR de la famille des OmpR. Toutefois, ce n'est pas le cas chez *E. faecalis*. En effet chez cette bactérie, le transporteur BcrAB est régulé par un système à un composant constitué de quatre hélices transmembranaires reliées dans la région C-terminale à un facteur de transcription de type XRE (**Figure 27 D**). Ce cas de figure concerne un tiers des transporteurs de ce groupe (Gauntlett et al. 2008). De plus, ces transporteurs sont co-traduits avec des phosphatases (UPPp) qui hydrolysent l'UPP en UP empêchant ainsi la bacitracine de se lier à sa cible.





### 5.1.5. Le groupe BceAB

Les transporteurs du groupe BceAB sont des protéines d'environ 650 acides aminés codés sur deux gènes. Un gène qui code pour les NBDs (BceA) et un gène codant le domaine transmembranaire (BceB) qui compte 10 hélices et un domaine extracellulaire d'environ 200 acides aminés situé entre les hélices 7 et 8 selon les prédictions de topologie (Gebhard 2012). Basé sur la TCDB (« Transport Classification DataBase »), les transporteurs de type BceAB appartiennent à la famille des Pep7E (Peptide-7-exporter). Ces transporteurs ont co-évolué avec des TCS du même type que ceux trouvés

dans le groupe BcrAB composé du senseur (BceS) et du régulateur de réponse (BceR) (Dintner et al., 2011). Les transporteurs ABC associés aux TCS sont impliqués dans la résistance contre certains PAMs. Parmi les différents groupes de transporteurs de PAMs, le groupe BceAB présente le plus large spectre de substrats englobant des lantibiotiques, des bactériocines, des glycopeptides, des défensines, des cathélicidines etc.

Le transporteur retrouvé chez *B. subtilis* est le mieux étudié de ce groupe d'où il tire son nom. Les caractéristiques de ce groupe de transporteurs ABC sont plus amplement discutées dans la partie suivante.

## 5.2. Le système de résistance BceRS-AB

Le système BceRS-AB est retrouvé dans de nombreuses bactéries *Firmicutes* dont *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pneumoniae*. Dans ces systèmes, le transporteur ABC est en général codé à proximité immédiate du TCS, en amont ou en aval avec toutefois certaines exceptions.

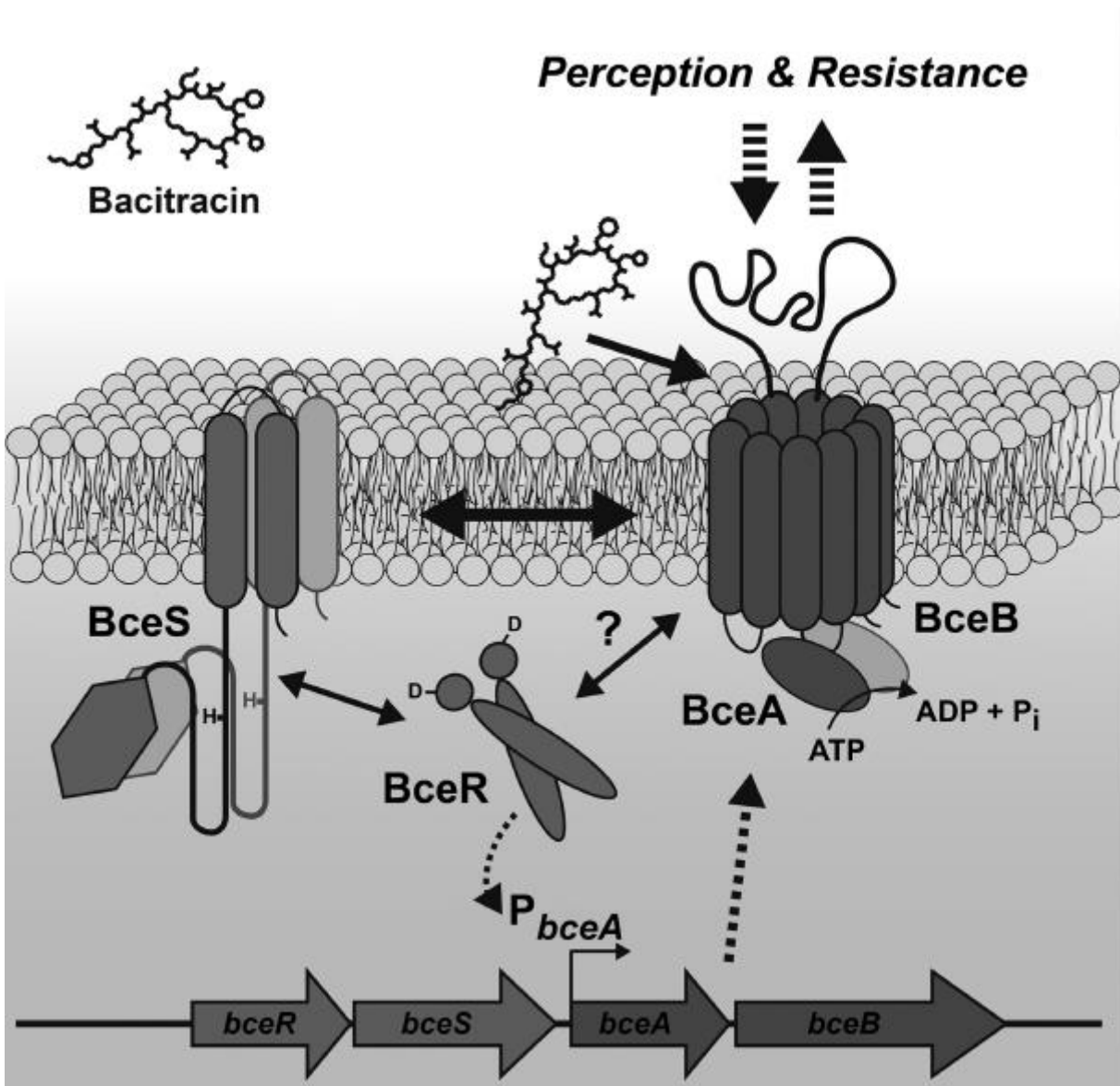
### 5.2.1. Chez *B. subtilis*

*B. subtilis* est une bactérie ubiquitaire généralement trouvée dans de nombreux biotopes. Il existe trois systèmes de résistance de type BceRS-AB chez *B. subtilis* : PdsRS-AB, YxdJK-LM et BceRS-AB. A eux trois, ils confèrent à la bactérie une résistance à des PAMs différents tant sur le plan structurel que mécanistique : bacitracine, nisine, LL-37, plectasine, actagardine, mersacidine, gallidermine, enduracidine. Ces molécules induisent l'expression des transporteurs ABC via une transduction du signal médiée par les TCS qui leur sont associés. Le mécanisme de détection de ces composés n'a pas encore été clairement établi. L'actagardine et la mersacidine sont des lantibiotiques structurallement très similaires, toutefois le système PdsRS-AB ne reconnaît que le premier. Ce même système est induit par l'enduracidine mais pas par la ramoplanine qui sont tous les deux des lipodepsipeptides. De ce fait, les systèmes BceRS-AB peuvent discriminer des composés de même origine ou de structures très similaires (Staroń et al., 2011). Le système YxdJK-LM est induit par LL-37, une cathélicidine humaine. Toutefois, *B. subtilis* étant une bactérie du sol, il est peu probable qu'elle soit suffisamment en contact avec LL-37 pour développer une résistance à ce PAM. Il est vraisemblable que LL-37 présente des similarités avec le substrat naturel de ce système qui n'a pas encore été identifié (Staroń et al., 2011).

Les systèmes de résistance de type BceRS-AB combinent des fonctions de détection du signal et de détoxification de la cellule. Généralement, les HK des TCS détectent les signaux environnementaux. Toutefois, dans le système BceRS-AB, les PAMs sont détectés par le transporteur ABC qui transmet l'information à l'HK (**Figure 28**). Bien que le mécanisme de ce transfert de signal n'est pas encore élucidé, il a été montré que l'hydrolyse de l'ATP au niveau du transporteur était indispensable au processus (Bernard et al., 2007; Rietkötter et al., 2008). Des analyses en double hybride ont montré que le TMD BceB ainsi que l'HK BceS interagissent directement. De plus, des expériences en résonance plasmonique de surface (SPR) démontré que BceB fixait la bacitracine liée à son co-facteur zinc ( $Zn^{2+}$ ) avec une très forte affinité de 60 nM (Dintner et al. 2014).

Actuellement, le mécanisme de résistance est débattu. Plusieurs hypothèses ont émergé au cours de ces dernières années : internalisation des composés antimicrobiens pour une dégradation dans le cytoplasme via des protéases (Rietkötter et al., 2008), extraction des PAMs de la membrane plasmique et expulsion dans le milieu extracellulaire (Reiners et al., 2017), translocation de l'UPP cible de certains PAMs, du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane (Kingston et al. 2014) ou protection de la cible par la dissociation (Kobras et al. 2020).

La stœchiométrie du transporteur BceAB est aussi une information essentielle dans la compréhension de son fonctionnement. Généralement, les transporteurs ABC présentent une dimérisation des TMDs permettant de créer le passage des composés transportés. Toutefois, le TMD BceB possède deux domaines FtsX entre les hélices TMs 2 – 4 et 8 – 10 nécessaires à la formation d'un canal de translocation des composés. Dintner et ses collaborateurs ont montré par chromatographie d'exclusion stérique et par quantification de l'intensité des bandes du transporteur sur un gel d'électrophorèse que la composition du transporteur BceAB était d'un TMD et deux NBDs. Cependant, ce transporteur purifié en détergents ne présente pas d'activité ATPase même en présence de substrats (Dintner et al. 2014). De ce fait, la question de la stœchiométrie de BceAB reste d'actualité.



**Figure 28 : Modèle de fonctionnement du module de résistance BceRS-AB**

(Dintner et al. 2014)

### 5.2.2. Chez *S. aureus*

*S. aureus* est une bactérie pathogène humaine qui cause de nombreuses infections nosocomiales. Elle présente de plus en plus de souches résistantes voire multi-résistantes à des agents antimicrobiens tels que les quinolones, les aminoglycosides, les  $\beta$ -lactamines, la bacitracine, la nisine. Il existe trois transporteurs ABC appartenant au groupe BceAB dans *S. aureus* : VraFG, VraDE et BraDE et trois TCS appartenant au groupe BceRS : GraRS, VraSR et BraRS.

Le transporteur VraFG, régulé par le TCS GraRS, participe à la résistance contre la polymixine B. En présence de polymixine B, GraRS active l'expression de du transporteur VraFG, de *MprF* et de l'opéron *dltABCD*. *MprF* et l'enzyme *dltABCD* augmentent respectivement les charges

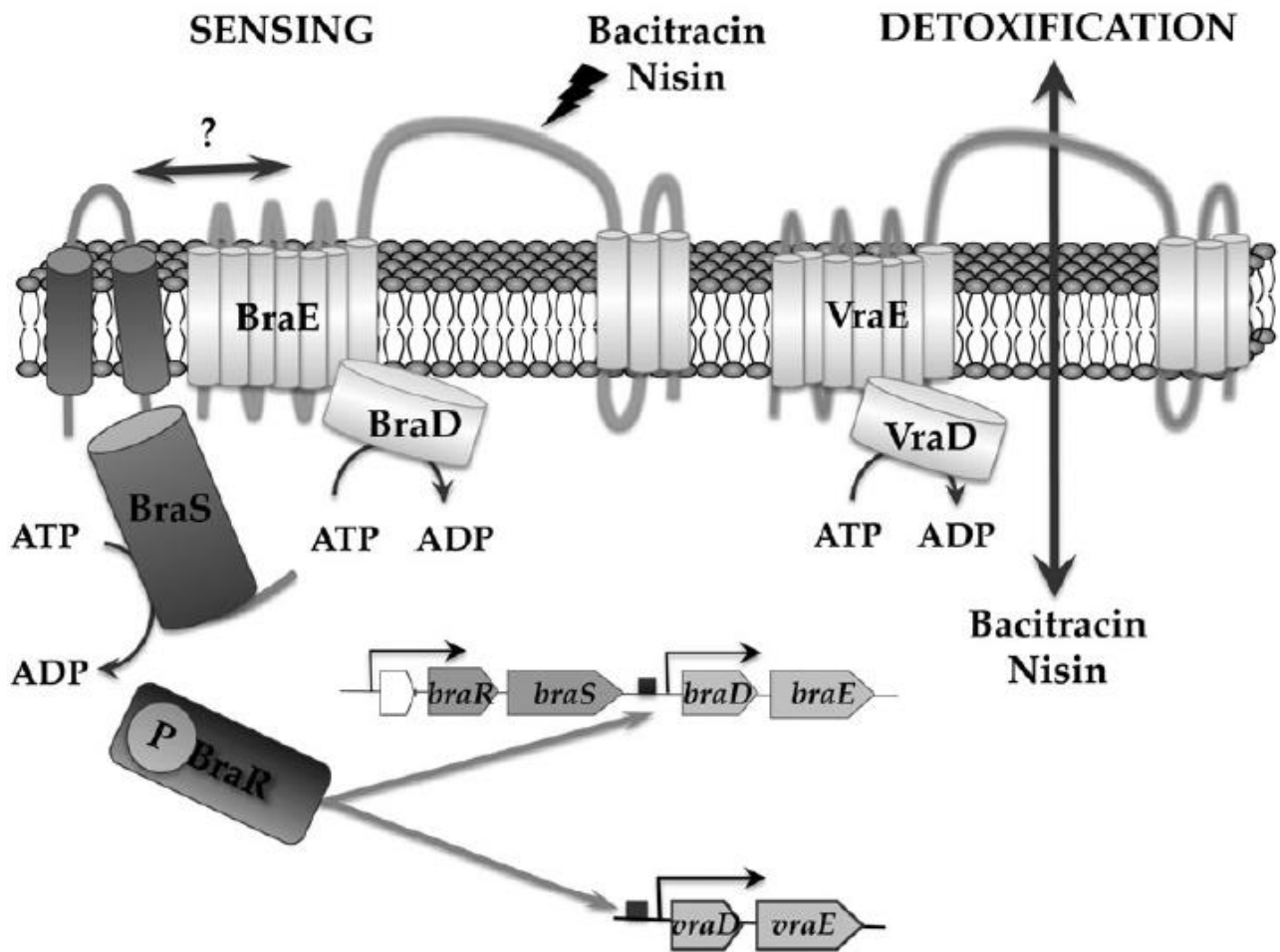
positives sur la surface bactérienne en greffant des lysines au niveau des phosphatidylglycérols de la membrane et en catalysant l'incorporation des D-alanines dans les acides téichoïques de la paroi. Le transporteur *VraFG* est peut-être impliqué dans l'export des PAMs ; toutefois, lorsqu'il est exprimé seul, il ne confère pas de résistance. De ce fait, Falord et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que *VraFG* détecte les PAMs et transmet le signal à *GraRS*. Des expériences de double hybride ont montré que *VraG* interagit directement avec *GraS* en présence d'une protéine soluble inconnue, *GraX*, qui agit comme un important co-facteur de ce système. Il en résulte que *VraFG*, *GraRS* et *GraX* forment un système à cinq composants impliqué dans la détection, la transduction du signal et la résistance de *S. aureus* aux PAMs cationiques (Falord et al. 2012).

Le TCS *VraSR* est un détecteur important des troubles de l'homéostasie de la membrane cellulaire et de la paroi bactérienne. Il est surexprimé dans les souches MRSA résistantes à la daptomycine entraînant ainsi, par différentes régulations, une baisse de la virulence de ces souches (Taglialegna et al. 2019). Le TCS *VraSR* ainsi que le transporteur *VraDE* sont surexprimés en présence de PAMs tels que la temporine L, l'ovispirine-1 et la dermaseptine mais la délétion de *VraDE* ne rend pas *S. aureus* plus sensible à ces PAMs (Pietiäinen et al. 2009).

En présence de bacitracine et de nisine, le TCS *BraRS* active la transcription de deux transporteurs de type *BceAB* : *BraDE* et *VraDE*. Ces transporteurs jouent chacun un rôle spécifique. *BraDE* détecte les PAMs et transmet le signal à *BraSR*. Ce dernier active la transcription des gènes codant *BraDE* et *VraDE*. Il s'ensuit la détoxification de la cellule médiée par *VraDE* (Hiron et al. 2011) (**Figure 29**). Il a aussi été montré que le transporteur *VraDE* doit interagir avec une protéine à deux hélices transmembranaires nommée *VraH* pour résister à la gallidermine et à la daptomycine formant ainsi un système de détoxification à trois composants (Popella et al. 2016). Toutefois, la raison pour laquelle *VraH* est recrutée spécifiquement dans la résistance contre ces deux PAMs n'est pas encore élucidée.

En 2011, Hiron et ses collègues ont montré que le domaine extracellulaire des transporteurs de type *BceAB* détecte les PAMs. Pour cela, ils ont utilisé deux transporteurs de type *BceAB* de *S. aureus* ayant plus de 30% d'identité : *VraFG* et *VraDE*. *VraFG* n'est pas impliqué dans la résistance à la bacitracine mais dans la résistance à la colistine. A l'inverse, le transporteur *VraDE* permet la détoxification de la bacitracine dans la bactérie. Ils ont construit une chimère où ils ont remplacé le domaine extracellulaire de *VraFG* par le domaine extracellulaire de *VraDE*. Cette construction est introduite dans une souche *S. aureus* délétée au niveau du gène codant le transporteur *VraDE* ( $\Delta$ *vraDE*). Cela a permis de restaurer la résistance à la bacitracine. Lorsque cette même construction est introduite dans une souche de *S. aureus*  $\Delta$ *vraFG*, la résistance à la colistine n'a pas été restaurée

alors que lorsque l'on complémente la souche *S. aureus*  $\Delta$ vraFG avec le transporteur VraFG non muté la résistance à la colistine est restaurée. Les auteurs en ont conclu que le domaine extracellulaire confère à la bactérie la spécificité dans la résistance aux PAMs (Hiron et al. 2011).



**Figure 29 : Module contrôlant la détection de la bacitracine et de la nisine et leur résistance dans *S. aureus***

(Hiron et al. 2011)

### 5.2.3. Chez d'autres *Firmicutes*

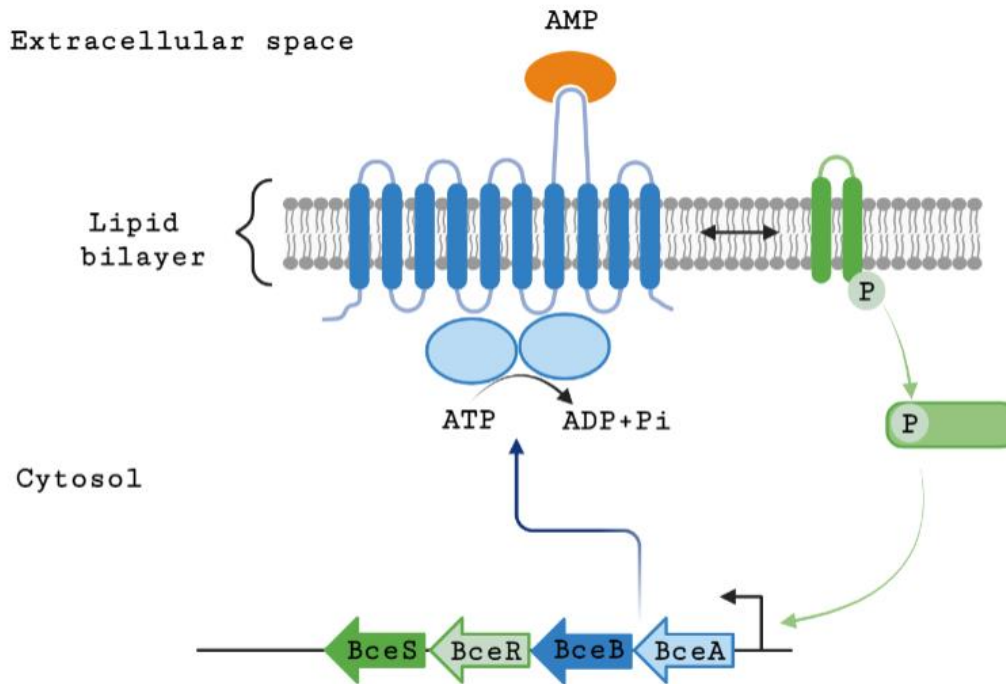
Comme mentionné au début de cette partie, de nombreuses bactéries *Firmicutes* arborent un système BceRS-AB.

*S. agalactiae* encore appelé streptocoque du groupe B est un pathogène opportuniste qui colonise les voies digestives et génito-urinaires. Cette bactérie cause des infections invasives chez les nouveau-nés par la transmission maternelle. *S. agalactiae* présente un système NsrFP-RK où NsrFP est le transporteur ABC et NsrRK est le TCS. Toutefois, ce système englobe en plus une protéase nommée SaNSR qui inactive la nisine en clivant les six derniers acides aminés. La structure de cette

protéase a été obtenue à une résolution de 2,2 Å (Khosa et al. 2016). Ce système confère la résistance à des lantibiotiques tels que la nisine et la gallidermine (Khosa et al. 2013; Reiners et al. 2017). Selon Reiners et ses collaborateurs, le transporteur NsrFP détoxifie la bactérie en expulsant les PAMs. Cela a été montré en comparant les quantités de nisine retrouvées dans les surnageants de culture des bactéries surexprimant NsrFP sauvage et son mutant inactif (Reiners et al. 2017). Le TCS induit l'expression du transporteur en présence des PAMs substrats (Yang et al. 2019).

*E. faecalis* est une bactérie commensale que l'on retrouve dans le microbiote intestinal des animaux et des humains. Il cause des infections opportunistes en particulier chez les patients immunodéprimés. Cette bactérie présente un système de détoxification de la bacitracine similaire à celui de *S. aureus*. En effet, le TCS EF0926-27 régule deux transporteurs ABC : EF2752-51 et EF2050-49. Le transporteur EF2752-51 détecte la bacitracine et transmet l'information au TCS EF0926-27. Ce dernier induit la transcription des deux transporteurs à des niveaux différents. Le transporteur EF2050-49 qui détoxifie la cellule est plus fortement induit que le transporteur EF2752-51 (Gebhard et al. 2014).

Chez *S. mutans*, une bactérie commensale de la cavité buccale qui cause les caries humaines, la résistance à la bacitracine est médiée par le système MbrAB-CD où MbrAB est le transporteur ABC et MbrCD est le TCS. Le transporteur ainsi que le TCS sont localisés sur le même opéron (Tsuda et al. 2002) (**Figure 30**). De ce fait, en présence des PAMs substrats, le TCS induit sa propre expression et celle du transporteur ABC entraînant ainsi la résistance de la bactérie (Kitagawa et al. 2011; Ouyang et al. 2010). Le système MbrAB-CD permet à la bactérie *S. mutans* de résister à la bacitracine, à l'histatine 5 mais aussi à des défensines telles que  $\alpha$ -défensine 1,  $\beta$ -défensines-3 et le LL-37 (Tian et al. 2018).



**Figure 30 : Module contrôlant la détection des PAMs et leur résistance chez *S. mutans***

(D'après (Ouyang et al. 2010; Kitagawa et al. 2011))



La figure a été réalisée à l'aide du site <https://biorender.com/>

#### 5.2.4. Chez *S. pneumoniae*

De toutes les protéines prédites dans le génome de *S. pneumoniae*, le TCS01 présente les plus grands pourcentages d'identité avec le TCS BceRS (BceR 43% et BceS 28%) de *B. subtilis* et avec le TCS MbrCD (MbrC 41% et MbrD 32%) de *S. mutans*. Contrairement aux différents systèmes BceRS-AB précédemment présentés, les gènes codant le transporteur ABC BceAB et le TCS BceRS sont distants de 0,64 Mb dans le génome de *S. pneumoniae* (Becker et al., 2009).

Dans la souche R6, lorsque le transporteur ABC SPR0812-0813 est tronqué au niveau de la région C-terminale du TMD, *S. pneumoniae* présente une plus grande sensibilité à la bacitracine mais une résistance à la vancoresmycine. L'inactivation de ce transporteur rend le pneumocoque environ cinq fois plus sensible à la bacitracine (Becker et al. 2009).

Dans la souche D39, l'analyse des ARNm a été réalisée après un traitement à différents PAMs : nisine, bacitracine et LL-37. Les résultats ont montré que des TCS ainsi que des transporteurs



ABC dont SPD0804-0805 pourraient être impliqués dans la résistance à certains de ces PAMs. En effet, le transporteur SPD0804-0805 (voir **Tableau 5** pour la nomenclature dans les différentes souches) est surexprimé environ neuf à treize fois en présence de bacitracine et de nisine alors qu'en présence de LL37, le TMD SPD0805 est seulement surexprimé 1,9 fois tandis que le NBD SPD0805 n'est pas significativement exprimé. Des expériences de détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC) ont aussi montré que la délétion du transporteur SPD0804-0805 rend le pneumocoque sensible à la nisine et à la bacitracine mais pas au LL-37. Ces différents résultats combinés ensemble ont permis aux auteurs de conclure que le transporteur SPD0804-0805 était nécessaire à la résistance à la bacitracine et à la nisine mais pas au LL-37 (Majchrzykiewicz et al. 2010).

Ces résultats ont permis de montrer que le transporteur SPD0804-0805 (**Tableau 5**) était impliqué dans la résistance aux PAMs. Toutefois, de nombreuses questions restent en suspens telles que le mécanisme de résistance, les différents composants impliqués, le sens du transport des substrats ainsi que leurs mécanismes de détection. Des expériences ont été réalisées à ce sujet dans le cadre de ma thèse.

	<b>R6</b>	<b>TIGR4</b>	<b>D39</b>
<b>HK</b>	SPR1473	SP_1632	SPD1445
<b>RR</b>	SPR1474	SP_1633	SPD1446
<b>ABC</b>	SPR0812	SP_0912	SPD0804
<b>TMD</b>	SPR0813	SP_0913	SPD0805

**Tableau 5 : Nomenclature des gènes codant le transporteur BceAB et le TCS BceRS dans différentes souches de *S. pneumoniae***

En amont du gène SPR0812-0813, sur le même opéron, est codé un petit peptide de 36 acides aminés, annoté SPR0811a par Becker et ses collègues, dont la fonction est inconnue. Cependant ce type de gène est particulier au pneumocoque car il n'a été retrouvé dans aucun autre système BceRS-AB à ce jour (Becker et al. 2009). Ce peptide pourrait être lié fonctionnellement au transporteur ABC, et nous avons réalisé des expériences au cours de ma thèse pour le déterminer.

## 6. Organismes modèles d'étude de la virulence de *S. pneumoniae*

L'expérimentation animale est un outil essentiel dans la compréhension des infections microbiennes. De nombreux modèles animaux sont utilisés pour déterminer les mécanismes d'action des facteurs de virulence des bactéries pathogènes, tester l'efficacité des médicaments et des vaccins.

Cependant, depuis de nombreuses années, des objections dénonçant l'utilisation des animaux dans la recherche scientifique sont de plus en plus importantes. De ce fait, en 2010, un traité signé à Amsterdam déclare que chaque projet de recherche nécessitant des expérimentations animales doit avoir une autorisation au préalable.

## 6.1. Modèles animaux vertébrés

### 6.1.1. Souris

La souris est l'animal le plus fréquemment utilisé dans l'étude de la pathogénicité du pneumocoque. Toutefois, cette bactérie n'est pas retrouvée naturellement dans le nasopharynx des souris (Thevaranjan et al. 2016). Ainsi, l'infection pneumococcique doit être induite par des injections contenant la bactérie. Il y a plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur les résultats de l'infection et occasionner de grandes variabilités d'un laboratoire à un autre.

Le nombre de bactéries inoculé est important car il faut injecter une quantité précise préalablement définie. En effet, si le nombre de bactéries est trop important, l'infection tuera le modèle avant que l'on ne étudier les effets induits. Dans le cas où la quantité de bactéries inoculées est faible, l'infection ne s'étendra pas car le système immunitaire de la souris aura le temps de se débarrasser des éléments étrangers.

La méthode d'inoculation des bactéries est aussi très importante pour l'obtention des résultats et l'interprétation des données. Il existe différents types d'injections : intrapéritonéale (IP), intratrachéale (IT), intraveineuse (IV), intranasale (IN), intrabronchiale (IB), intramusculaire (Borsa et al. 2019). Certains de ces moyens d'administration des bactéries nécessitent des procédures chirurgicales invasives. Les injections IT et IN, utilisées dans l'étude de l'infection pulmonaire, nécessitent une anesthésie de la souris par aérosol qui peut influencer les résultats de l'infection bactérienne. De ce fait, le choix de la molécule anesthésiante doit être mûrement réfléchi. Les injections IP et IV sont utilisées pour l'étude de la pneumonie et de la septicémie. Chaque méthode d'inoculation présente des avantages comme des inconvénients. Par exemple, les injections IT, IN et IB, même si elles nécessitent une anesthésie qui peut compliquer l'interprétation des résultats, permettent de déposer les pneumocoques directement dans les voies respiratoires ce qui est idéal pour induire des infections avec des sérotypes moins virulents.

L'infection bactérienne par aspiration est la plus communément utilisée car elle est rapide et ne nécessite pas de procédures chirurgicales invasives comme mentionnées précédemment. De plus, cette méthode mime la voie d'infection naturelle chez les humains (Chiavolini et al. 2008).

La lignée de l'hôte est aussi un caractère majeur à prendre en compte car plusieurs lignées de souris peuvent réagir différemment à une même injection bactérienne. L'âge des souris influe sur leur sensibilité à l'infection. Généralement, les jeunes souris de 6 à 14 semaines sont utilisées. En effet, si on compare les durées de vie entre l'humain et la souris, une année de vie humaine correspond approximativement à 9 jours dans la vie d'une souris (Dutta et Sengupta, 2016). Des études ont montré que des groupes de souris avec des âges différents présentent des réponses variées aux infections à pneumocoques (Borsa et al. 2019).

Certaines souris ont été créées pour étudier l'impact des conditions de comorbidité dans le développement et la progression des infections à pneumocoques. Il peut s'agir de l'intoxication à l'alcool (Siggins et al. 2011) ou de l'induction de l'emphysème, une maladie pulmonaire qui détruit la paroi des alvéoles (Tokairin et al. 2008).

### 6.1.2. Rat

L'utilisation des rats dans l'étude des infections à pneumocoques est beaucoup moins courante que celle des souris. Le nombre de rats testés risque d'être moins importants, ce qui peut entraîner des problèmes de statistiques. Ayant une plus grande taille, les rats présentent l'avantage de supporter l'injection d'une plus grande quantité de bactéries pathogènes. Les lignées de rats les plus utilisées dans les expériences sont les suivantes : Wistar, un rat albinos hybride, Sprague Dawley, un rat dérivé de Wistar qui est calme et facile à prendre en charge et le rat CD qui est très utilisé dans la recherche en toxicologie. Les injections IT, IB et intrapulmonaires (IPu) sont généralement utilisées (Chiavolini et al. 2008).

L'utilisation des rats comme modèle animal a permis de mesurer la quantité de bactéries nécessaire pour causer une infection, de montrer le rôle de la pneumolysine dans la virulence du pneumocoque, d'étudier la différence de virulence entre les sérotypes, l'efficacité de nouveaux antibiotiques et le développement de l'infection bactérienne chez des individus qui ne sont pas en parfaite santé (Davis et al. 1991).

### 6.1.3. Lapin et autres rongeurs

Les modèles lapin sont généralement utilisés pour étudier la pneumonie, la septicémie, la progression des infections ainsi que l'efficacité des médicaments. Les lapins New Zealand blancs sont les plus utilisés en recherche (Mapara et al. 2012).

Les chinchillas, des mammifères rongeurs, sont des modèles utilisés dans l'étude des otites (Giebink 1999) et la pharmacocinétique de certaines molécules telles que les céphalosporines (Ganzinger et Haslberger, 1985). Cependant ces modèles animaux coûtent cher.

#### 6.1.4. Porc

Le porc est un modèle animal apprécié du fait de sa similarité avec les humains en termes d'anatomie, de génétique et de physiologie (Meurens et al. 2012). Ce modèle est utilisé pour mimer les effets de la pneumonie. De plus, le porc peut développer une pneumonie similaire à l'humain causée par un pathogène porcin appelé *Streptococcus suis*. Le modèle porcin permet d'étudier les VAP (ventilator-associated pneumoniae) qui nécessite que l'animal soit sérieusement malade et placé sous détresse respiratoire (Marquette et al. 1999). Le porc est aussi très utile en recherche et les expérimentations de vaccins.

#### 6.1.5. Primates non humains

L'utilisation des primates non humains qui incluent les babouins, les chimpanzés et les singes comme modèles animaux est très limitée de par son coût et des problèmes éthiques que cela pose. Les primates non humains présentent des similarités avec les humains sur le plan des méthodes thérapeutiques, de prévention et de diagnostic. Ce qui fait qu'ils sont utilisés dans les test de nouveaux médicaments ainsi que des vaccins. Cependant, le pneumocoque n'est pas naturellement présent chez ces primates (Borsa et al. 2019). Toutefois, lorsqu'on leur inocule des pneumocoques, ils développent les mêmes symptômes que les humains dus à une infection des voies respiratoires inférieures. Les modèles primates permettent de corréliser la quantité de bactéries inoculée et l'apparition d'une infection sévère.

De nombreux modèles animaux vertébrés sont utilisés pour étudier la virulence du pneumocoque. Toutefois, l'utilisation de ces modèles peut se révéler chère, les expériences longues et difficiles à mettre en place et poser de sérieux problèmes d'éthique. C'est pour ces raisons que l'utilisation de modèles animaux invertébrés est de plus en plus fréquente.

## 6.2. Modèles animaux invertébrés

### 6.2.1. *Galleria mellonella* (*G. mellonella*)

*G. mellonella* est une larve de papillon d'environ 2 cm utilisée comme modèle d'étude de l'interaction hôte-pathogène. A son stade larvaire, *G. mellonella* est très nuisible pour les abeilles car elle se nourrit des rayons de cire des ruches. Elle présente de nombreux avantages : une reproduction

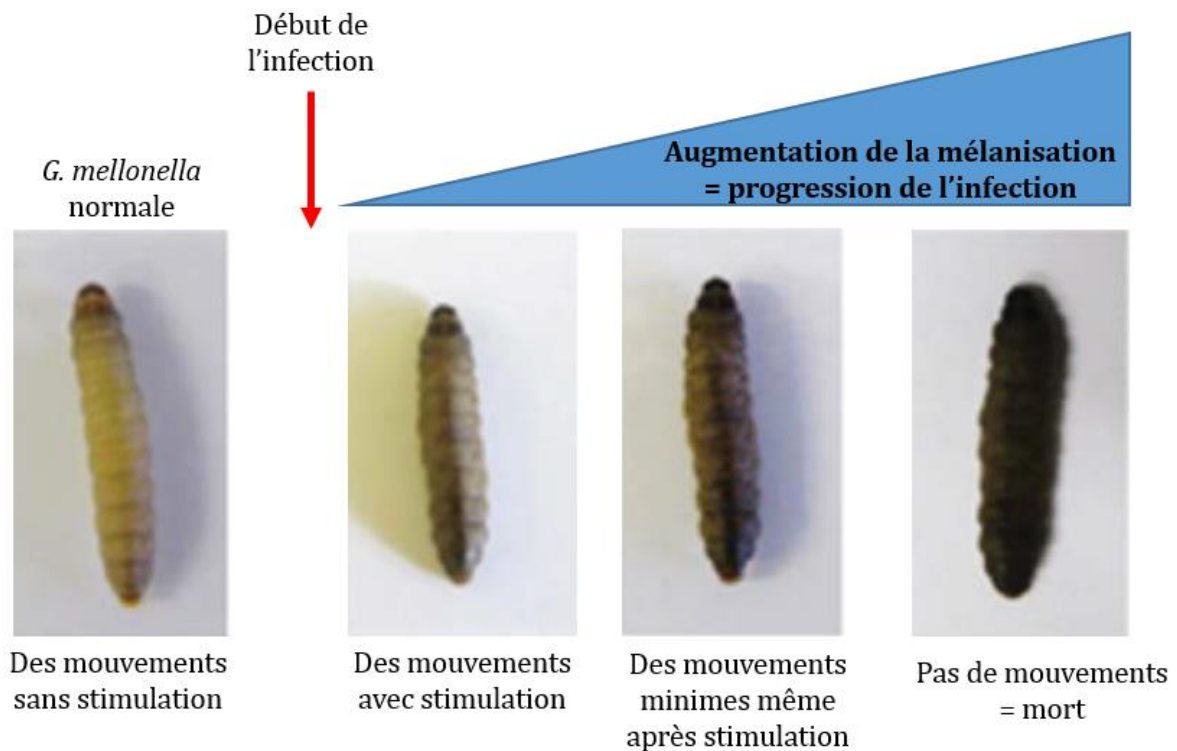
rapide, un impact financier faible, elle peut être facilement achetée chez des vendeurs d'appâts de pêche et possède un système immunitaire inné similaire à celui des mammifères (Pereira et al. 2018). De plus, le génome de ces larves a été complètement séquencé (Lange et al. 2018). Les larves peuvent parfaitement vivre à 37 °C qui est la température de survie de nombreux pathogènes bactériens humains. De plus, les insectes ne ressentent pas la douleur car ils n'ont pas de nocicepteurs. Donc, ils ne sont pas soumis à la même législation que les animaux vertébrés (Tracey 2007). Pour toutes ces raisons, nous avons utilisé ce modèle pour étudier l'infection causée par des souches sauvage et mutantes de *S. pneumoniae* lors de cette thèse.

Lorsque les bactéries pénètrent dans la larve, tout un système de défense immunitaire se met en place : la production de PAMs, la phagocytose des bactéries ainsi que la mélanisation. Cette dernière est la manifestation visible de la progression de l'infection car les larves deviennent de plus en plus noires (Tsai et al. 2016) (**Figure 31**).

Pour inoculer les bactéries dans *G. mellonella*, deux méthodes sont utilisées : l'ingestion de la solution bactérienne dans le tube digestif de la larve par voie orale et l'injection des bactéries dans le dernier proleg gauche grâce à une aiguille Hamilton.

*G. mellonella* séduit à bien des égards car elle permet un criblage rapide en différenciant le niveau de virulence entre plusieurs bactéries ou différentes souches d'une même bactérie en comptant le nombre de morts ou les degrés de mélanisation. C'est le cas de la différence de virulence entre les souches R6, D39 et TIGR4 de *S. pneumoniae* (Evans et Rozen, 2012). La reproduction interne des pathogènes peut aussi être suivie en recueillant et en cultivant sur des boîtes de pétri le contenu des hémolymphe. L'efficacité des molécules antimicrobiennes peut être testée (Tsai et al. 2016).

La durée de vie des larves est un facteur limitant de ce modèle animal. Au bout de 20 jours, les larves initient leurs transformations en papillons. De ce fait, seule l'étude des stades précoces des infections est possible.



**Figure 31 : Les différents stades de l'infection de *G. mellonella***  
(D'après (Tsai, Loh, et Proft 2016))

### 6.2.2. Drosophile

La drosophile est une petite mouche utilisée comme un organisme modèle dans l'étude des voies moléculaires impliquées dans la réponse immunitaire (Boyer et al. 2012). Il s'agit d'un excellent modèle d'étude des pathogènes bactériens tels que le pneumocoque. La drosophile présente trois types de réponses immunitaires. L'immunité humorale consiste à sécréter des molécules capables de tuer les bactéries telles que les PAMs, la mélanisation et la phagocytose. Lorsque la drosophile est infectée par des pneumocoques, elle augmente son activité de phagocytose pour tuer les bactéries et arrêter la progression de l'infection (Chambers et al. 2012).

### 6.2.3. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

*C. elegans* est un petit ver nématode non parasitaire d'environ un millimètre de long qui est utilisé depuis les années 1960 comme organisme modèle en laboratoire. C'est un organisme facile et peu cher à utiliser pour étudier la pathogénicité ainsi que les facteurs de virulence de bactéries à Gram positif telles que *S. pneumoniae*. Les sérotypes virulents du pneumocoque tuent le ver. Toutefois, le processus de colonisation des bactéries ainsi que la manière utilisée pour tuer l'hôte ne sont pas encore

clairement établi (Garsin et al. 2001). Toutefois, il a aussi été montré que *S. pneumoniae* peut tuer le nématode en produisant du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jansen et al. 2002). Cependant, cet état de fait peut être évité grâce à des injections de catalase.

Il existe des inconvénients à utiliser *C. elegans* pour étudier des pathogènes bactériens humains. Ces vers vivent à des températures comprises entre 15 et 25 °C alors que les pathogènes humains vivent à 37 °C, la température corporelle. *C. elegans* ne présente pas de système d'immunité adaptative et à ce jour, aucune répllication de pathogènes dans son organisme n'a été montrée (Cools et al. 2019)

## 7. Outils nécessaires à l'étude des protéines membranaires

Les protéines membranaires jouent des rôles essentiels dans le transport de nutriments, le relai de l'information, la régulation métabolique cellulaire, la détoxification. Généralement, les protéines membranaires représentent un quart à un tiers du protéome des cellules. Au vu de leurs implications dans de nombreux processus biologiques importants, elles représentent plus de la moitié des cibles des médicaments.

L'étude des protéines membranaires comporte différents défis qu'il faut surmonter pour comprendre les relations structure-fonction existantes.

### 7.1. Systèmes d'expression

Les protéines membranaires ne sont pas assez abondantes naturellement pour les extraire et étudier leurs fonctions et leurs structures. De ce fait, la quantité requise pour faire l'étude de ces protéines doit être obtenue par la surexpression dans un système hétérologue. Exprimer une protéine membranaire est le 1<sup>er</sup> défi à relever lors de son étude. Dans la majeure partie des cas, les protéines membranaires étudiées ne sont pas exprimées dans l'organisme où ils sont naturellement produits. Des organismes modèles bactériens, eucaryotes ou un système cell-free sont généralement utilisés. Bien qu'il existe différents systèmes d'expression, seul l'expression des protéines en système bactérien sera développée dans le cadre de cette thèse.

Les bactéries sont généralement utilisées pour l'expression des protéines recombinantes. En effet, elles présentent un faible coût de production, une accessibilité à de nombreux outils de la biologie moléculaire pour l'expression de la protéine d'intérêt et une relative facilité d'utilisation expérimentale. Cependant, les bactéries ne disposent pas de la capacité de modifier post-

traductionnellement les protéines. Cela peut se révéler très contraignant pour les protéines d'origine eucaryote, car les modifications post-traductionnelles sont souvent importantes pour leurs fonctions.

Pour exprimer une protéine d'intérêt, il faut d'abord l'insérer dans un plasmide sous le contrôle d'un promoteur inductible par une molécule donnée. Le promoteur doit être fort c'est-à-dire qu'il doit être capable d'exprimer la protéine d'intérêt à un niveau satisfaisant. Ces inducteurs peuvent être des sucres comme l'arabinose, des composés chimiques comme l'éthanol, l'IPTG (IsoPropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside) qui est un analogue de l'allolactose, des hormones comme l'œstradiol, des antimicrobiens tels que la nisine etc. Le plasmide est, à la suite d'une transformation, introduit dans la bactérie préalablement rendue compétente. Une culture bactérienne est réalisée jusqu'à ce que la densité cellulaire soit suffisante puis, l'ajout de l'inducteur à une concentration donnée déclenche la synthèse de la protéine d'intérêt.

L'un des organismes les plus utilisés en laboratoire pour la production de protéines recombinantes est la bactérie *E. coli* qui est devenu au fil des années un organisme modèle car elle a été beaucoup étudiée (Hockney 1994).

#### 7.1.1. Expression chez *Escherichia coli* (*E. coli*)

*E. coli* est une bactérie commensale à Gram négatif qui représente 80% du système digestif humain. Elle a été découverte dans le côlon grâce aux travaux du médecin allemand Theodor Von Escherich.

Il existe de nombreuses souches d'*E. coli* qui sont utilisées pour exprimer les protéines recombinantes. Ci-dessous, quelques exemples de souches sont décrites :

##### 7.1.1.1. La souche BL21 (DE3)

La souche BL21 (DE3) de *E. coli* est capable de produire de grandes quantités de protéines recombinantes (Studier et Moffatt 1986). De prime abord, elle a été développée pour la surexpression de protéines solubles. Cette souche est modifiée de telle sorte que les gènes codant pour les protéases Lon et OmpT soient délétés. Elle possède le prophage lysogénique  $\lambda$ DE3 qui comporte le gène codant l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur LacUV5 inductible par l'IPTG. Le promoteur  $P_{lacUV5}$  diffère du promoteur lac natif grâce à la présence de trois mutations situées dans la région -10 du promoteur et dans le site de liaison de CAP/Camp. Ces mutations ont rendu le promoteur  $P_{lacUV5}$  plus fort et insensible à la répression catabolique (Schlegel et al. 2015). Le plasmide contenant le gène de la protéine d'intérêt possède aussi un gène LacI ainsi qu'un opérateur Lac.

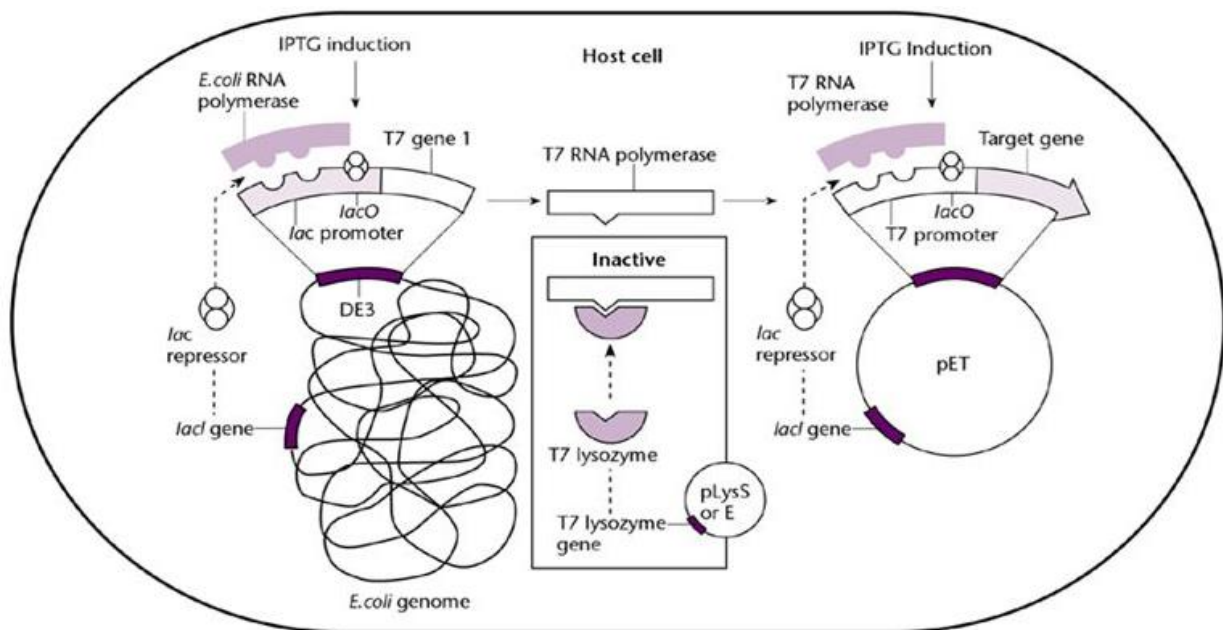


En absence d'IPTG, le gène *lacI* synthétise des répresseurs Lac qui se lient à l'opérateur Lac empêchant ainsi la synthèse de l'ARN polymérase T7 et de la protéine recombinante. Après ajout d'une quantité donnée d'IPTG, ce dernier se fixe aux répresseurs Lac et détache le répresseur de l'opérateur Lac. De ce fait, l'ARN polymérase de *E. coli* peut se fixer sur le promoteur P<sub>lacUV5</sub> et induire l'expression de l'ARN polymérase du phage T7. Ce dernier va, par la suite, se lier spécifiquement au promoteur T7 situé sur le plasmide et induire l'expression de la protéine d'intérêt (Studier et al. 1990) (**Figure 32**).

Théoriquement, ce système possède la particularité de verrouiller l'expression du gène d'intérêt en absence d'inducteur. Toutefois, ce verrou n'est pas complètement étanche et des fuites d'expression surviennent fréquemment. L'un des moyens utilisés pour empêcher ces fuites est le lysozyme T7 qui inhibe naturellement l'ARN polymérase T7 résiduelle en absence d'inducteur. Cette enzyme est codée par les vecteurs pLysS ou pLysE avec des quantités plus ou moins importantes (Studier 1991).

Bien que la souche BL21 (DE3) ait permis d'obtenir d'importants niveaux d'expression, la surexpression de certaines protéines membranaires n'est pas possible à cause de la toxicité que peut engendrer la protéine d'intérêt (Dumon-Seignovert et al. 2004; Studier et al. 1990). En effet, lorsque l'on surexprime en quantité importante les protéines membranaires, il peut arriver plusieurs évènements (Drew et al. 2003). Le système de translocation Sec est submergé et de nombreuses protéines qui ne sont pas adressées à la membrane vont s'agréger et former des corps d'inclusion (Wagner et al. 2008). Les chaperonnes sont saturées et ne peuvent pas aider à replier toutes les protéines disponibles, rendant ces dernières non fonctionnelles.

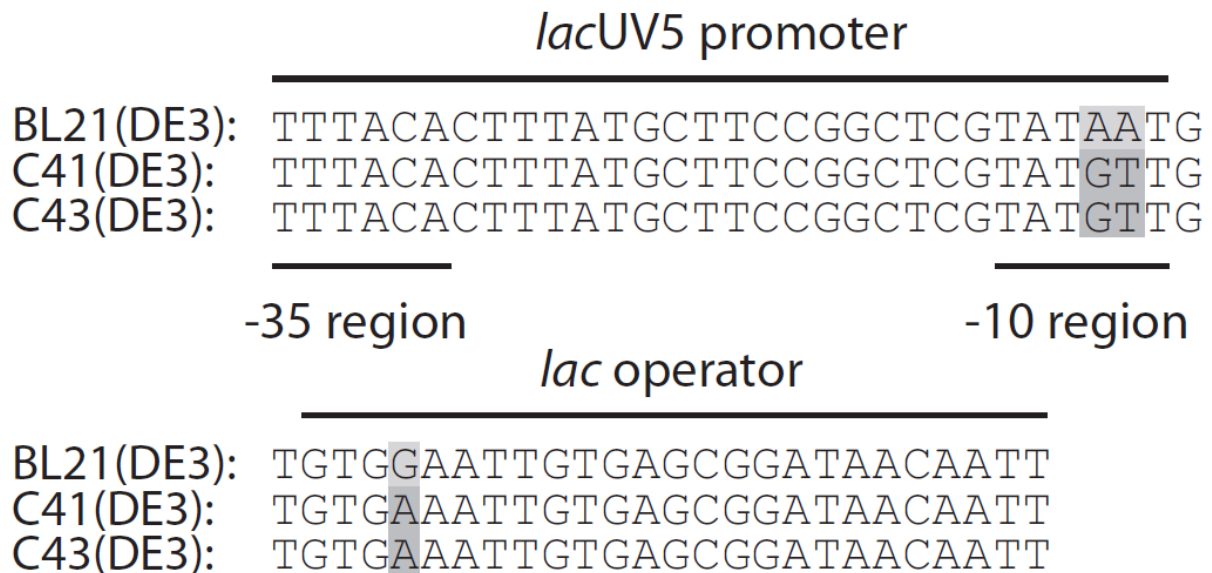
Au vu de tous les problèmes rencontrés durant une surexpression de protéines recombinantes, d'autres souches ont été sélectionnées à partir de la souche BL21 (DE3) permettant ainsi de trouver la bonne balance entre la force du promoteur et le niveau de traduction (Samuel Wagner et al. 2007).



**Figure 32 : Système d'expression T7-Lac inducible par l'IPTG**  
(Primrose et Twyman 2006)

#### 7.1.1.2. Les souches C41 (DE3), C43 (DE3), C44 (DE3) et C45 (DE3)

Les souches C41 (DE3) et C43 (DE3) ont été obtenues grâce à une sélection faite à partir des souches BL21 (DE3). En effet, les docteurs Miroux et Walker ont surexprimé dans les souches BL21 (DE3) des protéines membranaires et globulaires. Ils ont constaté que lorsque l'induction de l'expression protéique est enclenchée, la plupart des bactéries meurent donc la surexpression de ces protéines est toxique pour l'hôte. Parmi les bactéries survivantes, ils ont sélectionné une souche mutante nommée C41 (DE3) qui pousse à saturation. Toutefois, lorsque le niveau d'expression est très élevé, une partie des protéines se retrouvent dans des corps d'inclusion sans présenter d'effets toxiques pour la cellule. La souche C41 (DE3) présente des mutations au niveau du promoteur  $P_{lacUV5}$  qui le rendent moins fort que les promoteurs  $P_{lacUV5}$  et  $P_{lacWT}$  (**Figure 33**). Ce promoteur est donc appelé  $P_{lacWeak}$  (Baumgarten et al. 2017). Toutefois, certaines protéines continuent à demeurer toxiques même avec la souche C41 (DE3). De ce fait, une souche double mutante nommée C43 (DE3) a été sélectionnée à partir de la souche précédente (Miroux et Walker, 1996). La souche C43 (DE3) possède, en plus des mutations trouvées dans la souche C41 (DE3), des mutations au niveau du gène codant *lacI* (**Figure 33**). De ce fait, le répresseur LacI muté se lie plus fermement à l'opérateur Lac induisant ainsi une meilleure régulation de l'ARN polymérase T7 (Baumgarten et al. 2017).



**Figure 33 : Mutations observées au niveau du promoteur *lacUV5* et de l'opérateur *lac* des souches BL21 (DE3), C41 (DE3) et C43 (DE3)**

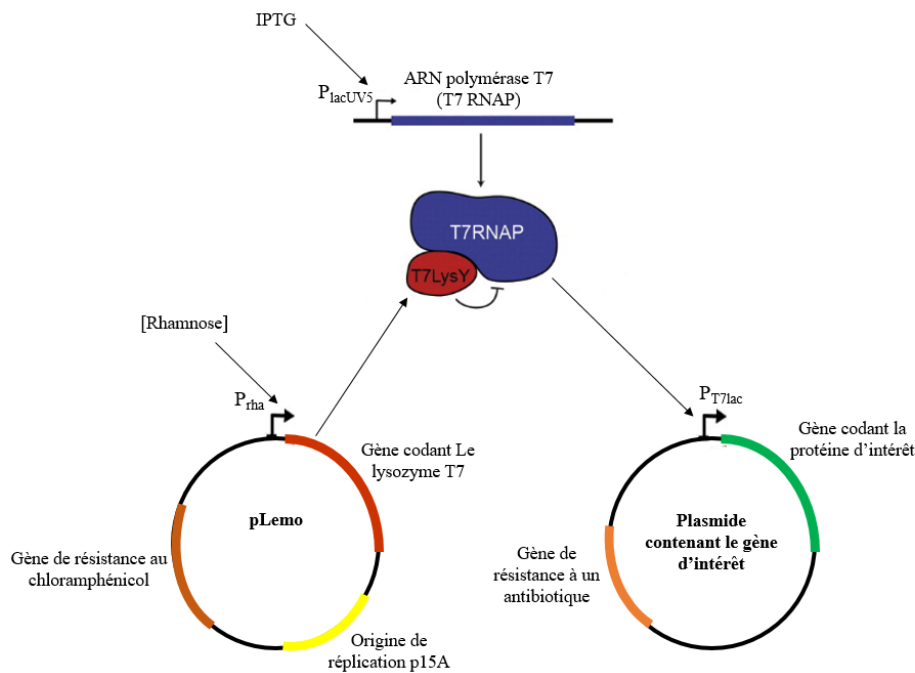
(Wagner et al. 2008)

Les souches C44 (DE3) et C45 (DE3) ont, elles aussi été sélectionnées à partir des souches BL21 (DE3). Elles présentent un codon stop dans le gène codant l'ARN polymérase T7 (soit localisé avant les 3 domaines catalytiques pour la souche C45(DE3) ou juste après le domaine catalytique B pour la souche C44 (DE3)) produisant ainsi une protéine tronquée inactive. Toutefois, comme la souche BL21 (DE3) présente une faible activité suppressive des codons stop, la souche est toujours capable de produire de petites quantités d'ARN polymérase T7. De ce fait, les souches C44 (DE3) et C45 (DE3) peuvent produire, replier et adresser les protéines d'intérêt à la membrane et empêcher aussi la toxicité due à une importante production de ces protéines (Angius et al. 2018).

#### 7.1.1.3. Les souches Lemo21 (DE3)

Grâce aux données montrant que les mutations au niveau du promoteur  $P_{lacUV5}$  régulaient l'expression de l'ARN polymérase T7 et amélioreraient ainsi l'expression des protéines membranaires, la souche Lemo21 (DE3) a été mise au point par Wagner et ses collaborateurs (Wagner et al. 2008). Il s'agit d'une autre souche dérivée de la souche BL21 (DE3). Dans cette souche, l'activité de l'ARN polymérase T7 est contrôlée par l'expression de son inhibiteur naturel, le lysosyme T7. Le gène codant le lysozyme T7 est localisé sur un plasmide et est sous le contrôle d'un promoteur inductible par le rhamnose. Plus la concentration de rhamnose est élevée, plus la quantité de lysosyme T7 exprimée est grande, induisant ainsi une inhibition importante de l'activité de l'ARN polymérase. Avec ce système, il est possible de réguler l'expression de la protéine d'intérêt et de réduire leur toxicité

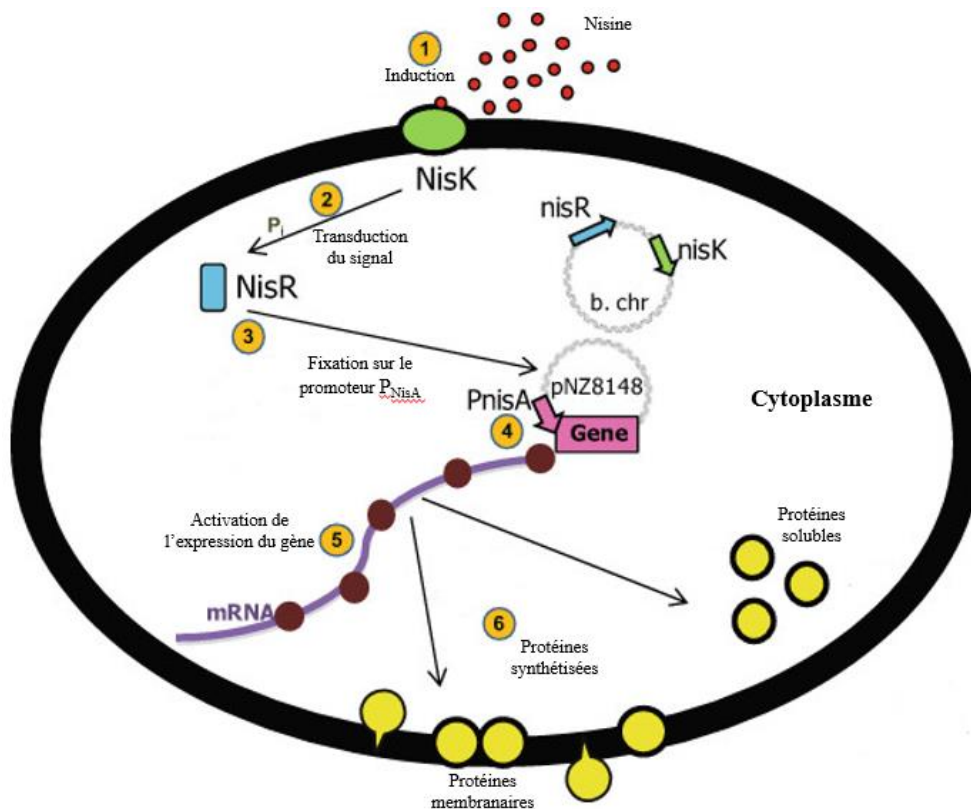
potentielle en modulant la quantité d'ARN polymérase T7 disponible (Schlegel et al. 2012) (**Figure 34**).



**Figure 34 :**  
**Fonctionnement des**  
**souches Lemo21**  
**(DE3)**  
 (D'après (Schlegel et al. 2012))

### 7.1.2. Expression chez *Lactococcus lactis* (*L. lactis*)

*L. lactis* est une bactérie à Gram positif comme *S. pneumoniae*. Travailler dans ce système présente l'avantage d'offrir à la protéine d'intérêt un environnement d'expression qui s'approche de sa bactérie native. La souche NZ9000 de *L. lactis* est un système d'expression contrôlé par la nisine et qui repose sur un système à deux composants NisK – NisR intégré au locus *pepN*. La nisine se lie à l'histidine kinase NisK qui s'autophosphoryle puis transfère le phosphate sur le régulateur de réponse NisR. Ce dernier est un facteur de transcription pouvant se fixer sur le promoteur  $P_{NisA}$  (en amont du gène d'intérêt) et induire l'expression de la protéine recombinante (Pontes et al. 2011) (**Figure 35**).



**Figure 35 : Système d'expression protéique inductible par la nisine chez *L. lactis***  
(D'après (Bakari et al. 2014))

## 7.2. Extraction

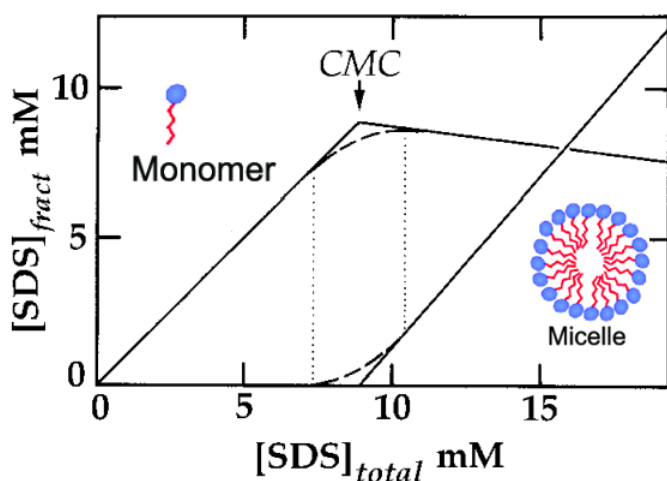
Après avoir exprimé les protéines membranaires à une quantité suffisante, puis avoir vérifié qu'elles étaient bien adressées à la membrane, il faut extraire ces protéines de leur environnement natif pour les étudier. En effet, les protéines membranes sont intrinsèquement insolubles dans un milieu aqueux. Les protéines membranaires créent des interactions hydrophobes avec les constituants de la bicouche lipidique, de ce fait, leur extraction va se révéler être une étape difficile car ces protéines seront très instables durant le processus. L'un des premiers moyens adoptés pour solubiliser les protéines membranaires est l'utilisation de détergents. Par la suite, d'autres techniques d'extraction des protéines membranaires ont vu le jour.

### 7.2.1. Utilisation des détergents

Les détergents sont des molécules amphiphiles dotées d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe. Les têtes polaires peuvent être chargées ou neutres. Les queues hydrophobes s'insèrent dans la membrane, perturbent la bicouche lipidique et extraient la protéine membranaire.

Dans un environnement aqueux, les détergents sont capables de former des structures particulières appelées micelles selon des conditions données pour minimiser le contact avec l'eau.

Lorsque la concentration de détergents est en dessous de la concentration micellaire critique (CMC), les détergents sont sous la forme de monomères. Lorsque la concentration de détergents augmente et dépasse la CMC, la quantité de détergents en monomères se stabilise et les détergents en excès s'organisent en micelles (**Figure 36**). Dans les micelles, les têtes des détergents sont en contact avec le milieu aqueux tandis que les queues hydrophobes interagissent à l'intérieur du milieu pour former un environnement qui n'est pas accessible à l'eau. Les détergents solubilisent les protéines membranaires en créant une imitation de l'environnement de la bicouche lipidique. La CMC est un paramètre qui change d'un détergent à un autre et qui dépend de plusieurs paramètres tels que la température, le pH, la force ionique et la taille de la queue hydrophobe (le Maire et al. 2000). La CMC baisse avec la longueur de la chaîne hydrophobe du détergent et augmente avec l'introduction de doubles liaisons.



**Figure 36 : Caractéristiques des détergents**

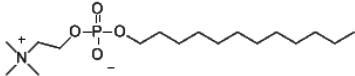
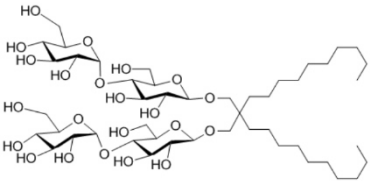
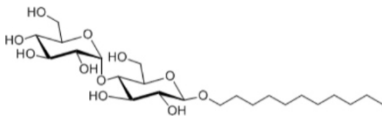
(D'après (Garavito et Ferguson-Miller, 2001))

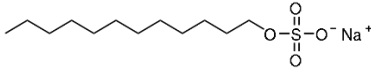
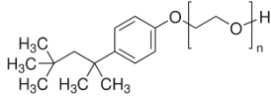
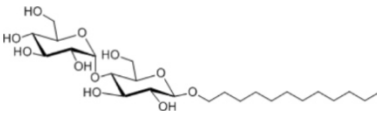
Il existe différentes manières de classer les détergents mais, généralement, ils sont regroupés en fonction de la nature de leur tête polaire (**Tableau 6**). On distingue :

- Les **détergents ioniques** portent soit une charge négative (anionique) comme le SDS ou une charge positive (cationique). De par leur caractère polaire, ces détergents sont très efficaces pour extraire les protéines membranaires de leur bicouche lipidique mais conservent moins bien la fonctionnalité de la protéine. Ils ont tendance à les dénaturer. De plus, ils ont une forte CMC, de ce fait, une grande quantité de détergents sera nécessaire pour la solubilisation. Toutefois, dans certains cas, il est possible de renaturer les protéines en utilisant par la suite un autre type de détergent ou en introduisant la protéine dans un environnement lipidique. C'est le cas de la bactériorhodopsine (Booth et al. 1995).
- Les **détergents neutres** ne présentent pas de charge. C'est le cas par exemple du LMNG, de l'UDM, du DDM, du triton X-100. Ce sont des détergents capables d'extraire les

protéines membranaires de leur environnement naturel sans perturber leur structure native car ils ont plus tendance à rompre les interactions lipide-lipide ou les interactions lipide-protéine plutôt que les interactions protéine-protéine. C'est pour ces raisons que Vanaken et ses collaborateurs ont utilisés en 1986 le terme de « détergents doux » pour les qualifier (Vanaken et al. 1986). Contrairement aux trois autres détergents cités, le LMNG présente une double chaîne hydrophobe qui rappelle la structure des phospholipides que l'on retrouve naturellement dans les membranes (Chae et al. 2010). Cette particularité confère au LMNG la capacité de préserver la plupart du temps, la fonctionnalité des protéines qu'ils solubilisent (Stetsenko et Guskov, 2017; Breyton et al., 2019)

- Les **détergents zwitterioniques** possèdent à la fois une charge négative et une charge positive. Dans ce groupe, on retrouve le CHAPS et les détergents de type Fos-choline tels que la FC-12. Ces derniers ont une structure similaire à la phosphatidylcholine (PC) qui est un constituant majeur de la membrane des mammifères (van Meer et de Kroon, 2011). La FC-12 est très efficace pour l'extraction de protéines mais peut s'avérer délétère pour la fonctionnalité de nombreuses protéines (Chipot et al. 2018). Toutefois, c'est un groupe de détergents qui est largement utilisé dans les études structurales des protéines membranaires.

Détergents	Structure	CMC (mM), H <sub>2</sub> O	Type de détergent
FC-12 (Fos-choline 12)		1,5	Zwitterionique
LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)		0,01	Neutre
UDM (n-Undecyl-β-D-Maltopyranoside)		0,59	Neutre

SDS (Sodium DodecylSulfate)		7	Ionique
Triton X-100 (Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether)		0,5	Neutre
DDM (n-Dodecyl-β-D-Maltoside)		0,17	Neutre

**Tableau 6 : Structures et caractéristiques de quelques détergents**

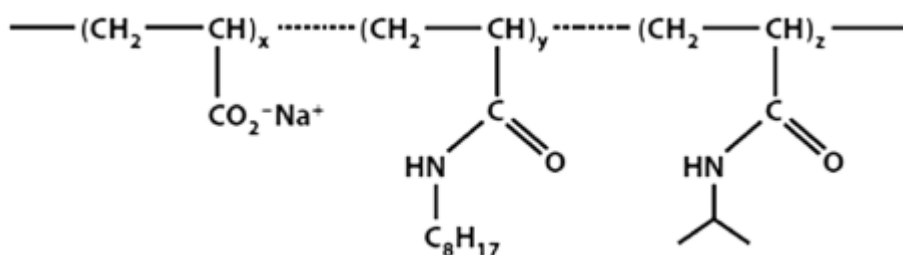
Pour solubiliser les protéines membranaires, un excès de détergent est toujours utilisé (souvent 1%). Cet excès de détergents complique l'étude structurale et fonctionnelle de ces protéines car ils forment des micelles libres dans la solution. De ce fait, différentes méthodes ont été mises en place pour s'affranchir de ces molécules de détergents excédentaires. La dilution de la concentration des détergents à une valeur inférieure à celle utilisée lors de la solubilisation permet la désintégration des micelles libres qui pourront être éliminés grâce à la dialyse. La chromatographie sur une colonne de Nickel permet de purifier les protéines dotées d'une étiquette histidine mais aussi d'échanger le tampon de solubilisation riche en détergents par un tampon avec une concentration plus faible de détergents. Les billes de polystyrène (Bio-Beads SM2) peuvent extraire les détergents, ce qui est notamment utilisé pendant les processus de reconstitution en lipides. Les molécules de détergents s'adsorbent sur les billes qui sont par la suite enlevées de la solution protéique grâce à une centrifugation à basse vitesse. D'autres techniques comme la chromatographie d'exclusion stérique qui séparent les macromolécules selon leurs tailles peuvent aussi être utilisées.

Les détergents permettent de solubiliser, purifier et même cristalliser des protéines membranaires. Cependant, bien que les détergents essaient de mimer les bicouches lipidiques, ils en sont encore loin. De plus, il peut arriver que certaines molécules de détergents abolissent l'activité des protéines membranaires. De ce fait, des alternatives à ces détergents traditionnels, moins délétères pour les protéines ont été mises en place.



## 7.2.2. Utilisation des amphipoles

Les amphipoles sont de courts polymères linéaires et amphiphiles du fait de la présence de chaînes alkylamines (Zoonens et Popot, 2014) (**Figure 37**). Ce sont des surfactants qui peuvent se substituer aux détergents et stabiliser les protéines membranaires en solution sous la forme d'un petit complexe (Popot et al. 2011). En 1996, Tribet et ses collaborateurs ont montré que les amphipoles étaient capables de maintenir des protéines membranaires dans une solution aqueuse (Tribet et al. 1996).



**Figure 37 : Structure de l'amphipol A8 – 35**

(Zoonens et Popot, 2014)

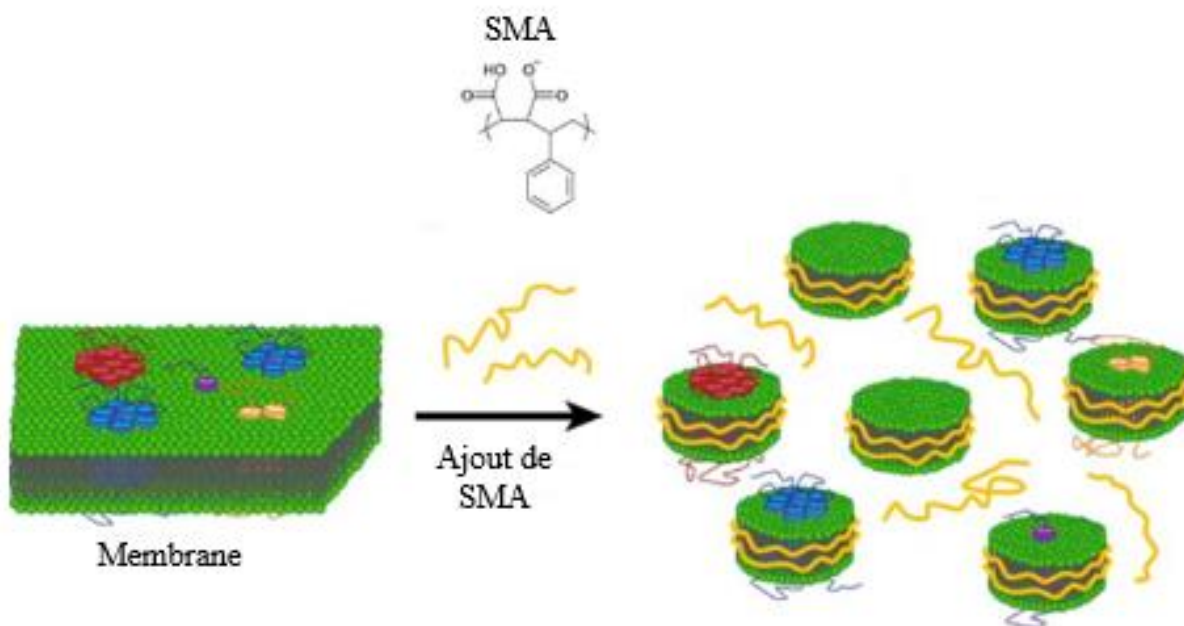
L'amphipole A8-35 est le premier à avoir été validé et c'est aussi le mieux caractérisé à ce jour. Sa solubilité est due à la présence de carboxylates. Généralement, les détergents sont utilisés pour extraire les protéines de la membrane et les purifier. Par la suite, les amphipoles sont utilisés pour piéger les protéines membranaires et remplacer en majorité les molécules de détergents (Popot et al. 2003). De plus, plusieurs études, dont celle citée précédemment, ont montré que certaines protéines membranaires conservent leurs activités après un traitement par ces polymères.

Les amphipoles peuvent être utilisés pour aider au repliement des protéines membranaires. Cela a été le cas pour la porine OmpA d'*E. coli* et la bactériorhodopsine (Pocanschi et al. 2006). En présence d'amphipoles, la quantité de bactériorhodopsine produite dans un système cell-free est plus importante et la majorité des protéines sont solubilisées (Park et al. 2011). De plus, les amphipoles ont permis de résoudre de nombreuses structures de protéines membranaires telles que la structure cristalline du système tripartite MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Tsutsumi et al. 2019).

## 7.2.3. Utilisation des SMALPs

L'environnement membranaire autour d'une protéine n'est pas seulement un ancrage mais peut influencer le repliement ainsi que la fonction de ces protéines. De ce fait, des méthodes ont été développées pour extraire les protéines membranaires avec les constituants de la bicouche lipidique qui l'entourent. Les Styrene-Maleic Acid Lipid Particles (SMALPs) sont des polymères qui solubilisent les protéines membranaires directement à partir de la bicouche lipidique sans avoir recours aux détergents, en conservant l'environnement lipidique natif des protéines (Hesketh et al. 2020). Les SMA sont obtenus à partir d'une polymérisation entre un groupement aromatique

hydrophobe, le styrène et un composé hydrophile, l'acide maléique rendant les polymères amphiphiles et capables de s'insérer dans les membranes biologiques (Postis et al. 2015). Après leur insertion dans la membrane, les SMA entourent les lipides englobant ainsi les protéines (**Figure 38**).



**Figure 38 : Extraction des protéines membranaires par des SMA**

(D'après (Dörr et al. 2016))

### 7.3. Fonctionnalité

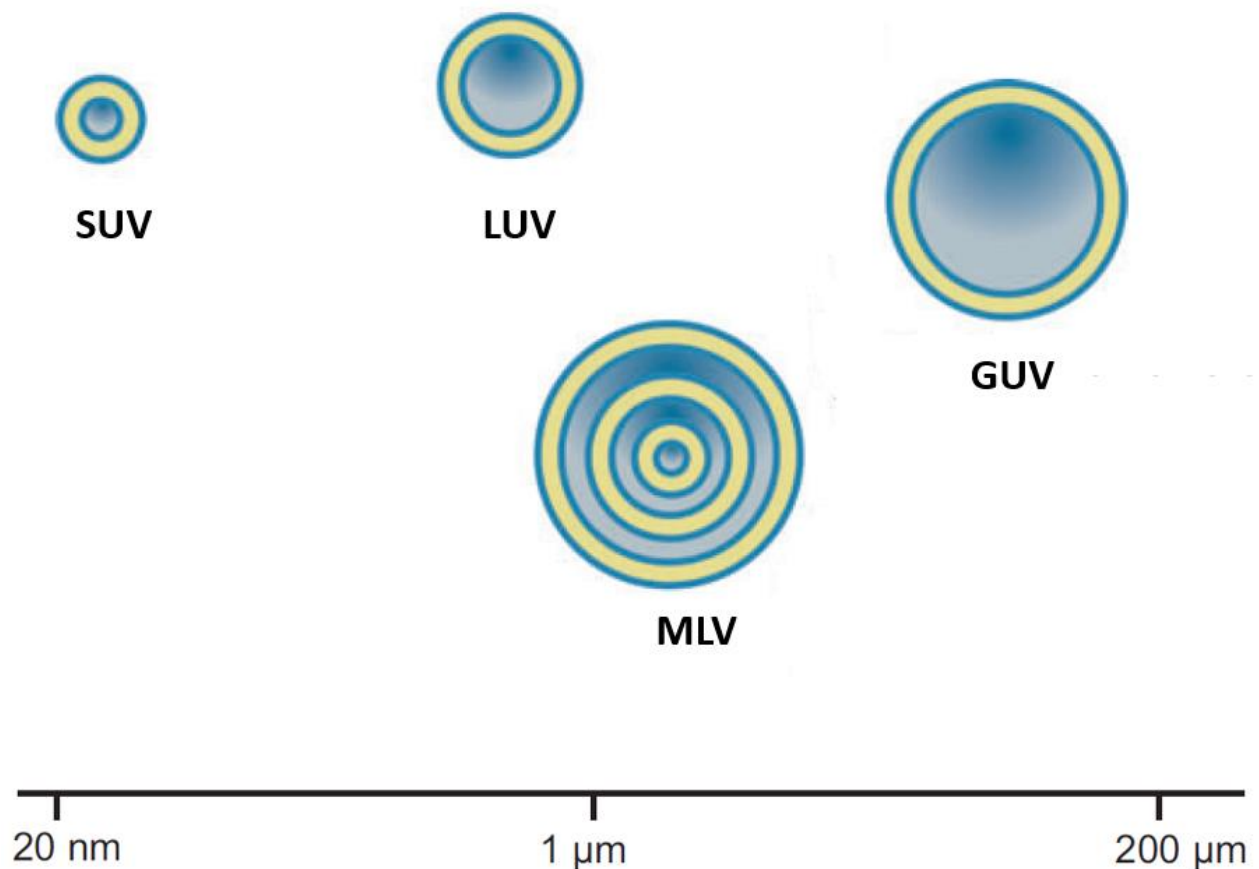
L'étude des protéines membranaires est un grand défi. Après avoir surmonté l'étape d'expression puis d'extraction de ces protéines, il faut s'assurer que ces dernières soient fonctionnelles pour des études plus avancées. Cependant, les protéines nécessitent un environnement lipidique pour être tout à fait fonctionnelle. De ce fait, des systèmes sont utilisés pour mimer cet environnement lipidique. Après purification, les protéines seront insérées dans ces membranes lipidiques artificielles. C'est le cas des liposomes et des nanodisques.

#### 7.3.1. Liposomes

Les liposomes sont des vésicules lipidiques artificielles de quelques dizaines à quelques milliers de nm constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques (dans ce dernier cas ils peuvent emprisonner plusieurs compartiments aqueux). Les lipides s'organisent pour minimiser les contacts avec le milieu aqueux. Les chaînes carbonées se regroupent pour former la zone hydrophobe alors

que les têtes polaires forment la zone hydrophile. Il existe plusieurs types de liposomes qui diffèrent selon leur taille ou le nombre de bicouches lipidiques qu'ils contiennent (**Figure 39**). On distingue :

- Les SUV ou small unilamellar vesicles
- Les MLV ou multilamellar vesicles
- Les LUV ou large unilamellar vesicles
- Les GUV ou giant unilamellar vesicles



**Figure 39 : Différents types de liposomes**

D'après (Jesorka et Orwar 2008)

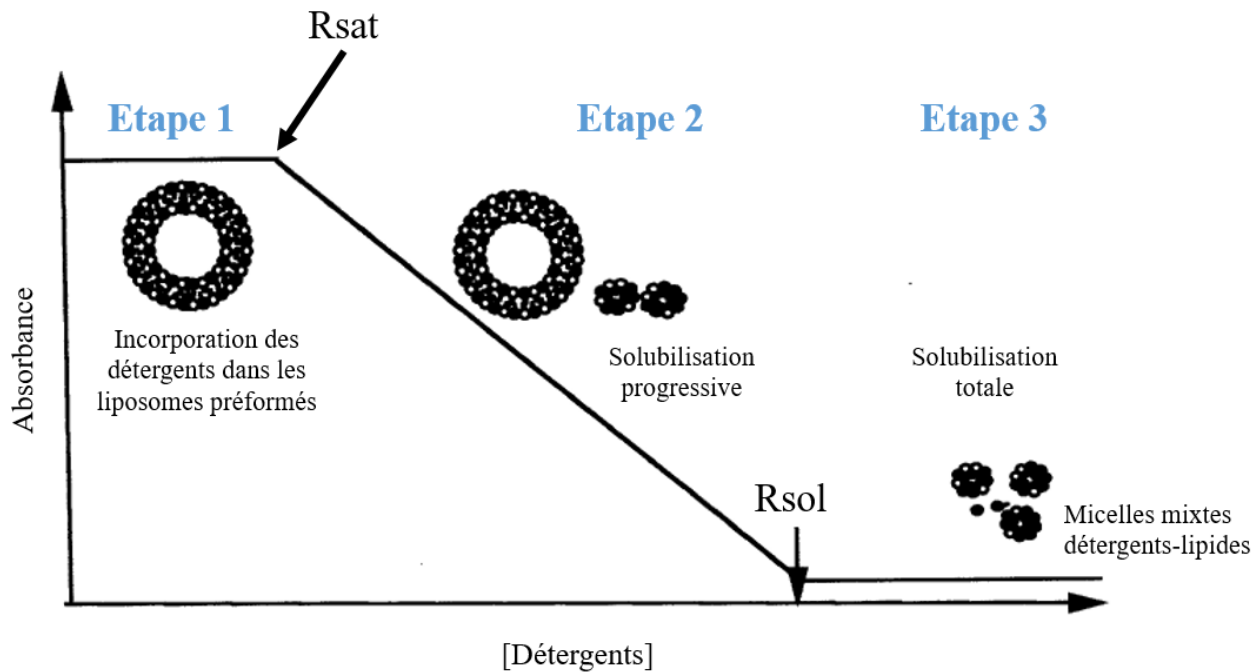
Bangham et ses collaborateurs sont les premiers à avoir intentionnellement fabriqué des liposomes (Bangham et al. 1965). Depuis lors, de nombreux débouchés ont été trouvés pour ces vésicules artificielles. En cosmétologie et médecine, les substances utilisées sont encapsulées dans des liposomes avant d'être utilisées alors que l'industrie pharmaceutique utilise les liposomes pour véhiculer des médicaments dans l'organisme (Sercombe et al. 2015).

Les liposomes sont très largement utilisés dans l'étude de l'activité de transport de certaines protéines membranaires car il offre un moyen de suivre le déplacement des substrats d'un

compartiment A vers un compartiment B. Ils permettent aussi d'analyser les propriétés des protéines membranaires lorsqu'elles sont insérées dans un modèle membranaire qui tente de reproduire la structure et les propriétés de la bicouche lipidique biologique.

La reconstitution des protéines membranaires dans les liposomes nécessite des protéines purifiées ainsi que des lipides complètement solubilisés ou seulement déstabilisés par des détergents. Les lipides sont complètement solubilisés par l'ajout d'un excès de détergents (Rigaud et al., 1995; Rigaud et Lévy, 2003). Avant de déstabiliser les liposomes, il faut les former. Les lipides sont solubilisés dans du chloroforme puis séchés grâce à un évaporateur en formant un film. Toute trace de chloroforme doit disparaître pour qu'il n'entrave pas l'activité future des protéines reconstituées. Par la suite, le film de lipides sera réhydraté dans un tampon. Des cycles de congélation et de décongélation rapides seront soumis à la solution de lipides qui sera ensuite extrudée à travers des membranes poreuses en polycarbonate de tailles bien définies (400, 200 ou 100 nm). A ce stade, les liposomes unilamellaires sont préformés aux tailles désirées. Il est possible de suivre les différentes étapes de la formation des liposomes grâce à la technique d'analyse spectrophotométrique DLS (Dynamic Light Scattering) et qui présente aussi l'avantage de ne pas détruire les échantillons utilisés. Lorsque les liposomes sont formés, il faut les déstabiliser en faisant des ajouts progressifs de détergents. Cette déstabilisation est suivie au spectrophotomètre en mesurant l'absorbance de la solution de lipides après chaque ajout de détergents à une longueur d'onde comprise entre 400 et 700 nm. Durant cette phase de déstabilisation, il existe trois étapes distinctes (Jean-Louis Rigaud, Pitard, et Levy 1995) (**Figure 40**):

- Etape 1 : les molécules de détergent s'insèrent dans les liposomes préformés. La solution de lipides devient de plus en plus claire.
- Etape 2 : le détergent commence à solubiliser de plus en plus les liposomes. De petites micelles mixtes détergent-lipides se forment induisant aussi une baisse importante de la turbidité de la solution.
- Etape 3 : il y a une solubilisation complète des liposomes et la solution devient transparente.



**Figure 40 : Courbe de déstabilisation des liposomes par ajouts progressifs de détergents**  
(D'après (Rigaud et Lévy 2003))

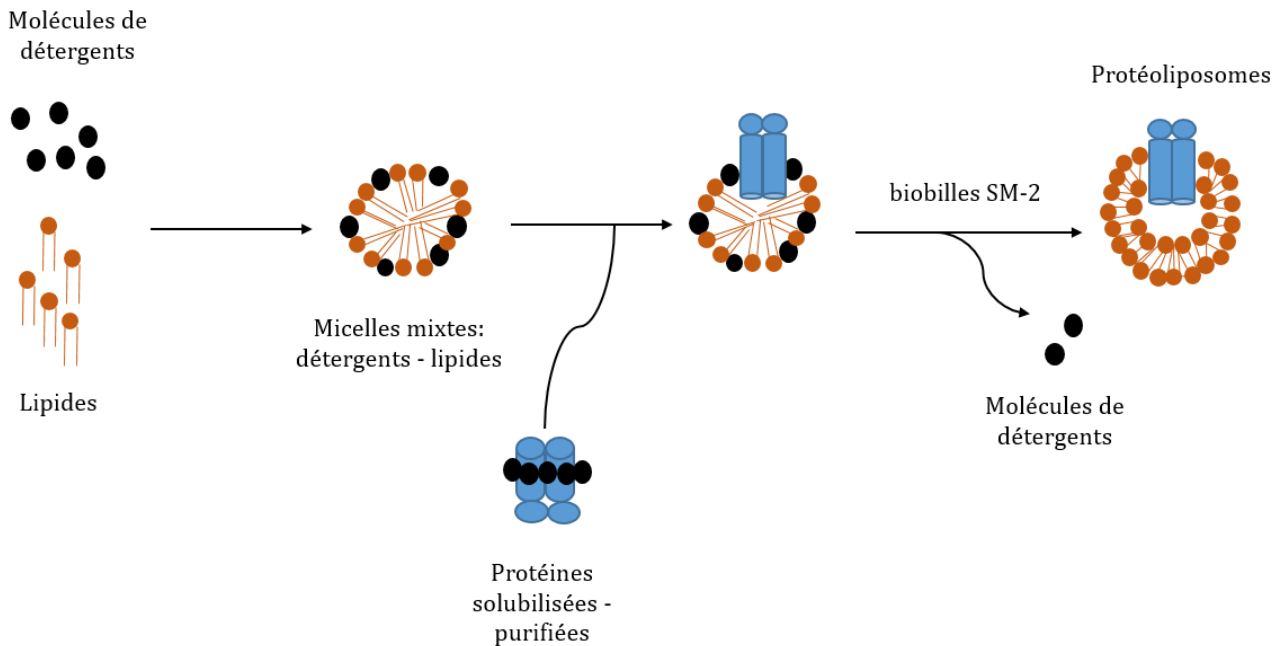
Le  $R_{sat}$  représente un ratio dans lequel les liposomes sont saturés en détergents alors que le  $R_{sol}$  représente le ratio dans lequel tous les liposomes sont solubilisés.

Lorsque le bon ratio détergent/lipide est choisi (proche du  $R_{sat}$ ) grâce à la courbe de déstabilisation, la reconstitution des protéines membranaires purifiées peut débuter. L'ajout des protéines va permettre à ces dernières de s'insérer dans les micelles mixtes lipides-détergents pour former des micelles lipides-détergents-protéines. Les détergents sont par la suite éliminés pour former des protéoliposomes. Cette méthode permet d'avoir une insertion des transporteurs ABC relativement homogène car ces protéines vont insérer leurs parties transmembranaires dans les micelles et la partie cytoplasmique sera à l'extérieur du liposome.

Les liposomes peuvent aussi être formés en solubilisant les lipides avec des détergents pour former des micelles mixtes de détergents et de lipides. Puis, les protéines purifiées ajoutées vont d'insérer dans ces micelles. Les détergents sont éliminés par la suite pour former les protéoliposomes (**Figure 41**).

Il existe différents moyens pour éliminer les détergents (Geertsma et al. 2008; J.-L. Rigaud et al. 1998) : la dilution des détergents en dessous de leurs CMC, la dialyse, la chromatographie

d'exclusion stérique et l'adsorption sur les biobilles. Ces méthodes ont été détaillées dans la partie 7.2.1.



**Figure 41 : Méthode de reconstitution des protéines purifiées dans les liposomes**  
(D'après (Rigaud et Lévy 2003))

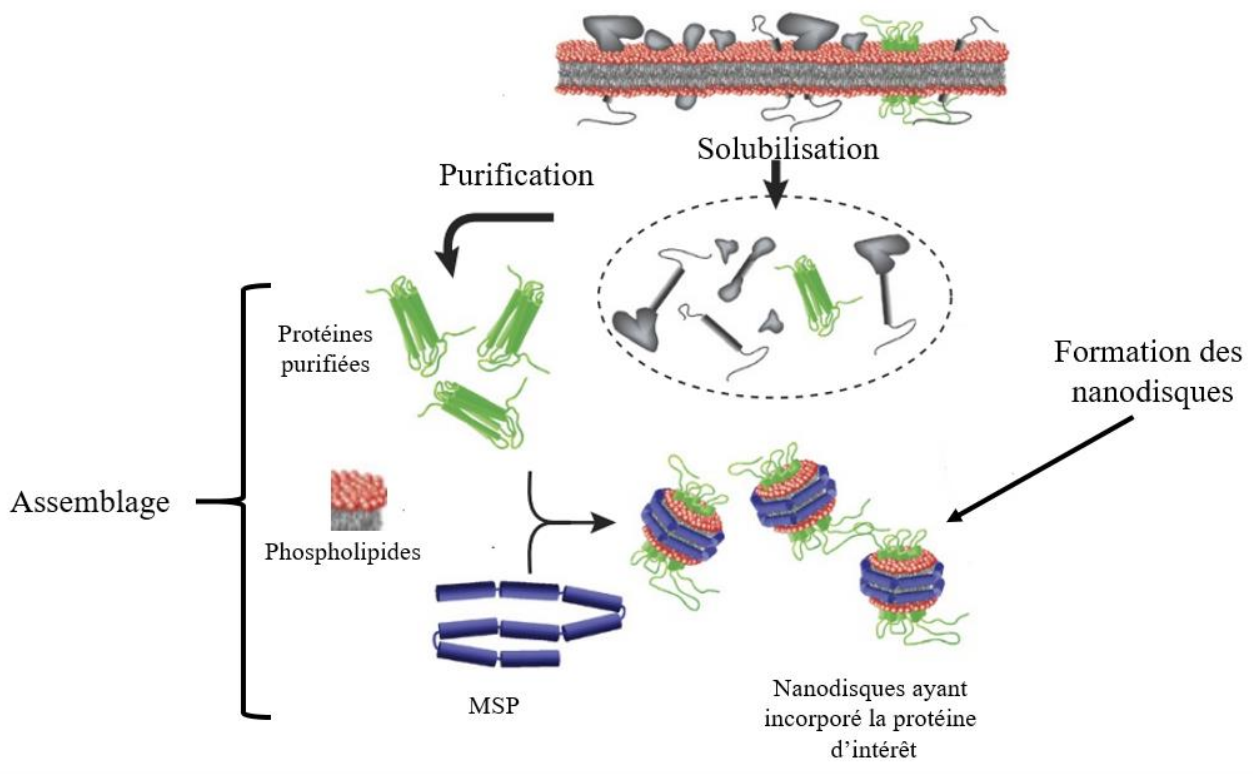
### 7.3.2. Nanodisques

Les nanodisques et les liposomes sont des systèmes de membrane artificielle utilisée dans l'étude fonctionnelle et structurale des protéines membranaires. Toutefois, les nanodisques ne possèdent pas plusieurs compartiments ce qui les rend inéligibles à l'étude des activités de transport d'une protéine membranaire. Mais l'avantage des nanodisques est l'accessibilité aux ligands des deux côtés de la membrane

Les nanodisques sont des bicouches lipidiques encerclées par des protéines hélicoïdales solubles appelées MSP (« membrane scaffold proteins ») qui les rend solubles dans une solution aqueuse. Cette MSP dérive de la séquence de l'apolipoprotéine A-1 humaine chargée du transport du cholestérol dans le sang vers le foie. La longueur des MSP définit la taille des nanodisques. De ce fait, des protéines de différentes tailles peuvent être reconstituées dans les nanodisques en fonction du choix de la protéine MSP (Bayburt et Sligar, 2010).

Après avoir solubilisé et purifié la protéine d'intérêt, cette dernière est incubée avec des lipides et des MSP. Puis les molécules de détergents sont enlevées en utilisant une des techniques

précédemment mentionnées pour former les nanodisques. Par la suite, le mélange de nanodisques obtenu est purifié par chromatographie pour séparer les nanodisques vides de ceux qui ont incorporé la protéine d'intérêt (Denisov et Sligar, 2016) (**Figure 42**).



**Figure 42 : Préparation des nanodisques ayant incorporé les protéines d'intérêt**  
(D'après (Denisov et Sligar 2016))

## Objectifs de la thèse

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Cette menace grandissante implique de nombreux pathogènes bactériens tels que *Streptococcus pneumoniae*, aussi appelé pneumocoque. C'est une bactérie pathogène qui colonise les voies respiratoires supérieures de l'homme. Elle est responsable de nombreuses infections graves telles que la pneumonie, la méningite bactérienne ou la septicémie et cause plus de 1,5 millions de morts chaque année. Elle cible particulièrement les nourrissons ainsi que les personnes âgées et immunodéprimées. Mais, l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactames et les macrolides augmentent la dangerosité du pneumocoque.

Pour ralentir ce phénomène inquiétant et prévenir l'apparition de nouvelles souches résistantes, des approches thérapeutiques innovantes ont été développées. C'est le cas de l'utilisation des peptides antimicrobiens (PAMs) qui représentent une part importante de la 1<sup>ère</sup> ligne de défense chez les êtres vivants. Ces molécules, naturellement synthétisées par divers organismes, sont capables d'inhiber la biosynthèse du peptidoglycane ou de créer des pores au niveau de la membrane cellulaire conduisant à la mort. Pour se défendre contre l'action de ces PAMs, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance. Le plus efficace de ces systèmes de défense implique des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) couplés à des systèmes de régulation à deux composants (TCS). Les transporteurs ABC représentent une large famille de protéines membranaires que l'on retrouve chez tous les êtres vivants. Ils sont impliqués dans la translocation unidirectionnel d'une grande variété de substrats (acides aminés, peptides, sucres...) à travers les membranes biologiques utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Les TCS sont présents dans de nombreux organismes et particulièrement chez les bactéries. Ils permettent la détection des changements environnementaux via l'histidine kinase (HK) membranaire et le relais de l'information par le régulateur de réponse (RR) cytoplasmique, induisant ainsi la mise en place d'une réponse adaptée.

Les systèmes de détoxification des peptides antimicrobiens sont très présents chez les bactéries firmicutes à Gram positif ayant un faible taux de G+C. C'est le cas des *Streptococci* d'où est issu le pneumocoque. Ces systèmes détectent la présence des PAMs et en réponse, le TCS induit l'expression du transporteur déclenchant ainsi le processus de résistance de la cellule. Le fonctionnement de ces systèmes uniques de détection et de transport est, à ce jour, très peu étudié.

L'objectif principal de mes travaux de thèse consiste à comprendre le mécanisme qui régit cette résistance aux peptides antimicrobiens chez la bactérie pathogène *S. pneumoniae*.



Comprendre un mécanisme consiste à caractériser chacun de ses composants ainsi que leur mode d'interaction. Des études antérieures ont montré que la délétion des gènes du transporteur ABC qui nous intéresse augmente la sensibilité du pneumocoque à la bacitracine et la nisine de 4 à 5 fois, suggérant ainsi que ces 2 PAMs sont reconnus par le transporteur que l'on va nommer SpABC (Becker et al. 2009; Majchrzykiewicz et al. 2010).

Tout d'abord, nous avons fait l'étude du fonctionnement de ce système de résistance *in vivo* en déterminant la sensibilité de différentes souches de *S. pneumoniae* en présence de divers PAMs. D'autres méthodes telles que la quantification génique par qPCR de *spABC* et *spTCS*, la suivie de la fluorescence de SpABC sous différentes conditions, la détection par Western blot de l'expression de SpABC et la quantification protéique par spectrométrie de masse sont utilisées pour mieux comprendre le système de résistance et identifier les protéines impliquées. En amont des gènes codant le transporteur SpABC, il existe un peptide de 36 acides aminés appelé Sp36 qui est dans le même opéron (Becker et al. 2009) et qui pourrait jouer un rôle dans la virulence du pneumocoque. Différents types d'expériences tels que des tests de résistance et de survie cellulaires sont utilisés pour déterminer la fonction de ce peptide. Ce système constitué du transporteur SpABC, du système à deux composants SpTCS et de la toxine Sp36 pourrait constituer un unique système de défense et d'attaque impliqué dans la virulence de *S. pneumoniae*.

Le mécanisme moléculaire du transporteur SpABC est à ce jour inconnu. Pour apporter des éléments de compréhension du mécanisme biochimique de ce transporteur ABC, nous avons tout d'abord optimisé la surexpression de SpABC dans un système hétérologue *E. coli* en utilisant différentes souches de cette bactérie, la purification de la protéine à l'aide de différents détergents tels que le LMNG, l'UDM et le DDM et la reconstitution de ce transporteur dans un système de bicouche lipidique artificiel appelé liposomes. Des mesures des activités ATPase et GTPase du transporteur reconstitué en protéoliposomes ont été effectuées. L'effet de PAMs, substrats ou non du transporteur, sur son activité ATP/GTPase a été étudiée afin de mieux comprendre l'influence des PAMs sur le mécanisme du transporteur.

A long terme, l'étude du mécanisme moléculaire régissant la résistance aux PAMs permettra la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre l'antibiorésistance.

# Partie II : Matériel et Méthodes

# 1. Analyses bio-informatiques

## 1.1. Recherche par pBlast

La base de données UNIPROT a été utilisée pour obtenir les séquences d'acides aminées des protéines d'intérêt. Puis, le site internet du NCBI (National Centre for Biotechnology Information) est utilisé pour effectuer les recherches de protéines par BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 1.2. Alignement de séquences

Les alignements des séquences primaires ainsi que les pourcentages de similarité entre les protéines sont obtenus grâce au serveur ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)) (Combet et al. 2000).

Les séquences primaires utilisées pour la réalisation du BLAST de protéines sur le génome du pneumocoque (souche D39) ainsi que les alignements sont consignées dans le **Tableau 7** :

	Code UNIPROT			
	NBD	TMD	HK	RR
<b>Couple YvcPQ – RS de <i>B. subtilis</i></b>	YvcR : O06980	YvcS : O06981	YvcQ : O06979	YvcP : O06978
<b>Couple YxdJK – LM de <i>B. subtilis</i></b>	YxdL. : P42423	YxdM.: P42424	YxdK.: P42422	YxdJ.: P42421
<b>Couple BceRS-AB de <i>B. subtilis</i></b>	BceA.: O34697	BceB.: O34741	BceS. : O35044	BceR.: O34951
<b>Couple SPD_0804/SPD_0805 – SPD_1445/SPD_1446 de <i>S. pneumoniae</i></b>	SPD_0804.: A0A0H2ZN40	SPD_0804.: A0A0H2ZPF3	SPD_1445.: A0A0H2ZQU9	SPD_1446.: A0A0H2ZP68

**Tableau 7 : Noms et Codes UNIPROT protéines utilisées pour les BLAST et les alignements**

## 2. Microbiologie

### 2.1. Souches bactériennes utilisées

Les différentes souches de *S. pneumoniae* utilisées dans cette étude sont renseignées dans le

**Tableau 8 :**

Souches de <i>S. pneumoniae</i>	Remarques	Mutations réalisées pour cette étude	
<b>D39</b>	Souche virulente de sérotype 2 possédant une capsule. A manipuler dans un laboratoire de type P2.	<i>wt</i> , $\Delta spABC$ , $\Delta spTCS$ , $\Delta spABC / \Delta spTCS$	
<b>R6</b>	Souche sans capsule et non virulente dérivée de la souche D39.	<i>wt</i> , $\Delta spABC$ , $\Delta spTCS$ , $\Delta spABC / \Delta spTCS$	
<b>R800</b>	Souche non virulente dérivée de la souche R6.	<i>wt</i> , $\Delta spABC$ , <i>spABC</i> – GFP, $\Delta hk$ , <i>hk-gfp</i> , <i>gfp-hk</i> , $\Delta hk / PcomX hk$ , $\Delta hk / spABC-gfp$	<i>rr*</i> (D52E), PcomX <i>rr*</i> , $\Delta spTCS / PcomX rr*$ , <i>spABC-gfp</i> / $\Delta spTCS / PcomX rr*$ , $\Delta spABC / PcomX spABC-gfp$ , PcomX <i>spABC-gfp</i> , $\Delta spTCS / PcomX spABC-gfp$

**Tableau 8 : Souches de *S. pneumoniae* utilisées pour l'étude *in vivo* du couple SpABC/SpTCS**

Les mutations sur les souches D39 et R6 ont été réalisées par le Dr Claire Durmort de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) situé à Grenoble en France. Le protocole utilisé est détaillé dans la thèse du Dr Jaroslav Vorac (Vorac 2016). Les souches R800 nous ont été construites par Anaïs Pelletier (laboratoire du Dr Christophe Grangeasse, MMSB, Lyon) dans le cadre d'une collaboration. Les souches D39 et R6 avec le gène *spABC* délété présentent une résistance au chloramphénicol tandis que les souches D39 et R6 avec les gènes *spTCS* ou *hk* délétés ont une résistance à la kanamycine. Les souches avec la double délétion des gènes *spABC* et *spTCS* quant à elles présentent la résistance aux deux antibiotiques précédemment cités.

### 2.2. Conditions de croissance des bactéries utilisées

Les souches de *S. pneumoniae* sont cultivées dans un milieu Todd-Hewitt (TH) sans agitation et en conditions d'anaérobiose jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne une valeur comprise entre 0,3 et 0,4. Ces valeurs correspondent à la phase exponentielle de croissance du pneumocoque. Le

milieu Todd-Hewitt, produite par la marque Difco, est un milieu riche servant principalement à la culture des streptocoques. Il est composé de 3,1 g/L d'infusion de cœur, 20 g/L de néopeptone, 2 g/L de glucose, 2 g/L de chlorure de sodium, 0,4 g/L de phosphate disodique et 2,5 g/L de carbonate de sodium. De plus, le pH à 25 °C du milieu prêt à l'emploi est de  $7,8 \pm 0,2$ .

### 2.3. Détermination de la sensibilité du pneumocoque aux PAMs

Les tests de résistance sont réalisés sur la souche R6 pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de différents peptides antimicrobiens sur le pneumocoque. La CMI est la plus petite concentration d'antibiotiques capable d'inhiber la croissance bactérienne. La souche sauvage (WT) et les souches mutantes citées dans le **Tableau 8** sont utilisées pour ces tests.

Les tests de résistances ont été réalisés en duplicat sur une plaque Greiner 96 puits. Les bactéries sont cultivées dans un milieu Todd-Hewitt sans agitation et en anaérobie jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne une valeur comprise entre 0,3 et 0,4. Par la suite, la culture est diluée à une absorbance de 0,004. Ensuite, un volume de 150  $\mu$ L de ces bactéries est ajouté dans tous les puits de la plaque pour un volume final de 300  $\mu$ L en présence d'une gamme de concentrations croissantes de PAMs allant de 0 à 1250  $\mu$ g/mL pour certains. La croissance des pneumocoques est suivie grâce à un lecteur de microplaques (TECAN®) à 37 °C sans agitation mécanique. L'absorbance est lue à 600 nm toutes les 15 min pendant 15 h.

Les PAMs utilisés pour ces expériences sont : bacitracine, nisine, gramicidine (Sigma) ; actagardine, planosporicine (NAI-97), microbisporicine (NAI-107), NAI-802, NAI-857, ramoplanine (AdipoGen) ; vancomycine, duramycine (euromedex), ionomycine, polymixine B, colistine (Sigma) ; mastoporane, abaecine, cécropine, magainine et LL-37 (Smart-Bioscience).

### 2.4. Construction et expression de SpABC fusionné à la protéine GFP

Ces expériences ont été réalisées par Anaïs Pelletier (laboratoire du Dr Christophe Grangeasse) dans le cadre d'une collaboration. Le gène codant la protéine GFP a été fusionné du côté C-terminal du NBD de SpABC. L'expression de SpABC-GFP a été suivie grâce à la fluorescence de la GFP par microscopie. De plus, elle a été visualisée en Western blot grâce à un anticorps anti-GFP.

### 2.5. Numération de *S. pneumoniae*

Nous avons effectué la numération des pneumocoques dans les différents aliquots. Pour cela, les souches R6 *wt*, R6  $\Delta$ *spTCS*, D39 *wt* et D39  $\Delta$ *spTCS* sont cultivées dans du milieu Todd Hewitt supplémenté avec 0,05% d'extraits de levure (milieu THY) (Difco) jusqu'à une  $DO_{600nm} = 0,3$ . Les

aliquots des bactéries sont conservés à -80 °C avec du glycérol à une concentration finale de 20%. Au bout de quelques jours de congélation, deux aliquots de chaque souche sont utilisés pour la numération. Les pneumocoques sont dilués 10000 fois dans du milieu THY puis 10 µL de cette dilution est déposé dans une boîte de pétri. Un mélange de 10 mL de milieu THY avec 1,5% d'agar, 4% de sang de cheval défibriné (Eurobio) est ajouté sur la goutte de bactéries puis homogénéisé. Pour les souches ayant le gène *spTCS* délété, une concentration finale de 50 µg/mL de kanamycine est rajoutée dans le mélange. Les boîtes sont incubées toute une nuit à 37 °C. Puis, le nombre de colonies sur chaque boîte est compté. Chaque aliquot de bactéries a été étalé en triplicat. De ce fait, pour chaque souche, nous avons six essais. Les réplicats sont moyennés et le nombre de bactéries (CFU) par mL est déterminé.

## 2.6. Infection de *G. mellonella* avec des souches de *S. pneumoniae*

Nous avons voulu tester la virulence des souches R6 et D39 sauvage et délétées au niveau du système à deux composants. Pour cela, le modèle de *G. mellonella* a été choisi.

Les larves de *G. mellonella* sont commandées chez la société Sud Est Appats (<http://www.sudestappats.fr/>) et sont utilisées 5 à 6 h après leur arrivée. Des groupes de 20 larves sont utilisés pour chaque condition testée. Les souches de *S. pneumoniae* conservées en glycérol sont diluées dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile pour obtenir le nombre de CFU/mL à injecter dans les larves. Nous avons testé différents inocula de bactéries :  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  et  $1,5 \times 10^6$  CFU par larve. Une seringue SGE (Trajan) de 10 µL est utilisée pour injecter 10 µL de suspension bactérienne dans l'hémolymphe de chaque larve au niveau de l'avant-dernier proleg gauche. Comme contrôle, 10 µL de PBS est injecté à un groupe de 20 larves. Après les différentes injections, les larves sont incubées dans des boîtes de pétri à 37 °C et le nombre de morts est relevé régulièrement. Cette étape a permis de déterminer l'inoculum à utiliser pour les infections futures qui sont réalisées en utilisant le même protocole.

## 2.7. Survie des souches de *S. pneumoniae* en stress acide et oxydant

Les souches R6 (*wt*,  $\Delta spABC$ ,  $\Delta spTCS$ ,  $\Delta spABC/\Delta spTCS$ ) et R800 (*wt*,  $\Delta hk$ ) ont été cultivées dans du milieu THY à 37 °C et en conditions d'anaérobie. Lorsque la DO à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, les cultures sont centrifugées, reprises dans les mêmes volumes de milieu THY, THY à pH 4,8 et THY avec 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puis incubées durant 1 h à 37 °C dans des conditions d'anaérobie. A la fin de cette incubation, chaque condition est diluée 10000 fois puis 10 µL de cette dilution est étalée sur des boîtes de THY agar supplémentées de 4% de sang de cheval défibriné et de différentes concentrations d'antibiotiques en fonction de la souche : R6 *wt*, R800 *wt*,

R800  $\Delta hk$  (pas d'antibiotiques), R6  $\Delta spABC$  (2,5  $\mu\text{g/mL}$  de chloramphénicol), R6  $\Delta spTCS$  (50  $\mu\text{g/mL}$  de kanamycine) et R6  $\Delta spABC/\Delta spTCS$  (2,5  $\mu\text{g/mL}$  de chloramphénicol / 50  $\mu\text{g/mL}$  de kanamycine). Les boîtes de pétri sont mises toute une nuit dans une étuve à 37 °C et le lendemain, le nombre de colonies est dénombré.

## 2.8. Souches utilisées pour l'expression du transporteur SpABC

Le **Tableau 9** présente toutes les souches bactériennes utilisées pour surexprimer les protéines d'intérêt de cette étude :

Bactérie	Caractéristiques
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3) <sup>1</sup> [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5] [malB <sup>+</sup> ]K-12( $\lambda$ S)
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	Dérivée de la souche BL21 (DE3). Mutations sur le promoteur <i>lacUV5</i> (deux mutations sur la région promotrice l4ARN polymérase T7) et sur l'opérateur lac
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	Dérivé de la souche BL21 (DE3). Mutation additionnelle sur le gène <i>lacI</i> de la région DE3
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	$\Delta acrAB, \Delta ompF$
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	$\Delta acrAB, \Delta macAB$
<i>E. coli</i> C44 (DE3)	Dérivée de la souche BL21 (DE3). Présence d'un codon stop avant le domaine catalytique B de l'ARN polymérase T7
<i>E. coli</i> C45 (DE3)	Dérivée de la souche BL21 (DE3). Présence d'un codon stop juste après le domaine catalytique B de l'ARN polymérase T7
<i>L. lactis</i> NZ9000	$\Delta lmrA, \Delta lmrCD$

**Tableau 9 : Souches utilisées pour l'expression des protéines de l'étude**

<sup>1</sup> Prophage lysogénique  $\lambda$  portant le gène de la T7 RNA polymérase et de lacI.

La souche *E. coli* BL21 (DE3) était déjà disponible dans le laboratoire. La souche *E. coli* C43 (DE3)  $\Delta$ *acrAB*,  $\Delta$ *ompF* nous a été généreusement fournie par le Prof. Dr. Lutz Schmitt de l'Université de Düsseldorf (Kanonenberg 2018). La souche *L. lactis* NZ9000 nous a été généreusement fournie par le laboratoire du Dr. Markus Seeger à Zurich, Suisse.

## 2.9. Milieux de culture utilisés pour l'expression du transporteur SpABC

Le **Tableau 10** présente les milieux utilisés dans la surexpression des protéines de cette étude :

Milieux de culture	Composition	Complémentations
Lysogeny Broth (LB)	Tryptone 10 g/L, Extrait de levures 5 g/L, NaCl 5 g/L	
LB – Agar	LB + 1,5% d'Agar	
2xYT	Tryptone 16 g/L, Extrait de levures 10 g/L, NaCl 5 g/L	
2xYT - Agar	2 x YT + 1,5% d'Agar	
M17	Lactose 5 g/L, MgSO <sub>4</sub> 0,25 g/L, Meat extract, 5 g/L, Meat peptone 2,5 g/L, Sodium glycerophosphate 19 g/L, Soya peptone 5 g/L, Tryptone, 2,5 g/L, Extrait de levures 2,5 g/L, Acide ascorbique 0,5 g/L	+ 0,5% de lactose + 0,5% de glucose filtrés et ajoutés après le cycle d'autoclave.

**Tableau 10 : Composition des milieux de culture utilisés pour l'expression des protéines de l'étude**



## 2.10. Préparation de bactéries compétentes

Une colonie de la bactérie a été mise en pré-culture durant toute une nuit dans 4 mL de milieu LB à 37 °C sous une agitation de 180 rpm. Le lendemain, une culture est démarrée en inoculant 2 mL de cette pré-culture dans 100 mL de milieu LB (Sigma). La culture est incubée à 37 °C sous une agitation de 180 rpm. Lorsque la DO de la culture atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, la culture est mise à incuber 10 min dans la glace puis les bactéries sont culottées à 1600 x g durant 7 min à 4 °C. Le culot de bactéries obtenu est repris dans 20 mL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> (10 mM PIPES pH 7, 80 mM CaCl<sub>2</sub>) préalablement autoclavé puis conservée à 4 °C. Le chlorure de sodium perméabilise la membrane bactérienne, ce qui facilite l'introduction de l'ADN étranger à la suite d'un choc thermique. Les bactéries sont de nouveau centrifugées à 1600 x g durant 5 min à 4 °C et re-suspendues délicatement dans 20 ml de solution de CaCl<sub>2</sub> froide. Après une incubation de 30 min dans la glace, les bactéries sont de nouveau centrifugées comme précédemment. Le culot obtenu est repris dans 4 mL de solution de CaCl<sub>2</sub> froide. A ce stade, les bactéries compétentes sont aliquotées, congelées rapidement à l'azote liquide puis conservées à – 80 °C.

## 2.11. Transformation des bactéries compétentes

Quinze ng de plasmides pRSFDuet<sup>TM</sup>-1 contenant le gène codant pour le transporteur ABC sauvage, muté sur la lysine conservée du motif A de Walker ou muté sur le glutamate du motif B de Walker sont ajoutés à 50 µL de bactéries *E. coli* compétentes puis placés dans de la glace pendant 30 min. Un choc thermique est effectué à 42 °C durant 45 sec et les bactéries sont placées 5 min dans la glace avant d'ajouter 200 µL de milieu LB (Lysogeny Broth). Les bactéries sont, par la suite, mises à incuber à 37 °C pendant 1 h. Le plasmide utilisé possède un gène de résistance à la kanamycine qui permet la sélection des bactéries transformées en présence de cet antibiotique dans le milieu de culture. Donc, 20 µL et 100 µL de bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri (LB-Agar) contenant 50 µg/mL de kanamycine puis mises à incuber toute une nuit à 37 °C.

# 3. Biologie moléculaire

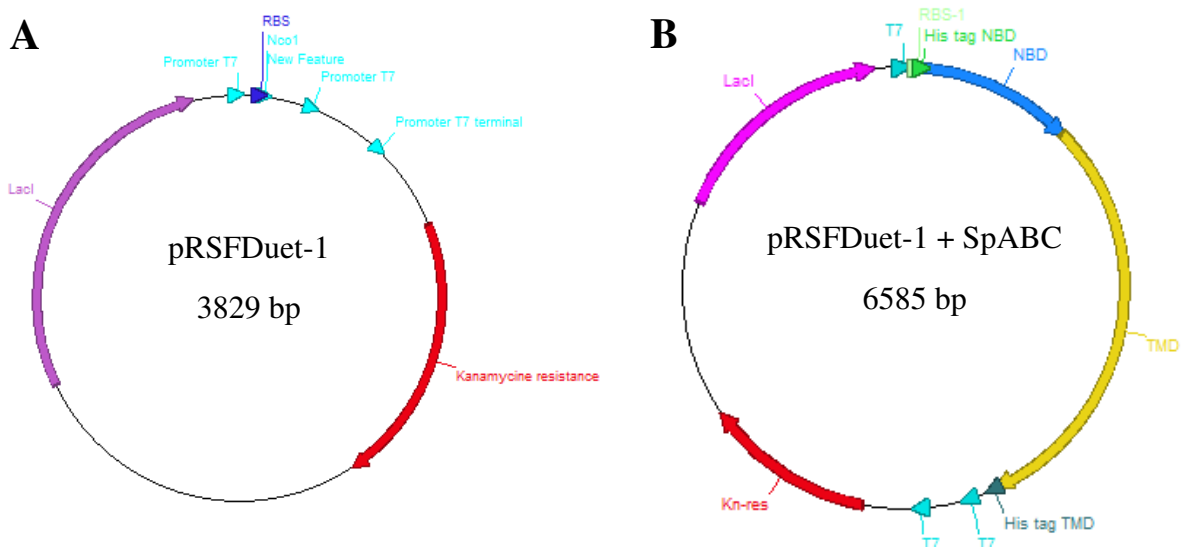
## 3.1. Plasmides utilisés pour l'expression des protéines

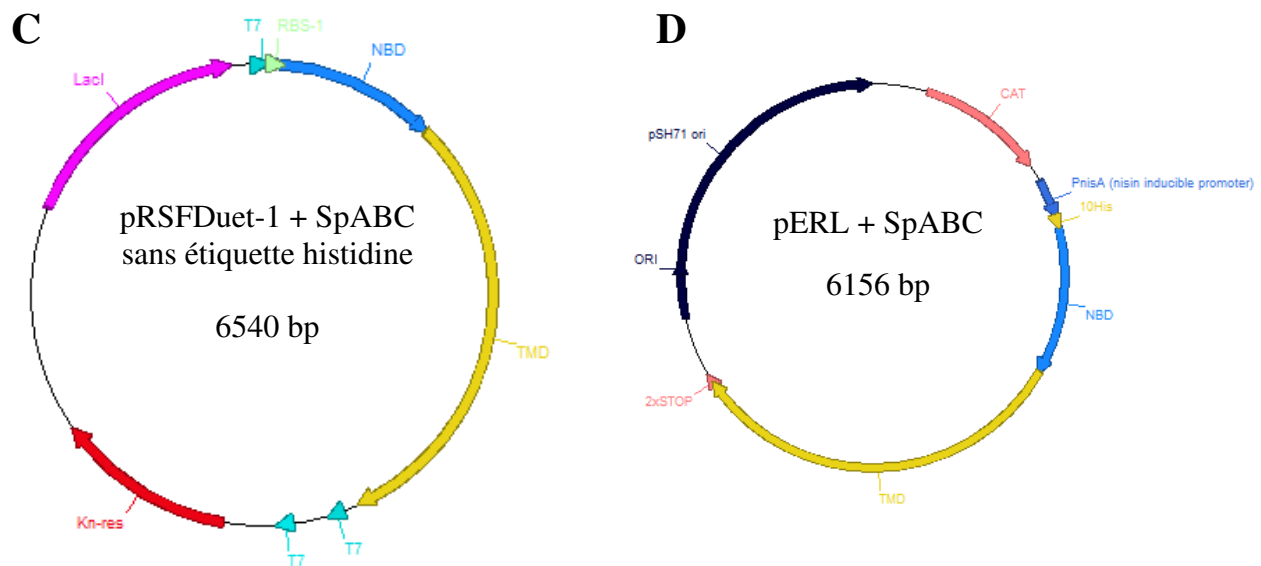
Le **Tableau 11** présente tous les plasmides utilisés pour surexprimer les protéines d'intérêt de cette étude :

Plasmides	Gènes intégrés	Résistance à l'antibiotique
pRSFDuet <sup>TM</sup> -1 (expression dans <i>E. coli</i> )	SPD0804 – SPD0805 [SpABC WT], SPD0804 (K48A) – SPD0805 [SpABC K48A]	Kanamycine (euromedex)
pERL (expression dans <i>L. lactis</i> )	Vecteur vide	Erythromycine (Sigma)
	SpABC WT, SpABC K48A	Chloramphénicol (euromedex)

**Tableau 11 : Plasmides utilisés pour l'expression des protéines de l'étude**

Le plasmide pRSFDuet<sup>TM</sup>-1 utilisé dans cette étude est construit pour la co-expression de deux protéines cibles (**Figure 43**). Ce vecteur présente deux sites multiples de clonage (MCS) qui sont chacun précédés par un promoteur T7, un opérateur *lac* et un site de fixation du ribosome (RBS). Le transporteur SpABC a été inactivé par mutagenèse dirigée (kit de mutagenèse Strategene) au niveau du motif A de Walker : SpABC K48A. Cette construction est un mutant pouvant fixer l'ATP mais incapable de l'hydrolyser. De ce fait, il nous sert de contrôle négatif. Le transporteur SpABC est cloné au niveau d'un seul site multiple de clonage. Ces constructions ont été réalisées par le Dr Vorac (Vorac 2016).





**Figure 43 : Cartes des plasmides utilisés**

- A. Carte du plasmide pRSFDuet-1
- B. Carte du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC
- C. Carte du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC sans les étiquettes histidine
- D. Carte du plasmide pERL + SpABC

Le plasmide pERL-SpABCWT est utilisé pour exprimer le transporteur SpABC dans la souche de *L. lactis* NZ9000 (**Figure 43**). Le plasmide a été construit par un ingénieur d'étude du laboratoire, Mr Maxime Guillerminet.

### 3.2. Génération des mutants glutamate de SpABC par mutagenèse dirigée

Le glutamate (E) conservé, adjacent au motif B de Walker du NBD, a été muté en alanine (A), aspartate (D) et glutamine (Q) (Orelle et al. 2003). Pour cela, nous avons utilisé le kit de mutagenèse dirigée « QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit » (Agilent Technologies).

Pour la mutagenèse, il faut concevoir deux amorces complémentaires aux deux brins de l'ADN d'intérêt comportant en leur milieu la mutation visée (**Tableau 12**). Ces amorces doivent respecter plusieurs critères consignés dans le guide du kit précédemment mentionné.

<b>SpABC E170A</b>	
Forward :	Reverse :
5' CTCCTTGCGGACGC <u>C</u> ACCGACAGGAGCT 3'	5' AGCTCCTGTCGGTTCGGTCCGCAAGGAG 3'
<b>SpABC E170D</b>	
Forward :	Reverse :

5' CTCCTTGCGG <u>GAC</u> GATCCGACAGGAGC 3'	5' GCTCCTGTCCGATCGTCCGCAAGGAG 3'
<b>SpABC E170Q</b>	
Forward :	Reverse :
5' TCTCCTTGCGGAC <u>CA</u> CCGACAGGAGC 3'	5' GCTCCTGTCCG <u>TTGG</u> TCCGCAAGGAGA 3'

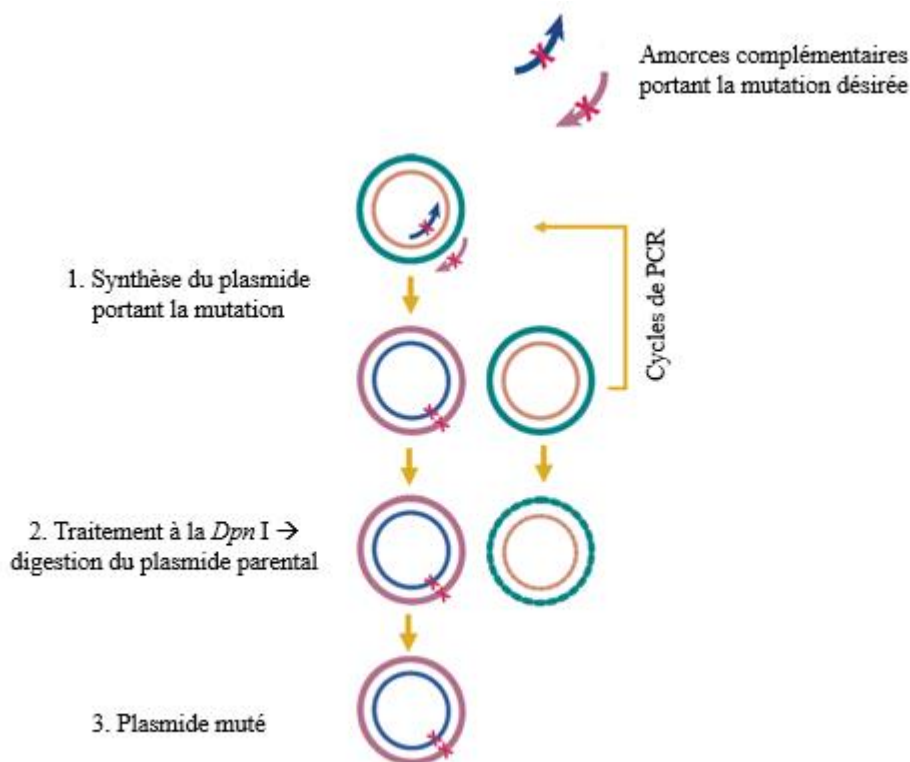
**Tableau 12 : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de SpABC**

La mutagenèse dirigée a été effectuée avec les réactifs et les instructions du manuel. La réaction se déroule dans un volume final de 10 µL contenant :

- 25 ng de chacun des amorces pourvues de la mutation désirée,
- 10 ng du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC WT,
- 0,2 µL du mix de dNTP,
- 0,3 µL du réactif Quick solution,
- 0,2 µL de l'ADN polymérase qui est l'enzyme permettant la synthèse d'un nouveau brin d'ADN,
- 1 µL de tampon de réaction 10x et si nécessaire, rajouter un volume d'eau (sigma) pour atteindre le volume final souhaité.

L'ADN sera amplifié par PCR (Protein Chain Reaction) pour introduire la mutation désirée. L'élongation de la chaîne d'ADN est divisée en trois parties. Elle consiste tout d'abord en un cycle de 2 min à 95 °C, suivie de 18 cycles à différentes températures (95, 60 et 68 °C) et une dernière étape d'un cycle de 5 min à 68 °C. La durée de la 2<sup>ème</sup> étape dépend de la longueur du plasmide à amplifier (**Figure 44**).

Le produit PCR obtenu est traité avec 0,4 µL de *Dpn* I durant 5 min à 37 °C. Le *Dpn* I est une enzyme fournie par le kit qui permet de digérer l'ADN parental. Puis, les bactéries TOP 10 sont transformés avec les produits de PCR. Le lendemain, des clones sont prélevés et leurs ADN plasmidiques purifiés à l'aide du kit Nucleospin plasmid de Macherey-Nagel sont envoyés à séquencer.



**Figure 44 : Principe de la mutagenèse dirigée selon le kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis**

### 3.3. Génération du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC sans étiquette histidine

Pour enlever les étiquettes histidine situées du côté N-terminal du NBD et du côté C-terminal du TMD, nous avons ré-amplifié par PCR nos gènes d'intérêt en introduisant des sites de restriction adéquates pour enlever les étiquettes du plasmide lors du clonage (**Tableau 13**). En effet, il existe le site de restriction de l'enzyme *NcoI* en amont de l'étiquette histidine rattachée au NBD et le site de restriction de l'enzyme *EcoRI* en aval de l'étiquette histidine rattachée au TMD. La stratégie consiste à encercler les étiquettes avec les sites de restriction des enzymes *NcoI* et *EcoRI* pour les digérer. Par la suite, le vecteur et l'insert digérés par les mêmes enzymes de restriction pourront être ligaturés grâce à l'ADN ligase (**Figure 45**).

Forward <b>NcoI</b> – SpABC	
5'	CTCAG <b>CCATGGG</b> GACACTTTTAGATGTAACACGTTCAAAAAA 3'
Reverse <b>EcoRI</b> – SpABC	
5'	CTAGT <b>GAATTC</b> TTACATTTGGACAATCTTACGATAACTTCTTG 3'

**Tableau 13 : Liste des amorces utilisées pour introduire *NcoI* et *EcoRI***

## **Introduction des sites de restriction NcoI et EcoRI**

Tout d'abord, des minipréparations des plasmides contenant SpABC WT, K48A et E170Q sont réalisées selon le protocole du kit Nucleospin plasmid de Macherey-Nagel. L'ADN d'intérêt est amplifié par PCR utilisant un volume réactionnel final de 50 µL. Ce milieu réactionnel est composé de :

- 10 µL du tampon iProof HF 5x de Bio-rad
- 1 µL du mix de dNTP à 10 Mm
- 0,5 µL de l'ADN polymérase iProof de Bio-rad
- 1 ng d'ADN parental
- 0,5 µM de Forward **NcoI** – SpABC
- 0,5 µM de Reverse **EcoRI** – SpABC
- Qsp 50 µL avec de l'eau ultra-pure (Sigma)

A la fin de la PCR, la quantité d'ADN obtenu est déterminée grâce au spectrophotomètre Nanodrop. Puis, une PCR clean-up (Nucleospin Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel) est réalisée avant de déposer les échantillons sur une gel d'agarose 0,8%. Le marqueur de tailles moléculaires est le Biotium 1 Kb.

## **Digestion des inserts et du plasmide avec EcoRI et NcoI**

Le milieu réactionnel de la digestion est composé de 10 µL de tampon tango 2x (Thermofisher), 1 µL d'enzyme EcoRI et 1 µL d'enzyme NcoI pour un volume final de 50 µL. Deux µg de plasmides pRSFDuet-1 et 1,5 µg de chaque insert sont digérés 3h à 37 °C. Après une PCR clean-up, la concentration des ADN est mesurée au nanodrop.

## **Purification du vecteur vide pRSFDuet-1 digéré**

Le plasmide digéré est déposé sur un gel à 0,8% d'agarose. Puis, la bande correspondante au vecteur vide fut découpée et pesée. Le protocole d'extraction de l'ADN contenu dans les gels d'agarose du kit Nucleospin Gel and PCR clean-up de Macherey-Nagel est utilisé. Après avoir mesuré la concentration en ADN, 50 ng de vecteur vide et d'inserts digérés sont déposés sur un gel d'agarose 0,8%.

## **Ligature**

L'intensité des bandes d'inserts et de vecteur vide est comparée pour déterminer la quantité d'inserts nécessaire pour faire la ligature avec 25 ng de vecteur vide. Une quantité de 54,5 ng d'inserts

est utilisée. La ligature se fait dans un volume réactionnel de 10  $\mu\text{L}$  en présence de 1  $\mu\text{L}$  de tampon ligase 10x et 1  $\mu\text{L}$  d'ADN ligase. Un contrôle de la ligature sans inserts est aussi effectué.

Les bactéries TOP 10 sont transformées avec 5  $\mu\text{L}$  des produits de la ligature puis étalées sur des boîtes de pétri contenant du LB-agar avec 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  finale de kanamycine. Des boîtes de contrôle de la ligature sont aussi préparées en transformant les TOP 10 avec les produits de la ligature sans inserts. Les boîtes de Pétri sont incubées toute une nuit à 37  $^{\circ}\text{C}$ .

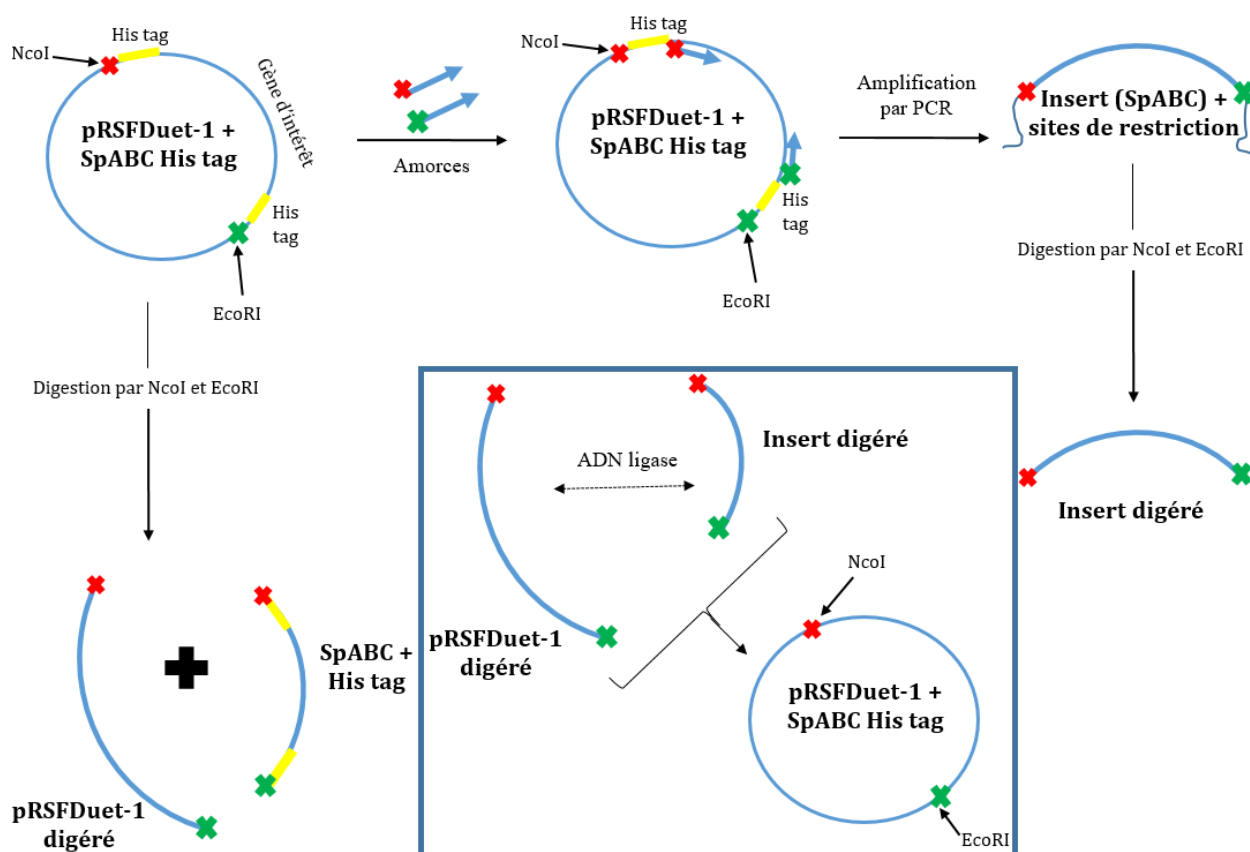


Figure 45 : Construction du plasmide pRSFDuet-1 + SpABC sans étiquette histidine

## 4. Biochimie

### 4.1. Quantification de l'expression génique de *SpABC* et *SpTCS* par qPCR

Les souches de *S. pneumoniae* WT et délétées au niveau du transporteur SpABC et/ou du système à deux composants SpTCS sont cultivées jusqu'à une  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,3$ . Puis, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bacitracine est rajoutée à la culture pour 30 min. Durant cette période, des échantillons sont prélevés à des temps donnés (5, 15 et 30 min). Une incubation de 15 min en présence de 375  $\text{ng}/\text{mL}$  de

vancomycine a aussi été réalisée avec les mêmes souches. Après avoir récupéré les culots de bactéries traités avec de l'ARN protect (Qiagen), ils sont incubés tout d'abord avec du lysozyme et de la protéinase K. Le lysozyme est connu pour détruire la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif en hydrolysant les peptidoglycanes. La protéinase K est une endoprotéase à serine qui n'a aucun effet sur les acides nucléiques, de ce fait, elle est largement utilisée dans les différentes techniques de préparation et de purification de ces derniers. La lyse des bactéries est réalisée grâce à l'ajout de billes de verre (Biorad), de  $\beta$ -mercaptoéthanol et à un vortex continu durant plusieurs minutes. Les ARNm sont extraits grâce au kit Nucleospin RNA de Macherey-Nagel. Après plusieurs traitements de ces échantillons d'ARNm incluant une incubation avec des ADNases, un chauffage à 70 °C durant 5 min et la détermination de la concentration en ARNm, les échantillons sont utilisés pour réaliser la synthèse des ADN complémentaire (ADNc) grâce une transcriptase inverse. Ces ADNc sont par la suite utilisés pour réaliser une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative. Ces expériences ont été réalisées par le docteur Claire Durmort (IBS, Grenoble) et le protocole est détaillé dans la thèse du Dr. Vorac (Vorac 2016).

## 4.2. Méthodes de dosage des protéines

### 4.2.1. Détermination de la quantité de protéines totales par un dosage au BCA

En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en ions  $\text{Cu}^+$  qui forment un complexe de couleur pourpre en chélatant deux molécules d'Acide BiCinchoninique (BCA). Ce complexe coloré est mesurable à 562 nm. L'absorbance lue est proportionnelle à la concentration de protéines (P. K. Smith et al. 1985). Le dosage s'effectue en plaque Greiner 96 puits, incubée pendant 30 min à 37 °C avant la lecture de l'absorbance. Cela permet de minimiser les réactions secondaires qu'il peut y avoir entre le réactif et certaines chaînes latérales d'acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine ou la cystéine. Cette méthode permet de détecter de 1 à 100  $\mu\text{g}$  de protéines.

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA protein assay® (ThermoFisher). Une gamme étalon allant de 0 à 50  $\mu\text{g}$  de BSA (Bovine Serum Albumine) est réalisée en duplicat. Les protéines sont diluées 5 et 10 fois dans de l'eau distillée. Les dosages d'échantillons, réalisés en triplicat, sont préparés dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$  avec 5 ou 10  $\mu\text{L}$  de protéines diluées. Par la suite, 200  $\mu\text{L}$  du réactif de coloration composé d'un réactif A (1 g/L de bicinchoninate de sodium, 20 g/L de carbonate de sodium, 9,5 g/L de bicarbonate de sodium, 1,6 g/L de tartrate de sodium et 4 g/L de soude) et d'un réactif B (4% de sulfate de cuivre) dans un rapport 50/1 (v/v) respectivement sont déposés dans chaque puit. La plaque est incubée 30 min à 37 °C puis l'absorbance est lue à 562 nm dans un lecteur de plaques TECAN®.



#### 4.2.2. Détermination de la concentration de protéines purifiées par un dosage de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique qui permet de quantifier la concentration en protéines d'une solution grâce à une gamme étalon en BSA. Le bleu de Coomassie contenu dans le réactif de Bradford interagit avec les acides aminés aromatiques (tryptophane et phénylalanine) et basiques (histidine, arginine et lysine) des protéines et entraîne un changement de coloration (bleue). La valeur d'absorbance obtenue est proportionnelle à la concentration de protéines présentes dans la solution. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm (Bradford 1976).

Les échantillons sont préparés dans un volume final de 560  $\mu\text{L}$  d'eau supplémentée de la solution protéique à doser (entre 5 et 40  $\mu\text{L}$ ) ainsi qu'une quantité uniforme du détergent utilisé lors de la purification. Une gamme étalon allant de 0 à 10  $\mu\text{g}$  de BSA est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons mais supplémentée du volume équivalent de tampon de dialyse. 600  $\mu\text{L}$  du réactif de Bradford (Thermo Scientific) sont ajoutés dans chaque tube. Après homogénéisation, l'absorbance est lue à 595 nm grâce à un spectrophotomètre.

### 4.3. Expression de SpABC dans *E. coli*

#### 4.3.1 Expression

Une colonie isolée de bactéries transformées par le plasmide pRSFDuet<sup>TM</sup>-1 – SpABC (WT, K48A ou E170Q) est inoculée dans 500 mL de milieu LB (ou du milieu 2xYT (Difco)) contenant 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamycine. Cette culture, réalisée dans des flasques à ailettes de 2L, est mise à incuber toute la journée à 37 °C sous une agitation de 180 rpm. Lorsque l'absorbance à 600 nm de la culture atteint une valeur comprise entre 0,6 et 0,8, 1 mM d'IPTG est ajouté pour déclencher l'induction pendant une nuit à 25 °C sous une agitation de 180 rpm.

#### 4.3.2. Préparation et purification des vésicules de membranes inversées

À la fin de l'induction, la culture est centrifugée à 7000 x g pendant 20 min à 4 °C. Le culot de bactéries obtenu est re-suspendu dans 30 mL de tampon de lyse (HEPES-NaOH 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) avant d'être éclatées grâce à 3 passages dans un Microfluidizer®. Les forces de cisaillements dues à la différence de vitesse dans l'échantillon lysent les bactéries à une pression de 18000 psi (pound per square inch) soit 1,24 x 10<sup>8</sup> Pa (N/m<sup>2</sup>). Grâce à cette haute pression, les membranes éclatées vont se recirculariser majoritairement en sens inverse : les NBDs du transporteur

sont situés à l'extérieur. Le lysat bactérien est centrifugé à 15000 x g pendant 30 min à 4 °C pour culotter les débris cellulaires ainsi que les bactéries non éclatées. Afin de culotter les membranes bactériennes, le surnageant est récupéré et centrifugé 1 h à 150000 x g à une température de 4 °C. Le culot de membranes est repris avec du tampon (HEPES-NaOH 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) et centrifugé de nouveau à 150000 x g pendant 1 h à 4 °C. Les culots membranaires sont re-suspendus dans 1 mL de tampon de stockage (HEPES-NaOH 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM et glycérol 20%), homogénéisés au broyeur de Potter-Elvehjem avant d'être répartis en aliquots, qui sont congelés à l'azote liquide puis stockés à - 80 °C jusqu'à utilisation. La concentration protéique des membranes est par la suite déterminée par un dosage au BCA.

#### 4.3.3. Contrôle de la surexpression du transporteur par SDS-PAGE

La surexpression du transporteur SpABC dans les vésicules de membranes inversées est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ou SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli, 1970). C'est une technique permettant de faire migrer et de séparer des protéines dans un gel sous l'influence d'un champ électrique. Le dodécyl sulfate de sodium (SDS), un détergent anionique constitué d'une longue chaîne carbonée, se fixe au niveau des zones hydrophobes des protéines. Du fait de leur charge négative, les molécules de SDS fixées sur la protéine se repoussent et entraînent la dénaturation des protéines. Etant donné que la quantité de SDS fixée est proportionnelle à la taille de la chaîne polypeptidique, les protéines ont toutes un rapport charge/masse similaire. Ainsi, la séparation se fait essentiellement en fonction de la masse moléculaire.

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide initiée par le persulfate d'ammonium et catalysée par le TEMED (N, N, N', N'-tetraméthylethylènediamine). Les pores du gel sont d'autant plus étroits que le pourcentage d'acrylamide est élevé. Ainsi, une protéine de faible masse moléculaire migrera plus vite et donc plus loin qu'une protéine ayant un poids moléculaire plus élevé.

Le gel de polyacrylamide est constitué de deux gels de réticulation différents. Tout d'abord, un gel de concentration de 5% (acrylamide/ bis-acrylamide dans un rapport 37,5/1 (v/v), 12,5 mM Tris pH 6,8, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, TEMED 0,1%) dont la faible réticulation permet aux protéines de pénétrer facilement et de se concentrer à l'interface du second gel. Celui-ci est un gel de séparation 15% (acrylamide/ bis-acrylamide dans un rapport 37,5/1 (v/v), 37,5 mM Tris pH 8,8, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1% et TEMED 0,04%) dont la réticulation plus élevée permet de séparer les protéines. Les protéines sont dénaturées avant le dépôt grâce au tampon

Laemmli dilué de telle sorte d'obtenir du tampon de Laemmli 1x (62,5 mM Tris pH 6,8, SDS 2%, glycérol 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0,01%). Les membranes *E. coli* ou de *L. lactis* sont déposées sur le gel et la migration est réalisée à un voltage constant de 150 volts durant 1 h 30 min dans du tampon de migration (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glycine et SDS 0,1%). Les protéines qui ont migrées dans le gel sont ensuite colorées pendant 30 min dans une solution de coloration de bleu de Coomassie (Brillant blue G 3,36 g/L et acide chloridrique 0,765%) puis décolorées dans de l'eau chaude.

#### 4.3.4. Détection de SpABC par Western blot avec un anticorps anti-étiquette histidine

Le Western blot est une technique permettant de détecter une protéine spécifique dans un mélange complexe à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Après migration sur un gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane poreuse (nitrocellulose, PVDF, nylon) qui sera mise en contact avec l'anticorps.

Dans cette étude, la membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) a été utilisée pour le transfert des protéines. Elle a été activée pendant une minute dans de l'éthanol 100%. Après la migration sur le gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur la membrane de PVDF durant 1 h 30 min à 300 mA dans le tampon (2,5 mM Tris-HCl pH 8, 19,2 mM glycine, 0,02% SDS et 20% d'éthanol). Le transfert des protéines sur la membrane est vérifié avec la coloration au rouge Ponceau qui sera éliminée après plusieurs lavages à l'eau. La membrane est, par la suite, saturée dans du tampon de blocage (25 mM de Tris Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0,1% de tween, 10% de lait en poudre entier) durant 1 h sous agitation à température ambiante. Puis, la membrane est mise en contact et sous agitation avec l'anticorps Penta-His HRP Conjugate dilué au 1/10000<sup>ème</sup> (Qiagen) dans un nouveau tampon de blocage durant 1 h à température ambiante ou toute une nuit à 4 °C. Après 3 rinçages de 10 min avec du tampon (25 mM de Tris Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0,1% de tween), les protéines sont détectées par chemiluminescence grâce au réactif Immobilon Forte Western HRP Substrate (Millipore).

#### 4.3.5. Tests d'expression de SpABC dans d'autres souches d' *E. coli* (DE3)

Les souches C41, C43, C44 et C45 dérivées des BL21(DE3) ont été transformées avec 15 ng de plasmides pRSFDuet<sup>TM</sup>-1 contenant le gène codant pour le transporteur ABC sauvage selon le protocole décrit dans la section 2.11. Le lendemain, pour chaque souche, une colonie isolée est prélevée puis inoculée dans 40 mL de milieu LB contenant 50  $\mu$ g/mL final de kanamycine. Les bactéries sont cultivées à 37 °C avec une agitation de 150 rpm jusqu'à une  $DO_{600nm} = 0,6$ . Un mL de chaque culture bactérienne est prélevé puis centrifugé 6000 x g, 4 °C durant 15 min. Les culots de

bactéries sont conservés à -20 °C. Le reste de chaque culture est divisé en 4 volumes égaux puis 1 mM final d'IPTG est ajouté dans chaque tube pour déclencher l'induction. Différents temps (4h ou toute la nuit) et températures (20, 25, 30 et 37 °C) d'induction ont été testés. Un mL de culture est prélevé dans chaque condition d'induction puis centrifugé comme décrit tantôt. Les culots de bactéries avant et après induction sont re-suspendus dans un volume d'eau distillée de telle sorte que la DO soit à 0,1. Le volume d'eau à rajouter est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Volume d'eau à rajouter} = \frac{\text{DO} \times 16 \mu\text{L}}{0,1}$$

Du tampon de Laemmli à une concentration finale de 1x est rajouté dans les bactéries permettant ainsi leur lyse. Les lysats bactériens sont par la suite déposés sur des gels SDS-PAGE pour vérifier la surexpression du transporteur SpABC dans les souches testées. Ces lysats ont aussi été transférés sur des membranes de PVDF pour détecter le transporteur par Western blot utilisant l'anticorps anti-étiquette histidine.

L'expression de cette protéine a aussi été testée dans la souche C43  $\Delta\text{acrAB} - \Delta\text{macAB}$  (voir la section 4.6.4.).

#### 4.3.6. Tests d'expression de SpABC sans l'étiquette histidine

L'expression du transporteur SpABC sans l'étiquette histidine a été testée dans deux souches (BL21 (DE3) et C43  $\Delta\text{acrAB} - \Delta\text{ompF}$  (Kanonenberg 2018)) et dans deux milieux (LB et 2YT). Ces tests d'expression sont réalisés comme décrit dans les sections 4.3.1. à 4.3.3.

Des tests d'expression de la protéine SpABC ont aussi été réalisés dans la souche C43  $\Delta\text{acrAB} - \Delta\text{macAB}$  généreusement fournie par le Dr Elise Kaplan de l'Université de Cambridge. Le protocole utilisé sera détaillé dans la section 4.6.4.

### 4.4. Purification du transporteur SpABC

#### 4.4.1. Solubilisation

##### 4.4.1.1. Principe

Pour purifier les transporteurs ABC sauvage et mutants, il est nécessaire de les extraire des vésicules de membranes bactériennes. Dans cette optique, différents détergents sont utilisés à une concentration nettement supérieure à leurs CMC (Concentration Micellaire Critique). La CMC correspond à la concentration en détergents dans une solution à partir de laquelle les micelles se

forment de manière spontanée. Le détergent n'étant plus présent sous sa forme monomérique, il va s'insérer dans les vésicules de membranes en déstabilisant la bicouche lipidique permettant ainsi d'extraire les protéines et de les solubiliser. Les protéines membranaires vont être entourées d'une couronne de détergent en solution (Chaptal et al., 2017). Les détergents seront toujours utilisés à une concentration supérieure à leur CMC tout au long des étapes de la purification.

#### 4.4.1.2. Protocole

##### - Premières solubilisations

Les protéines membranaires à une concentration totale de 4 mg/mL sont solubilisées avec 1% de LMNG, 1% de DDM ou 1,5% de UDM (Anatrice) dans du tampon de solubilisation (Tris 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM). La solubilisation s'effectue sur la nuit (18 h à 9 h) à 4 °C sous agitation. Pour arrêter cette solubilisation, une ultracentrifugation d'1 h à 150000 x g est effectuée pour séparer les protéines solubilisées contenues dans le surnageant des protéines insolubles retrouvées dans le culot.

##### - Optimisation de la solubilisation

Pour optimiser le protocole pour la solubilisation du transporteur SpABC en LMNG, des tests de solubilisation ont été effectués. Différents temps de solubilisation (2 h et toute la nuit à 4 °C), des concentrations diverses de LMNG (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 1,5%) et deux concentrations de protéines membranaires lors de la solubilisation (2 et 4 mg/mL) ont été testés (**Tableau 14**).

[LMNG] en %	Temps de solubilisation	[Protéines membranaires] lors de la solubilisation en mg/mL
0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 1,5	2h ou toute la nuit à 4°C	2 et 4

**Tableau 14 : Conditions utilisées lors des tests de solubilisation avec LMNG du transporteur SpABC**

Pour une concentration finale de protéines membranaires à 4 mg/mL, 50 mg de vésicules de membrane sont mélangées à un certain volume de tampon de solubilisation (Tris 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM et Détergent). Elles sont incubées 2 h à 4 °C sur une roue tournant à 20 rpm. Par la suite, la solution est centrifugée à 150000 x g pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant contenant toutes les protéines solubilisées est récupéré pour être purifié. Les concentrations de détergents utilisées pour l'extraction protéique sont indiquées dans le **Tableau 15**.

Par la suite, le tampon de solubilisation a été modifié : 100 mM d'HEPES-NaOH pH 8, 150 mM de NaCl, 10 % de glycérol. Ce tampon est celui que nous recommandons.

## 4.4.2. Purification sur une colonne Ni-NTA

### 4.4.2.1. Principe

La purification du transporteur ABC est réalisée par une chromatographie d'affinité IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) sur un système AKTA Purifier ou un système Biorad NGC. La colonne utilisée contient une résine sépharose Ni-NTA (Nickel-NitriloTriAcetic acid). Le principe repose sur l'interaction entre les ions  $\text{Ni}^{2+}$  fixés sur la colonne avec l'étiquette hexahistidine présente sur les protéines d'intérêt. Le NBD porte l'étiquette à son extrémité N-terminale alors qu'elle est du côté C-terminal pour le TMD. Les protéines marquées sont retenues au niveau de la colonne. L'élution de la protéine est faite par un gradient croissant d'imidazole de 20 mM à 500 mM. L'imidazole entre en compétition avec les noyaux des histidines de l'étiquette. De ce fait, les protéines se décrochent de la colonne et sont éluées.

### 4.4.2.2. Protocole

#### - **Protocole de purification initial**

Les concentrations de détergents utilisées lors des étapes de purification sont indiquées dans le **Tableau 15**. Les pourcentages de détergents sont environ cinq fois supérieurs à leurs CMC respectives lors des étapes de purification. La purification débute par une étape d'équilibration de la colonne HiTrap 1 mL (GE Healthcare) avec un tampon A (Tris 100 mM pH 8,0, glycérol 10 %, NaCl 150 mM et détergent). Les protéines solubilisées sont diluées ~ 2 fois avant d'injecter l'échantillon à un débit de 1 mL/min. Cela permet aussi de diluer la quantité de détergents facilitant ainsi la fixation de l'étiquette histidine sur la colonne de nickel. La colonne est lavée avec du tampon A ayant 20 mM d'imidazole pour revenir à la ligne de base. Ce tampon est par la suite remplacé progressivement par du tampon B (Tris 100 mM pH 8,0, glycérol 10 %, NaCl 150 mM, détergent et imidazole 500 mM) jusqu'à 100% en utilisant un gradient avec un incrément de 10% / min. Le fait d'équilibrer la colonne avec un tampon contenant de l'imidazole permet, de prime abord, de s'affranchir de certains contaminants. Au cours de l'élution, un volume de 2 ml est collecté par fraction. Toutes les étapes de lavage et d'élution sont effectuées avec les mêmes pourcentages de détergents indiqués dans la colonne purification **Tableau 15**.

#### - **Optimisation de la purification**

Dans le but d'optimiser le rendement ainsi que la stabilité du transporteur, les protéines solubilisées sont diluées 4 fois et la composition du tampon de solubilisation ainsi que les tampons A et B de purification ont été modifiées. Ces tampons ont la même composition de base (100 mM

d'HEPES pH 8, 150 mM de NaCl, 10 % de glycérol) supplémentés d'une quantité déterminée de détergents selon l'utilisation (**Tableau 15**). De plus, lors de l'équilibration de la colonne, le tampon A est supplémenté de 20 mM d'imidazole. Les étapes de la solubilisation et de la purification sont appliquées comme décrit précédemment avec, cependant des temps de lavage plus longs. Ce dernier protocole est celui que nous recommandons.

<b>Détergents</b>	<b>CMC (%), H<sub>2</sub>O</b>	<b>Solubilisation Détergent (%)</b>	<b>Purification Détergent (%)</b>
LMNG	0,001	0,5	0,005
UDM	0,029	1,5	0,15
DDM	0,0087	1	0,05

**Tableau 15 : Pourcentage de détergent utilisé pour les étapes de solubilisation et de purification**

#### 4.4.3. Dialyse

La dialyse est l'étape qui fait suite à la purification. Elle permet d'éliminer l'imidazole présent dans les fractions de protéines purifiées. A la fin de la purification sur la colonne HisTrap, les fractions de protéines purifiées sont récupérées et rassemblées dans un boudin de dialyse d'une porosité de 12 à 14 kDa. Les fractions sont d'abord dialysées toute une nuit puis 6 h à 4 °C sous agitation mécanique faible en renouvelant le tampon de dialyse (100 mM d'HEPES pH 8, 150 mM de NaCl, 10 % de glycérol et détergent à la concentration indiquée dans le **Tableau 15**). La quantité de détergents dans le tampon de dialyse est la même que celle utilisée durant les étapes de purification.

### 4.5. Analyses fonctionnelles du transporteur SpABC

#### 4.5.1. Préparation des liposomes

Les protéines purifiées en détergents sont reconstituées en protéoliposomes (**Figure 41**) en suivant le protocole décrit par Orelle et ses collaborateurs en 2003 (Orelle et al. 2003). Une solution d'extraits totaux de lipides d'*E. coli* (Avanti Polar lipids) est préparée à une concentration finale de

25 mg/mL dans de l'eau. Puis, 80  $\mu$ L de cette solution est mélangée à 20  $\mu$ L de DDM (N-DoDecyl  $\beta$ -D-Maltoside) 10 %, sous agitation pendant 45 min à température ambiante dans le but de solubiliser les lipides. A la fin de cette étape d'incubation, des vésicules mixtes constituées de lipides et de détergents sont formées. Par la suite, un volume correspondant à 100  $\mu$ g de protéines purifiées est ajouté au mélange lipides/détergents. Du tampon (50 mM HEPES-KOH pH 8,0) est ajouté dans la reconstitution pour compléter le volume final à 500  $\mu$ L. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 45 min. Au cours de cette étape, les protéines vont s'insérer dans les vésicules mixtes de lipides/détergents. Enfin, le détergent est éliminé à l'aide de bio-beads® : 3 additions de 40 mg de bio-beads® sont réalisées toutes les heures. Avant leur utilisation, les bio-beads® (Bio-Rad) sont activées dans un volume d'éthanol puis rincées à plusieurs reprises avec plusieurs volumes d'eau distillée avant d'être stockées à 4°C. Les protéoliposomes sont récupérés et conservés par la suite à 4 °C. Des liposomes vides peuvent aussi être préparés suivant le même protocole. La seule différence est que le volume de protéines ajouté est remplacé par le volume du tampon de dialyse de la protéine d'intérêt.

#### 4.5.2. Purification des liposomes par gradient de sucrose

Les protéoliposomes sont déposés sur un gradient de sucrose afin de séparer les liposomes contenant le transporteur des liposomes vides et des protéines agrégées. Les gradients sont constitués de sept couches successives d'un volume de 400  $\mu$ L chacune comportant une quantité différente de sucrose (Sigma) : 30%, 20%, 15% et 10%. Les solutions de sucrose sont réalisées dans du tampon (50 mM HEPES-KOH pH 8,0). La couche avec la plus forte concentration en sucrose est déposée dans le fond du tube à ultracentrifugation (Beckman Coulter). La couche suivante, moins concentrée en sucrose est délicatement déposée sur la couche précédente pour ne pas mélanger les dépôts. La même démarche est suivie jusqu'au dépôt de la dernière couche qui sera la moins concentrée en sucrose. Lorsque le gradient est prêt, un volume de 1000  $\mu$ L de protéoliposomes est disposé puis une ultracentrifugation de 12 h est réalisée à 4 °C à une vitesse de 200.000 x g. Les différentes couches de sucrose sont récupérées puis un volume de 10  $\mu$ L de chaque souche est déposé sur un gel SDS-PAGE pour visualiser la position des protéoliposomes ayant incorporé le transporteur. Pour déterminer la quantité de protéines contenue dans les protéoliposomes, un logiciel nommé imageJ est utilisé pour comparer l'intensité des bandes avec celles de protéine purifiée sur le gel SDS-PAGE.



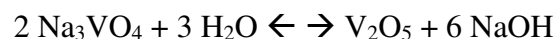
### 4.5.3. Mesure de l'activité ATPase et GTPase du transporteur SpABC

#### 4.5.3.1. Préparation des solutions d'ATP et de GTP

La poudre d'ATP (Jena Biosciences) et celle de GTP High Quality (Sigma) sont dissoutes dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. La solution étant très acide malgré l'utilisation d'une solution tampon, des ajouts successifs de NaOH ont été réalisés pour équilibrer la solution à un pH de 7,2. Sachant que l'ATP absorbe à 259 nm avec un  $\epsilon$  de  $15400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et le GTP absorbe à 253 nm avec un  $\epsilon$  de  $13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , les concentrations d'ATP et de GTP sont déterminées en utilisant la loi de Beer-Lambert. Pour cela, l'absorbance de la solution de nucléotides diluée au  $1/10000^{\text{ème}}$  est mesurée dans une cuve en quartz de mL au spectrophotomètre à la longueur d'onde correspondante. La valeur obtenue multipliée par le facteur de dilution permet d'avoir la concentration réelle des solutions d'ATP et de GTP.

#### 4.5.3.2. Préparation de la solution d'orthovanadate

Une quantité de 100 mg d'orthovanadate de sodium ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (Sigma) est dissoute dans 3 mL d'eau distillée. La solution est chauffée à  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  pour dissoudre la poudre et reformer l'orthovanadate car en solution aqueuse, cette molécule se transforme en oxyde de vanadium selon la réaction suivante :



A ce stade, la solution présente une coloration jaune-orangée. Des ajouts successifs d'acide chlorhydrique pour équilibrer la solution à un pH de 10 ainsi que des étapes de chauffage à  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  sont réalisés jusqu'à ce que la solution devienne incolore. Pour terminer la concentration réelle de la solution d'orthovanadate, l'absorbance est mesurée à 265 nm ( $\epsilon_{\text{Vi}} = 2925 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et la loi de Beer-Lambert est appliquée. La solution obtenue peut soit être laissée à température ambiante et à l'abri de la lumière, soit conservée à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Avant toute utilisation, la solution devra être de nouveau chauffée à  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 5 min pour reformer l'orthovanadate.

#### 4.3.1.1. Principe de la mesure des activités ATPase et GTPase

Le milieu réactionnel contenant du PhosphoEnol Pyruvate (PEP) et de la pyruvate kinase (PK) permet de régénérer l'ATP hydrolysé par le transporteur. L'ADP (Adénosine DiPhosphate) libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP est pris en charge par la pyruvate kinase qui, en présence de PEP va catalyser la réaction et former du pyruvate et de l'ATP. La Lactate DésHydrogénase (LDH) catalysant la réaction d'oxydation du pyruvate en lactate en présence de NADH (Nicotinamide

Adénine Dinucléotide) permet de réduire ce dernier en  $\text{NAD}^+$  (**Figure 46**). La PK est également capable de régénérer le GTP de la même manière que l'ATP.

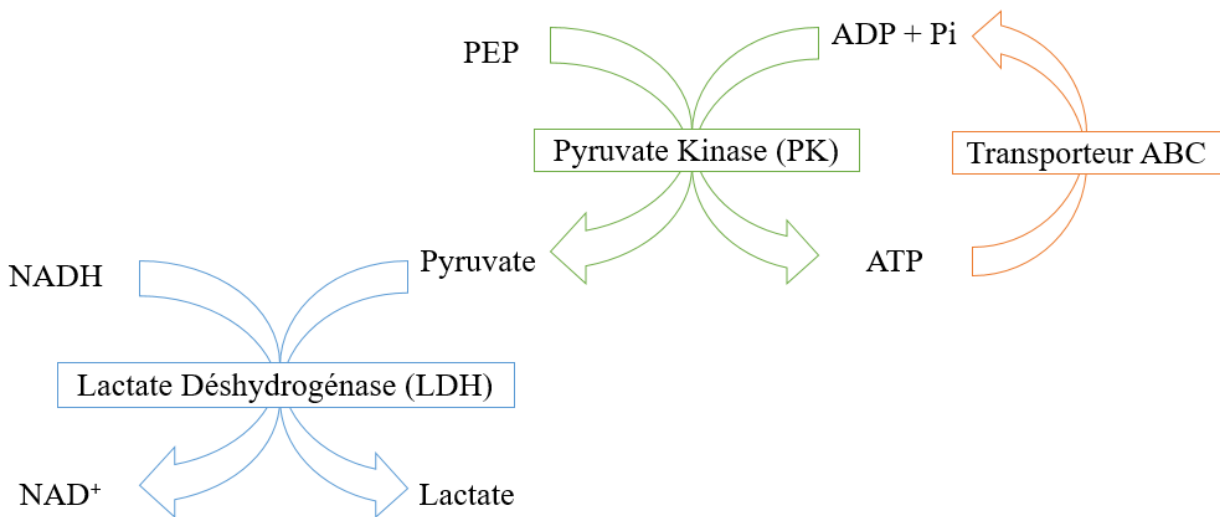
Le NADH est une molécule absorbant à 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Les réactions étant stoechiométriques, l'activité ATPase du transporteur peut ainsi être directement suivie grâce à la disparition du NADH au cours du temps. Le suivi de la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm durant 20 min à l'aide d'un spectrophotomètre permet de déterminer l'activité du transporteur.

#### 4.5.3.3. Protocole

Les activités ATPase et GTPase du transporteur sont mesurées en protéoliposomes et en détergents. Ces tests sont réalisés à 37 °C dans des cuvettes en quartz de 2 mL. Pour cela, 700  $\mu\text{L}$  du tampon ATPase (50 mM d'HEPES-KOH pH 8,0, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM de PEP, 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PK, 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LDH et 0,3 mM de NADH) est ajouté dans la cuve. Après l'ajout de 5 mM d'ATP ou de GTP final, les cuvettes sont pré-incubées dans le spectrophotomètre thermostaté à 37 °C pendant 5 min. Pour les cuves contenant du GTP, il sera peut-être nécessaire de rajouter une petite quantité de NADH pour atteindre une valeur de NADH initiale acceptable.

Dans le cas de la mesure de l'activité ATPase ou GTPase du transporteur en détergents, une concentration de détergents identique à celle utilisée dans l'étape finale de la purification est rajoutée dans la cuve. Enfin, des liposomes contenant 2  $\mu\text{g}$  de protéine d'intérêt ou 5  $\mu\text{g}$  de protéines purifiées en détergents sont ajoutés à la solution avant de débiter la mesure. La disparition du NADH est mesurée pendant 20 min puis les pentes obtenues sont utilisées pour déterminer, grâce au coefficient d'extinction molaire du NADH ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), l'activité ATPase en nmol/min/mg de protéines. Une cuve contenant tous les composants du milieu réactionnel mais sans protéine est utilisé comme contrôle.

Les activités ATPase et GTPase sont aussi mesurées en présence de différentes concentrations de PAMs allant jusqu'à 1 mg/mL. L'ortho-vanadate est aussi ajouté dans le milieu réactionnel à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  pour inhiber l'activité d'hydrolyse du transporteur.



**Figure 46 : Mesure de l'hydrolyse de l'ATP grâce à un système enzymatique couplé**

## 4.6. Les protéoliposomes sont-ils imperméables ?

L'une des premières questions posées à la fin d'une reconstitution en protéoliposomes concerne leur imperméabilité. Pour vérifier l'étanchéité de ces protéoliposomes, une molécule fluorescente est encapsulée à l'intérieur des vésicules lipidiques. La perte de fluorescence de la molécule est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 4.6.1. Préparation de la 6-carboxyfluorescéine

La 6-carboxyfluorescéine (Sigma) est une molécule fluorescente très soluble dans l'eau avec une longueur d'onde d'absorption de 492 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm. Lorsque cette molécule est encapsulée dans les liposomes à une concentration suffisamment élevée (> 40 mM), sa fluorescence est très fortement atténuée par l'interaction pouvant exister entre les molécules fluorescentes voisines. De ce fait, lorsque l'étanchéité du liposome est endommagée, la 6-carboxyfluorescéine (6-CF) est libérée dans le milieu réactionnel, entraînant une augmentation de la fluorescence.

De la poudre de 6-CF est mélangée dans l'eau à hauteur de 50% du volume final. Cela veut dire que si l'on veut préparer 1 mL de solution de 6-CF, alors la quantité de poudre pesée est mélangée d'abord dans 500  $\mu$ L d'eau distillée. A ce stade, les particules de 6-CF ne sont pas dissoutes. Après ajout de quelques gouttes de NaOH 10 M, la solution de 6-CF devient homogène lorsqu'elle vire à la couleur noire. L'ajustement de la solution à un pH d'environ 7,4 se fera par des ajouts successifs de NaOH à 5 M. Pour suivre la progression du pH de la solution grâce à du papier pH ou un pH-mètre, une petite goutte de la solution mère est diluée dans de l'eau. Lorsque le bon pH est atteint, de l'eau

est rajoutée pour atteindre le volume final ainsi que la concentration désirée. La solution de 6-CF d'une concentration de 200 mM est conservée à l'abri de la lumière.

#### 4.6.2. Préparation des liposomes ayant incorporé la carboxyfluorescéine

La méthode de la préparation des liposomes est pratiquement la même que celle précédemment décrite. Seule la 1<sup>ère</sup> étape de la préparation des liposomes est modifiée. Lors de cette étape, en plus de l'ajout des lipides à 25 mg/ml et du DDM à 10%, 50 mM final de 6-CF sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 45 min. S'ensuit l'ajout du tampon HEPES 50 mM pH 8 supplémenté ou non de 0,005% de LMNG selon le cas où il s'agit de liposomes vides ou de liposomes vides avec du LMNG. Puis les bio-beads® sont ajoutés pour éliminer le détergent. Durant les étapes de la préparation de ces liposomes ainsi que leur conservation, ils doivent être à l'abri de la lumière.

#### 4.6.3. Purification des liposomes ayant incorporé la carboxyfluorescéine et mesure de la fluorescence

Pour s'affranchir de la présence en excès des molécules de 6-CF, les liposomes ont été chargés sur une colonne de dessalage PD-10 (GE, healthcare). Tout d'abord, 25 mL de tampon HEPES 50 mM pH 8 sont utilisés pour équilibrer la colonne. Il faut déposer un volume de 2,5 ml d'échantillon puis l'élution se fait par des ajouts successifs de 500 µL du même tampon d'équilibration en recueillant chaque éluat dans un tube différent. Un volume final de 3,5 mL est utilisé pour l'élution des liposomes. Puis, chaque tube est mesuré aux longueurs d'onde suivantes 280 nm et 492 nm pour suivre respectivement la présence de protéines et de 6-CF. Les tubes présentant une absorbance élevée pour les deux longueurs d'onde utilisées sont retenus pour les expériences futures.

La fluorescence de la 6-CF est suivie à une longueur d'onde d'absorption de 492 nm et une excitation comprise entre 500 et 600 nm. Les mesures sont réalisées à 37 °C dans le même tampon utilisé pour les tests d'activité ATPase sans la présence de NADH qui absorbe à 340 nm. Des ajouts de 0,5% de triton X-100 (Sigma), de 300 µg/mL de bacitracine et de 7,5 µg/mL de nisine sont réalisés au cours de ces mesures.

#### 4.6.4. Tests de transport sur SpABC

Pour étudier la fonctionnalité de la protéine SpABC ainsi que le sens du transport des substrats, plusieurs stratégies ont été testées.

La 1<sup>ère</sup> stratégie a été de mesurer le transport en utilisant un peptide fluorescent le 7-Actinomycine D (7-AAD) car les peptides antimicrobiens ne sont pas fluorescents en général. Le peptide 7-AAD présente une longueur d'onde d'excitation de 546 nm et une longueur d'onde d'émission à 647 nm. L'expérience consiste à utiliser des vésicules de membranes inversées enrichies en SpABC WT et K48A pour mesurer la fluorescence des molécules transportés à l'intérieur de ces vésicules. C'est une technique qui est couramment utilisée dans le laboratoire pour montrer l'activité de transport des transporteurs ABC (Orelle et al. 2018). L'ajout de la molécule fluorescence induit une augmentation de la fluorescence qui sera réduite lors du transport de la molécule du compartiment extra-vésiculaire vers le compartiment intra-vésiculaire. La mesure se fait dans des cuvettes en quartz de 2 mL et le volume réactionnel final est de 1 mL. Le tampon de transport (50 mM HEPES-KOH pH 8.0, 8.5 mM NaCl, 4 mM PEP, 60 µg/mL PK, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) avec 10 µM de 7-ADD est tout d'abord incubé à 25, 30 ou 37 °C avant qu'une quantité de 500 µg de vésicules de membranes inversées soit ajoutée. Le transport est déclenché par l'ajout de 5 mM d'ATP. Les mesures sont effectuées durant 20 min avec le fluorimètre Photon Technology International Quanta Master I. Les transporteurs ABC sans étiquette histidine ont été exprimés de la même manière que les transporteurs avec les étiquettes histidine.

La 2<sup>ème</sup> stratégie consiste à exprimer les transporteurs SpABC WT et K48A, pourvus ou non de l'étiquette histidine, dans la souche C43  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB*, et de comparer le niveau de résistance des cellules à la bacitracine ou autres peptides antimicrobiens. Après avoir transformé les bactéries compétentes avec les plasmides contenant les protéines d'intérêt, un clone isolé est inoculé dans 10 mL de milieu LB en présence de kanamycine à 50 µg/mL final. Lorsque la culture atteint une DO<sub>600nm</sub> = 0,6, 1 mM d'IPTG est ajouté pour déclencher l'induction. Différentes températures d'induction sont testées (25, 30 et 37 °C) durant 1h 30 min avant de diluer les cultures à une DO<sub>600nm</sub> = 0,002. Ensuite, 90 µL de ces bactéries sont ajoutés dans tous les puits de la plaque pour un volume final de 180 µL en présence d'IPTG à 1 mM final et d'une gamme de concentrations croissantes de PAMs allant de 0 à 10 mg/mL. Les plaques sont incubées à différentes températures (25, 30 et 37 °C) durant toute une nuit (16 h). Le lendemain, l'absorbance est lue à 600 nm sur le lecteur de microplaques (TECAN®). Les cellules entières après induction sont déposées sur un gel SDS-PAGE pour vérifier la surexpression du transporteur SpABC.

## 4.7. Expression de SpABC dans *L. lactis*

### 4.7.1. Expression

Les bactéries *L. lactis* ont été transformées par le vecteur pERL vide et vecteur pERL contenant le gène de SpABC WT ou SpABC K48A. L'étiquette histidine est situé en position N-terminale du NBD. Le vecteur pERL vide possède un gène de résistance à l'érythromycine alors que le vecteur pERL contenant les gènes des transporteurs ABC présente un gène de résistance au chloramphénicol. A partir de ces bactéries, une pré-culture de 50 ml de milieu M17 supplémenté avec 0,5% de lactose, 0,5% de glucose et 5 µg/mL des antibiotiques correspondants est effectuée durant toute une nuit à 30 °C sans agitation en conditions anaérobies. Le lendemain, une culture de 1 L de milieu M17 supplémenté avec 0,5% de lactose, 0,5% de glucose et 5 µg/ml de chloramphénicol ou d'érythromycine est démarrée en diluant la pré-culture de la veille à une DO de 0,1. Les cultures sont incubées en anaérobie à 30 °C sans agitation. Lorsque la DO à 600 nm de la culture atteint 0,5, une concentration finale de 10 ng/mL de nisine est ajoutée pour déclencher la production des protéines d'intérêt. L'induction dure 5 h et se fait à 30 °C en anaérobie et sans agitation. Pour récupérer les bactéries, la culture est centrifugée à 7000 x g, à 4 °C durant 10 min.

### 4.7.2. Préparation et purification des vésicules de membranes inversées

Le culot bactérien, re-suspendu dans 80 ml du tampon (20 mM de MOPS-KOH pH 7,3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM KCl et 0,4 mg/ml de lysozyme) est laissé toute une nuit à température ambiante. Le lysozyme est une enzyme capable d'hydrolyser l'épais peptidoglycane que l'on retrouve chez les bactéries à Gram positif, facilitant ainsi l'éclatement de ces cellules à très fortes pressions. Le lendemain, les bactéries sont éclatées à l'aide du Microfluidizer® utilisant le même principe décrit dans la section 4.3.2. Le lysat bactérien est centrifugé 30 min à 15000 x g puis le surnageant est ultracentrifugé 1 h à 150000 x g. Le culot de membranes est re-suspendu dans 800 µl de tampon (10 mM HEPES-KOH pH 7.5, 20% glycérol), homogénéisés au broyeur de Potter-Elvehjem avant d'être répartis en aliquots, qui sont congelés à l'azote liquide puis stockés à - 80 °C jusqu'à utilisation.

### 4.7.3. Sensibilité des bactéries *L. lactis* exprimant SpABC aux peptides antimicrobiens

Après avoir surexprimé les transporteurs ABC sauvage et inactif dans la bactérie *L. lactis* avec du milieu M17 supplémenté avec 0,5% de lactose, 0,5% de glucose, la fonctionnalité des protéines est examinée. La sensibilité des bactéries surexprimant les transporteurs ABC est étudiée en présence de différents PAMs.

La culture bactérienne est diluée à une absorbance de 0,004 en présence de 5 µg/mL de chloramphénicol ou d'érythromycine. Puis, 150 µL de ces bactéries sont ajoutés dans tous les puits de la plaque contenant préalablement 150 µL de milieu M17 supplémenté avec 0,5% de lactose, 0,5% de glucose pour un volume final de 300 µL en présence d'une gamme de concentrations croissantes de PAM allant de 0 à 256 µg/mL. La croissance des *L. lactis* est suivie grâce à un lecteur de microplaques (TECAN®) à différentes températures (25 °C, 30 °C et 37 °C) sans agitation mécanique. L'absorbance est lue à 600 nm toutes les 15 min pendant 15 h.

## 5. Analyses protéomiques

### 5.1. Préparation des échantillons

Les souches R6 *wt* et R6  $\Delta spTCS$  ont été cultivées dans 4 x 50 mL de milieu TH à 37 °C sans agitation et en anaérobie. Une fois la DO de la culture comprise entre 0.3 et 0.4, une culture de R6 *wt* et une culture de R6  $\Delta spTCS$  sont conservées dans la glace. Ces prélèvements représentent les échantillons à T = 0 sans aucun ajout. Dans les deux cultures bactériennes restantes, une concentration finale de 1 µg/mL de bacitracine est ajoutée dans chaque tube puis les bactéries sont mises à incuber 45 min à 37 °C, en conditions d'anaérobie avec une agitation mécanique de 60 rpm. Ils représentent les échantillons à T = 45 min en présence de bacitracine. Les échantillons obtenus sont normalisés à une DO de 0,8 dans 10 mL.

Les bactéries sont culottées à 4000 x g pendant 10 min à 4 °C puis sont re-suspendues dans 1 mL de tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5 froid. Les bactéries sont de nouveau culottées à 10000 x g pendant 5 min à 4 °C puis re-suspendues comme mentionné précédemment. Les bactéries sont transférées dans des tubes eppendorf low binding et sont, par la suite, culottées après une centrifugation de 10000 x g pendant 5 min à 4 °C. Les culots de bactéries sont conservés à – 80 °C jusqu'à leur utilisation.

Trois cultures de R800 *wt* et trois cultures de R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* ont été chacune réalisées dans 14 ml de milieu Todd Hewitt à 37 °C en conditions d'anaérobie. Lorsque les DO à 600 nm atteignent des valeurs comprises entre 0,3 et 0,4, la souche mutante a été incubée avec 1 ou 32 µg/mL de bacitracine durant 45 min, tandis que la souche sauvage n'a été soumise qu'à 1 µg/mL. Les bactéries sont récupérées après une centrifugation de 10 min, 4000 x g, 4 °C puis conservées à – 80 °C jusqu'à leur utilisation.

## 5.2. Extraction des protéines totales

Après la décongélation des culots bactériens dans la glace, un volume de 300  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA (acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique) et de pastilles antiprotéases à raison d'une pastille pour 100 mL (Roche)) est rajouté dans chaque tube. Les bactéries sont cassées à l'aide du bioruptor du Dr Jérôme Lemoine (Institut des Sciences Analytiques, ISA). Deux cycles de lyse ont été réalisés à une température de 4 °C. D'une durée de 15 min chacun, ces cycles sont constitués de 30 sec d'un bain d'ultrasons et 30 sec de repos. A la fin de la lyse, un volume de 700  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse est ajouté dans chaque tube. Pour les souches R800, les bactéries ont été lysées grâce à un sonicateur avec les réglages suivants : 2 cycles de 20 coups à une puissance de 3,3 et un cycle de 20 coups à une puissance de 4,4. Après chaque cycle, les échantillons sont mis dans la glace durant 1 min.

Dans le but de solubiliser le maximum de protéines membranaires, 100  $\mu\text{L}$  de fos-choline-12 (Anatrace) à 10% est ajouté dans chaque tube. La fos-choline-12 est un détergent zwitterionique qui possède une grande capacité à extraire les protéines membranaires (Mathieu et al. 2019). Les lysats bactériens sont mis à solubiliser sur une roue pendant 1 h 30 min à 4 °C. Une ultracentrifugation à 150000 x g, 4 °C d'une durée d'1 h est réalisée pour récupérer les protéines solubles et solubilisées. La quantité de protéines obtenue est déterminée par un dosage au BCA.

Lorsque la quantité des protéines est connue, les échantillons sont envoyés en spectrométrie pour qu'ils soient analysés. Environ 30  $\mu\text{g}$  de protéines pour chaque échantillon ont été nécessaires pour effectuer l'expérience. Les analyses ont été effectuées par Adeline Page et Frédéric Delolme de la plateforme PSF (Protein Sciences Facility) SFR Biosciences de l'UMS 3444.

L'analyse par la spectrométrie de masse a été faite à 2 reprises en utilisant le système TMT de 6 échantillons. Dans la 1<sup>ère</sup> expérience, les échantillons R6 *wt* et R6  $\Delta spTCS$  en présence de bacitracine ont été dupliqués biologiquement. Dans la 2<sup>nd</sup> expérience, ce sont les échantillons R6 *wt* et R6  $\Delta spTCS$  en absence de bacitracine qui ont été dupliqués biologiquement. Les échantillons des souches R800 ont chacune été effectués en triplicat biologique

## 5.3. Détermination du protéome de *S. pneumoniae* par spectrométrie de masse (SM)

Les expériences de spectrométrie de masse (SM) ont été réalisées par la plateforme PSF de la SFR Biosciences (UMS 3444, CNRS) située à Lyon, France. Ils ont utilisé la technique du marquage TMT (Tandem Mass Tag) (Thompson et al. 2003). Il s'agit d'une méthode de quantification relative



permettant de comparer les quantités protéiques contenues dans différents échantillons. A la suite de la digestion enzymatique des protéines du mélange complexe, les peptides obtenus sont marqués par un réactif TMT. Lors de la fragmentation MS/MS, le réactif TMT génère un ion fragment de masse connue. La quantité de chaque ion fragment reflète celle de la protéine marquée. Cela permet la quantification relative des protéines dans les différents échantillons à tester. Les protéines sont identifiées en comparant les masses et spectres MS/MS des peptides qui en sont issus avec ceux des protéines déjà recensées dans les bases de données disponibles. Pour un protocole plus détaillé, voir l'Annexe 2.

## 6. Etude biochimique du peptide Sp36

Sp36 est un peptide 36 acides aminés codés par un gène de 108 paires de bases (bp) qui précède les gènes du transporteur SpABC (NBD et TMD). Ces trois gènes forment un opéron. Toutefois, le gène codant ce peptide n'est pas annoté dans le génome de *S. pneumoniae*. D'après les logiciels de prédiction des structures secondaires, le peptide Sp36 formerait une triple hélice  $\alpha$ .

Le peptide Sp36 ainsi que la version « scrambled » qui présente la même composition en acides aminés mais un agencement différent, ont été synthétisés chimiquement dans les mêmes conditions par la plateforme PSF (Protein Science Facility).

### 6.1. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique spectroscopique qui permet d'étudier la conformation des molécules (peptides, protéines, acides nucléiques, sucres ...) sans limite de taille. Le principe repose sur la capacité d'un échantillon à absorber la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. La différence d'absorbance entre ces deux lumières pour chaque longueur d'onde donne le spectre dichroïque.

Le spectre dichroïque du peptide Sp36 synthétique a été mesuré dans différents environnements ( $H_2O$ , HEPES-KOH 50 mM pH 8, 0,125 à 1,25 mg d'extraits totaux de lipides *d'E. coli*, 0,005% de LMNG, 0,05% de DDM, 25 à 250  $\mu g$  de lipides de soja, 15 mM  $SO_4^{2-}$ , 15 mM  $HCO_3^-$  (Avitabile, D'Andrea, et Romanelli 2015; Kim A. Brogden 2005) et de TriFluoroEthanol (TFE)).

Une solution de Sp36, préparée à une concentration finale de 10  $\mu M$ , est introduite dans une cuve en quartz d'un trajet optique de 1 mm, puis mise en présence des différentes conditions rapportées ci-dessus. Les mesures de dichroïsme circulaire de ce peptide sont effectuées à température ambiante ( $\sim 25$  °C) avec le Chirscan de Applied Photophysics Limited entre les longueurs d'onde

180 nm et 260 nm. Les résultats sont exprimés en MRE (Mean Residue Ellipticity) et le pourcentage de structures secondaires est déterminée utilisant le logiciel disponible sur ce site <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> .

## 6.2. Sensibilité des bactéries au peptide Sp36

Les bactéries *S. aureus* RN4220, *B. subtilis* 168 et *E. coli*  $\Delta$ AcrAB/AcrEF sont chacune cultivées dans 20 mL de milieu LB à 37 °C sous une agitation de 180 rpm. Lorsque les cultures bactériennes atteignent une DO à 600 nm comprise entre 0,6 et 0,8, les cultures sont diluées à une DO de 0,004. Ensuite, 100  $\mu$ L de ces bactéries est ajouté dans tous les puits de la plaque pour un volume final de 200  $\mu$ L en présence d'une gamme de concentrations croissantes de peptide Sp36 allant de 0 à 256  $\mu$ g/mL. La croissance des bactéries est suivie grâce à un lecteur de microplaques (TECAN®) à 37 °C avec agitation. L'absorbance est lue à 600 nm toutes les 15 min pendant 15 h.

## 6.3. Détection de Sp36

### 6.3.1. Par un anticorps anti-Sp36

La synthèse d'un anticorps polyclonal dirigé contre le peptide Sp36 a été réalisée par l'entreprise BIOTEM. Après l'obtention de l'anticorps, sa limite de détection a été déterminée.

Au vu de la taille du peptide Sp36 (~ 4 kDa), des gels tricine ont été utilisés. Ces gels sont couramment utilisés pour séparer avec une bonne résolution des protéines ayant une masse moléculaire (MM) inférieure à 30 kDa (Schägger 2006). Tout d'abord, il y a un gel de concentration de 4% (acrylamide/ bis-acrylamide dans un rapport 37,5/1 (v/v), 4% de tampon 3x pH 8,45 constitué de 3 M de Tris, 1 M de HCl, 0,3% de SDS, persulfate d'ammonium 0,075%, TEMED 0,075%) puis un gel de séparation 17% (acrylamide/ bis-acrylamide dans un rapport 37,5/1 (v/v), 3% de tampon 3x, 0,1 g/L de glycérol, persulfate d'ammonium 0,03% et TEMED 0,03%). Différentes quantités de Sp36 allant de 1 à 100 ng sont déposées sur le gel. Après une migration à 150 volts, ces protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose durant 2 h à 70 volts dans le tampon (2,5 mM Tris-HCl pH 8, 19,2 mM glycine, 0,02% SDS et 20% d'éthanol) froid. La membrane est, par la suite, saturée dans du tampon de blocage (25 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0,1% de tween, 10% de lait en poudre entier) durant 1 h sous agitation à température ambiante. Puis, la membrane est mise en contact et sous agitation avec l'anticorps anti-Sp36 dilué au 1/5000<sup>ème</sup> dans un nouveau tampon de blocage durant 1 h à température ambiante ou toute une nuit à 4 °C. Après 3 rinçages avec du tampon (25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de tween), la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire de lapin (goat anti-rabbit immunoglobulin HRP

secondary antibody de BioRad) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans un nouveau tampon de blocage. Après 3 rinçages avec du tampon (25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de tween), la membrane est révélée par chemiluminescence grâce au réactif Immobilon Forte Western HRP Substrate (Millipore).

Deux cultures de la souche R6 WT sont réalisées dans 125 mL de milieu Todd Hewitt chacune à 37 °C sans agitation et en anaérobie. Lorsque la DO à 600 nm est comprise entre 0,3 et 0,4, l'une des cultures est incubée durant 45 min avec 1 µg/mL de bacitracine. Les cultures sont centrifugées pour récupérer (7000 x g, 20 min) les culots bactériens qui sont conservés à – 80 °C jusqu'à leurs utilisations. Le lendemain, les culots sont décongelés puis re-suspendus chacun dans 1 mL de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA et de pastilles antiprotéases à raison d'une pastille pour 100 mL (Roche)). Les bactéries sont lysées au sonicateur avec les réglages suivants : 20 coups à la puissance 3.3 et 2 x 20 coups à la puissance 4.4 avec des poses 2 min dans la glace après chaque série de 20 coups. Le lysat bactérien est centrifugé 30 min à 15000 x g, 4 °C. Pour chaque échantillon, un volume de 20 µL est prélevé, mélangé avec 5 µL de tampon Laemmli 5x et chauffé à 80 °C pendant 5 min puis déposé sur un gel tricine. Un Western blot comme décrit précédemment est effectué. Une quantité de 4 ng de Sp36 synthétique a été déposée sur le gel pour servir de contrôle positif à l'expérience.

### 6.3.2. Par interaction de Sp36 avec l'héparine

Un volume d'1 mL de Sp36 a été préparé dans du tampon HEPES 50 mM pH 8 aux concentrations suivantes : 25, 10 et 5 µg/mL. Ces échantillons sont mis en contact avec des billes d'héparine (Heparin Sepharose® 6 Fast Flow GE17-0998-01 Sigma Aldrich) durant 4 h à 4 °C sous une agitation douce. Les échantillons sont centrifugés (1000 rpm rotor f452411 durant 5 min) et le surnageant est récupéré. Les billes sont lavées à 3 reprises avec 1 mL de tampon HEPES 50 mM pH 8 à chaque fois. Les billes sont récupérées après une centrifugation (1000 rpm rotor f452411 durant 5 min) puis reprises dans 20 µL d'eau et 5 µL de Laemmli 5x. Les échantillons sont chauffés à 80 °C pendant 5 min pour casser l'interaction entre les billes et l'héparine. Chaque 25 µL d'échantillon est déposé sur un gel tricine 17%. A la suite de la migration à 150 volts, les protéines sont colorées dans une solution de bleu de Coomassie (Brillant blue G 3,36 g/L et acide acétique 0,75%) puis décolorées dans de l'eau chaude.

Un volume de 500 mL de culture de R6 WT a été réalisé à 37 °C en conditions d'anaérobie. Lorsque la DO à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, les bactéries sont récupérés après une centrifugation de 20 min, 7000 x g, 4 °C. Le culot est conservé à – 80 °C. Le lendemain, le culot bactérien est re-suspendu dans 4 mL de de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA et

de pastilles antiprotéases à raison d'une pastille pour 100 mL (Roche)) puis soniqué selon les réglages suivants : 20 coups à la puissance 3.3 et 2 x 20 coups à la puissance 4.4 avec des poses 2 min dans la glace après chaque série de 20 coups. Le lysat cellulaire est centrifugé (15000 x g, 30 min, 4 °C) pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant obtenu est équitablement divisé en 4 volumes. Nous avons aussi préparé 1 mL de tampon HEPES-KOH 50 mM pH 8 contenant 10 ng de Sp36 synthétique. Les échantillons sont mis en contact des billes d'héparine durant 4 h à 4 °C sous une agitation douce. Ces billes sont préalablement lavées avec les tampons des échantillons à tester. A la fin de l'incubation, les surnageants sont enlevés après une centrifugation de 1000 rpm (rotor f452411) puis une série de 3 lavages successifs est réalisé avec, à chaque fois, 1 mL de tampon HEPES 50 mM pH 8 ou 1 mL de tampon Tris-HCL 10 mM EDTA 1 mM selon l'échantillon. A la fin du dernier lavage, les culots sont repris dans 20 µL d'eau et 5 µL de Laemmli 5x puis conservés à -20 °C. Le lendemain, les échantillons sont chauffés à 80 °C pendant 5 min pour casser l'interaction entre les billes et l'héparine. Chaque 25 µL d'échantillon est déposé sur un gel tricine 17%. A la suite de la migration à 150 volts, un Western blot pour détecter Sp36 est réalisé.

La culture de la souche R6 WT est réalisée dans deux erlens contenant chacun 125 mL de milieu Todd Hewitt. Lorsque la DO à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, l'une des cultures est incubée 45 min avec 1 µg/mL de bacitracine. Les cultures sont centrifugées (7000 x g, 20 min, 4 °C) puis les culots récupérés sont conservés à -80 °C. Le lendemain, les culots bactériens sont chacun re-suspendus dans 1 mL de de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA et de pastilles antiprotéases à raison d'une pastille pour 100 mL (Roche)) puis soniqués selon les réglages suivants : 20 coups à la puissance 3.3 et 2 x 20 coups à la puissance 4.4 avec des poses 2 min dans la glace après chaque série de 20 coups. Les lysats cellulaires sont centrifugés (15000 x g, 30 min, 4 °C) pour enlever les débris cellulaires. Les surnageants sont conservés dans la glace.

Des solutions de peptide Sp36 ont été préparées dans le tampon de lyse avec différentes concentrations d'EDTA : 1, 1,5, 2 et 2,5 mM et une solution de peptide Sp36 dans du tampon HEPES 50 mM pH 8.

Le kit « DELFIA Eu-labeled » (Eu-N1-ITC chelate) (PerkinElmer) est utilisé. Les molécules de l'échantillon ayant une affinité avec l'héparine vont se fixer sur l'héparine préalablement chargée dans les puits. Après des séries de lavage, l'anticorps primaire dirigé contre le peptide Sp36 est ajouté et va se fixer selon sa spécificité. Puis un second anticorps marqué avec de l'euporium est ajouté et cela sur l'anticorps primaire, permettant ainsi de détecter par fluorescence les molécules liées à l'héparine et reconnues par l'anticorps primaire.

Une plaque 96 puits préalablement chargée en héparine a été achetée et utilisée (BioworldSupplier Diversity Partner Heparin-Coated Microplates (Clear)). Chaque puits est lavé avec 200  $\mu$ L du tampon correspondant (**Tableau 16**) pendant 10 min sous une agitation orbitale (16 rpm). Le contenu des puits est aspiré puis les différents échantillons sont ajoutés à la plaque selon le plan du **Tableau 16**. La plaque est incubée toute une nuit à 4 °C sous une légère agitation. Cette étape permet la liaison des molécules ayant une affinité pour l'héparine.

Le lendemain, le contenu liquide des puits est aspiré. Chaque puits est par la suite lavé avec 200  $\mu$ L de solution de « DelFia wash » diluée 25 fois dans de l'eau distillée pendant 5 min sous une agitation orbitale (16 rpm). Trois lavages successifs sont réalisés. Après avoir aspiré le liquide du dernier lavage, les puits sont bloqués avec 200  $\mu$ L de solution de PBS contenant 1% de BSA pendant 1 h à température ambiante sous agitation orbitale (16 rpm). Après avoir enlevé la solution de blocage, un volume de 100  $\mu$ L de la solution « DelFia assay buffer » contenant l'anticorps anti-Sp36 dilué au 1/1500<sup>ème</sup> est ajouté dans chaque puits adéquat (**Tableau 16 puits**). La plaque est incubée 3 h à température ambiante sous une agitation orbitale (16 rpm). Après avoir enlevé la solution d'anticorps, les puits sont lavés 3 fois de suite avec 200  $\mu$ L de solution de « DelFia wash » diluée 25 fois pendant 5 min sous une agitation orbitale (16 rpm). Après avoir aspiré le liquide du dernier lavage, ajouter dans chaque puits (**Tableau 16 puits et puits**), un volume de 100  $\mu$ L d'IgG anti-lapin marqué par Eu (Europium) dilué à une concentration finale de 100 ng/mL dans la solution « DelFia assay buffer ». La plaque est incubée 1 h à température ambiante sous une agitation orbitale (16 rpm). Le contenu de la plaque est aspiré et les puits sont lavés 6 fois avec 300  $\mu$ L de la solution de « DelFia wash » diluée 25 fois. Chaque lavage dure 5 min sous une agitation orbitale (16 rpm). Après avoir aspiré le liquide du dernier lavage, un volume de 200  $\mu$ L de la solution « DelFia enhancing » est ajouté dans chaque puits et la plaque est incubée 10 min à température ambiante sous une agitation orbitale (16 rpm). Puis, la fluorescence de la plaque est déterminé grâce à un lecteur de microplaques avec une longueur d'onde d'excitation comprise entre 320 et 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 615 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 $\mu$ L de Tris 10 mM – EDTA 1 mM			100 $\mu$ L de Tris 10 mM – EDTA 1,5 mM			100 $\mu$ L de Tris 10 mM – EDTA 2 mM			100 $\mu$ L de Tris 10 mM – EDTA 2,5 mM		
<b>B</b>	100 $\mu$ L de R6 WT sans bacitracine			100 $\mu$ L de R6 WT avec bacitracine			100 $\mu$ L de R6 WT sans bacitracine + 50 ng de Sp36 dans Tris 10 mM – EDTA 1 mM			100 $\mu$ L de HEPES 50 mM pH 8		

<b>C</b>	50 µL de R6 WT sans bacitracine	50 µL de R6 WT avec bacitracine	100 µL de R6 WT sans bacitracine + 10 ng de Sp36 dans Tris 10 mM – EDTA 1 mM	100 µL de HEPES 50 mM pH 8 avec 50 ng de Sp36
<b>D</b>	16 µL de R6 WT sans bacitracine	16 µL de R6 WT avec bacitracine	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 1 mM avec 10 ng de Sp36	100 µL de HEPES 50 mM pH 8 avec 10 ng de Sp36
<b>E</b>	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 1,5 mM avec 10 ng de Sp36	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 2 mM avec 10 ng de Sp36	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 2,5 mM avec 10 ng de Sp36	100 µL de HEPES 50 mM pH 8
<b>F</b>	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 1 mM	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 1,5 mM	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 2 mM	100 µL de Tris 10 mM – EDTA 2,5 mM

**Tableau 16 : Plan de la plaque 96 puits pour la réalisation du test ELISA**

Puits où l'anticorps anti-Sp36 et l'anticorps secondaire ont été ajoutés.

Puits où seul l'anticorps secondaire a été ajouté.

Toutes les expériences d'interaction avec l'héparine ont été réalisées grâce au Dr Patricia Rousselle (LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire en Ingénierie thérapeutique), UMR 5305, CNRS, Lyon, France) dans le cadre d'une collaboration.

### 6.3.3. Par spectrométrie de masse

La souche R6 WT est cultivée dans 120 mL de milieu Todd Hewitt à 37 °C en conditions d'anaérobiose. Lorsque la DO à 600 nm atteint une valeur comprise entre 0,3 et 0,4, les bactéries sont culottées par centrifugation (7000 x g, 20 min, 4 °C). Les culots sont conservés à – 80 °C. Le lendemain, les culots sont re-suspendus dans 6 mL de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA et de pastilles antiprotéases à raison d'une pastille pour 100 mL (Roche)) puis soniqués selon les réglages suivants : 20 coups à la puissance 3.3 et 2 x 20 coups à la puissance 4.4 avec des poses 2 min dans la glace après chaque série de 20 coups. Les lysats cellulaires sont centrifugés (15000 x g, 30 min, 4 °C) pour enlever les débris cellulaires. Par la suite, le surnageant est divisé en 3 volumes égaux :

- 2 mL de surnageant est conservé tel quel.
- 2 mL de surnageant est passé dans un concentrateur de 30 kDa.
- 2 mL de surnageant est passé dans un concentrateur de 10 kDa.

Les concentrations ont été effectuées par des centrifugations successives de 2500 x g pendant 10 min. Les fractions passées à travers le filtre sont récupérées pour être analysées. Puis la quantité de protéines contenue dans chaque échantillon est déterminée par un dosage au BCA. Les surnageants ainsi qu'une solution de Sp36 à 1 mg/mL dans l'eau ont été donnés à la plateforme de spectrométrie de masse de PSF. Ces derniers vont utiliser la chymotrypsine pour digérer le peptide Sp36 et les échantillons puis tenter d'identifier le peptide Sp36 dans les différents surnageants. La chymotrypsine est une endoprotéase à serine qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques après des acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine), leucine, méthionine, glutamine ou asparagine.

## 7. Biologie cellulaire

### 7.1. Les lignées cellulaires

#### 7.1.1. Cellules A549

Les cellules A549 sont des cellules épithéliales basales adhérentes. Elles proviennent des alvéoles d'un humain atteint de carcinome. Ces cellules nous ont été généreusement fournies par le Dr Patricia Rousselle dans le cadre d'une collaboration.

#### 7.1.2. Cellules 16HBE

Les cellules 16HBE sont des cellules épithéliales adhérentes et immortalisées provenant des bronches humaines. Ces cellules nous ont aussi été généreusement fournies par le Dr Patricia Rousselle dans le cadre d'une collaboration.

### 7.2. Culture cellulaire

#### 7.2.1. Décongélation des cellules

Les cellules sont décongelées puis diluées dans un volume final de 10 mL de milieu complet pour diminuer la concentration de DMSO (diméthylsulfoxyde) (Sigma). Le milieu complet est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) « High Glucose » avec 4,5 g/L commercialisé par Dutscher et supplémenté par 10% de SVF (Sérum de Veau Foetal). Le mélange obtenu est centrifugé 5 min à 1000 rpm (rotor 11175338). Le culot cellulaire obtenu est re-suspendu dans 10 mL de milieu complet puis les cellules sont incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### 7.2.2. Conditions de culture

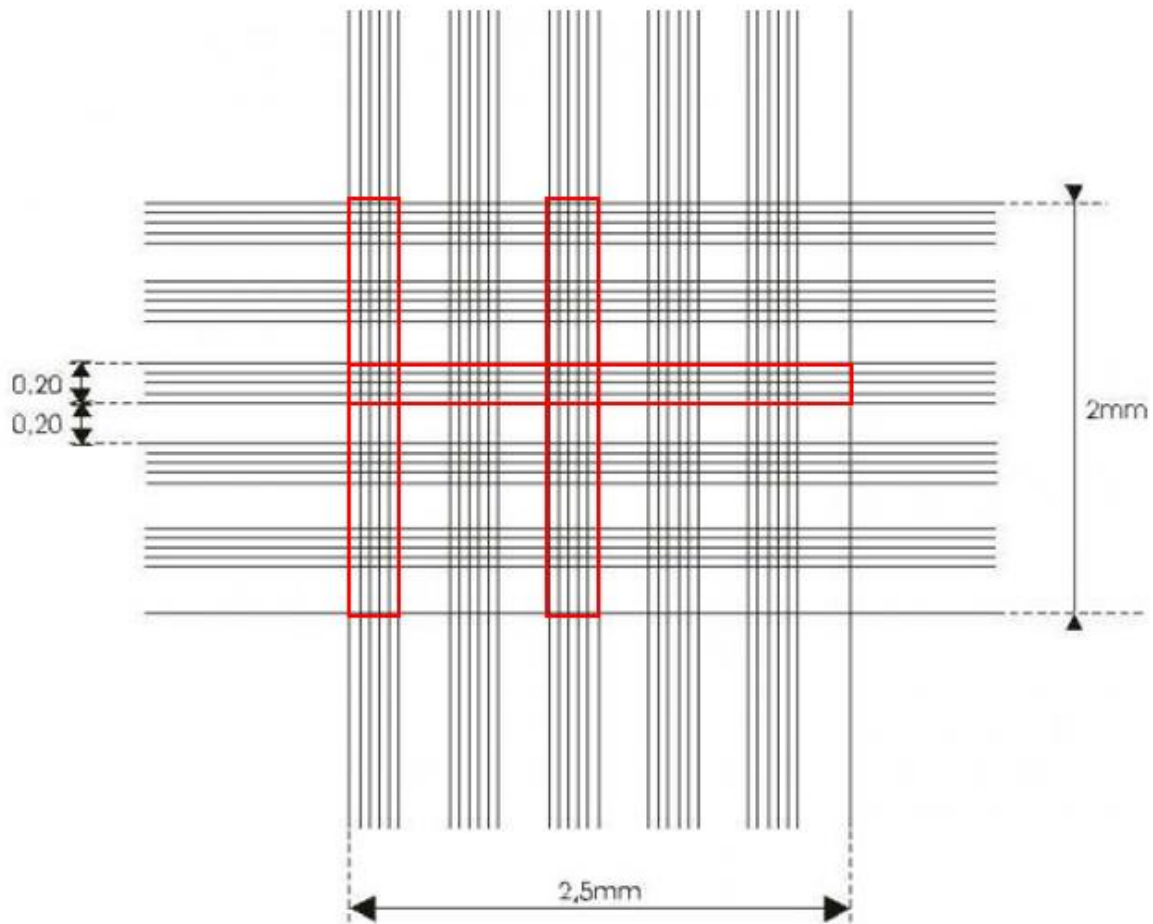
La culture des différentes lignées cellulaires mentionnées ci-dessus s'effectue dans des boîtes de cultures et sont incubées à 37 °C sous atmosphère humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

Lorsque les cellules commencent à devenir confluentes, il faut les transférer vers un autre contenant. Le passage des cellules s'effectue en plusieurs étapes. Après avoir enlevé le milieu de culture, les cellules sont rapidement lavées avec un volume de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) supplémenté de 5% d'un mélange Trypsine-EDTA (Biochem GmbH). Cette étape permet de se débarrasser de toutes traces du sérum qui a la propriété d'inhiber l'action de la trypsine. Puis, les cellules adhérentes sont détachées de leur support après leur incubation de quelques minutes (5 à 15 min selon la lignée cellulaire) à 37 °C en présence du tampon PBS-Trypsine-EDTA. L'action de l'enzyme est arrêtée par l'ajout d'un même volume de milieu de culture complet. A l'aide d'une pipette, les cellules sont bien mélangées pour se détacher les unes des autres et former des unités distinctes. Ces cellules en suspension sont par la suite centrifugées à 1000 rpm (rotations par minute) (rotor 11175338) durant 5 min. Une fois le surnageant vidé, les culots de cellules sont repris avec un volume de milieu de culture complet.

### 7.2.3. Comptage des cellules

Après avoir récupéré les cellules, il faut déterminer leur nombre. Pour cela, 10 µL de la suspension cellulaire est mélangée à 10 µL de Bleu trypan (Sigma) qui colore les cellules mortes. Dans une cellule de Malassez recouverte d'une lamelle, 10 µL de ce mélange sont déposés permettant ainsi de compter le nombre de cellules au microscope optique. La cellule de Malassez est un quadrillage de 100 unités de comptage qui contiennent chacune un volume de 0,01 µL (**Figure 44**). Le nombre de cellules compté sur trois lignes (chaque ligne comporte 10 unités de comptage) est moyenné puis multiplié par 10<sup>4</sup> et le facteur de dilution. Ce calcul permet de connaître le nombre de cellules dans 1 mL de solution. Par la suite, le nombre de cellules souhaité estensemencé puis incubé à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub>.





**Figure 47 : La cellule de Malassez**  
 (D'après [http:// www.bioltrop.fr/spip.php?article360](http://www.bioltrop.fr/spip.php?article360))

#### 7.2.4. Congélation des cellules

Les cellules sont lavées, trypsinées, reprises dans le milieu complet et centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm (rotor 11175338). Lorsque le surnageant est éliminé, le culot cellulaire est repris dans du milieu complet puis le nombre de cellules est compté. La suspension cellulaire est centrifugée dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites. Le culot de cellules est repris dans un milieu de congélation constitué de 70% de milieu DMEM « High glucose », 20% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) et 10% de DMSO utilisé comme cryoprotecteur. La suspension cellulaire est introduite dans une ampoule de congélation et est refroidie dans une boîte de congélation entourée de propan-2-ol qui permet une congélation délicate des cellules sans risques d'éclatement. Cette boîte est stockée à -80 °C avant d'être mise dans l'azote liquide. De ce fait, les lignées cellulaires peuvent être conservées pendant plusieurs années.

### 7.3. Test de cytotoxicité : le test XTT

Après avoir compté les cellules, des plaques de 96 puits sont préparées à jour J-3 à raison de 5000 cellules par puits. Les cellules sont cultivées dans un milieu complet à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub> durant 24 h.

A jour J-2, le milieu des cellules est remplacé par un milieu DMEM « High Glucose » supplémenté par différentes concentrations en peptides Sp36 et Sp36 « scrambled » diluées en cascades. Différentes concentrations de peptides sont testées : 0 ; 0,562 ; 1,125 ; 2,25 ; 4,5 ; 9 ; 18 et 36 µM. Les cellules sont incubées durant 48 h à 37 °C avec 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules ont aussi été traitées dans les mêmes conditions en présence du milieu DMEM seul. Chaque condition a été réalisée en six essais sur une même plaque 96 puits. Le volume final est le même dans tous les essais.

Le jour J, le test XTT est réalisé. Il consiste à mesurer l'activité métabolique cellulaire comme un indicateur de la survie des cellules, la prolifération cellulaire et l'effet cytotoxique d'un composé. Il s'agit d'une expérience colorimétrique basée sur la réduction du XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzène acide sulfonique hydraté), un composé de couleur jaune en formazan grâce aux cellules métaboliquement actives. Le XTT étant chargé négativement, il ne pourra pas pénétrer à l'intérieur des cellules. De ce fait, le XTT est couplé à un accepteur d'électrons intermédiaires capable de s'introduire dans les cellules et de transférer des électrons du NADH au XTT. Ce dernier sera en formazan. Ce produit de couleur orange est soluble dans une solution aqueuse et est directement quantifiable par l'absorbance lue à 490 nm dans un lecteur de plaques. Lorsque le nombre de cellules vivantes dans l'échantillon augmente, l'activité des déshydrogénases mitochondriales augmente. Cette augmentation est directement corrélée par la quantité de formazan orange formée.

Pour réaliser le test XTT, le milieu des cellules est enlevé et remplacé par un mélange de 0,85 µL de la solution d'accepteurs d'électrons intermédiaires, 100 µL de milieu DMEM seul et 50 µL de solution de XTT dans chaque puits. Une plaque de 8 à 10 essais à blanc est préparée avec le même mélange dans chaque puits. Ces plaques sont incubées durant deux h à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub> puis l'absorbance des plaques est lue à 490 nm. Puis, les plaques sont remises à l'incubateur pour trois h. S'ensuit une autre lecture d'absorbance à 490 nm. Les résultats obtenus après 5 hs de contact entre le XTT et les cellules sont utilisés dans le traitement des données.

Le pourcentage de survie cellulaire moyen dans chaque condition est déterminé selon le calcul suivant :

$$\% \text{ survie cellulaire} = \frac{\sum \mathbf{Ax}}{\sum \mathbf{Ao}} \times 100$$

## 7.4. Visualisation des cellules au microscope optique

Pour visualiser les cellules A549 et 16HBE, des plaques de 24 puits sontensemencées à raison de 30000 cellules par puits. Les cellules sont cultivées à 37 °C et avec 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM « High Glucose » supplémenté de 10% de SVF pendant 24 h. Puis, ce milieu est remplacé dans 12 puits par du milieu DMEM « High Glucose » seul. Dans les puits restants, le milieu est remplacé par du milieu DMEM « High Glucose » supplémenté par différentes concentrations en peptides Sp36 et Sp36 « scrambled » diluées en cascades. Les trois concentrations de peptides les plus élevées sont testées : 9 ; 18 et 36 µM. Les plaques sont incubées dans les mêmes conditions que précédemment durant 48 h. Chaque concentration de peptides est réalisée en duplicat.

Après cette période d'incubation, le milieu des différents puits est enlevé puis les cellules sont rincées avec du PBS stérile préchauffé à 37 °C. Puis, 500 µL de paraformaldéhyde (PA) 4% est ajouté dans chaque puits pour fixer les cellules. Les plaques sont conservées à 4 °C jusqu'à la visualisation des cellules au microscope optique.

Partie III :  
Résultats et  
Discussion

## 1. Etude de la fonction du couple BceAB-RS de *S. pneumoniae*

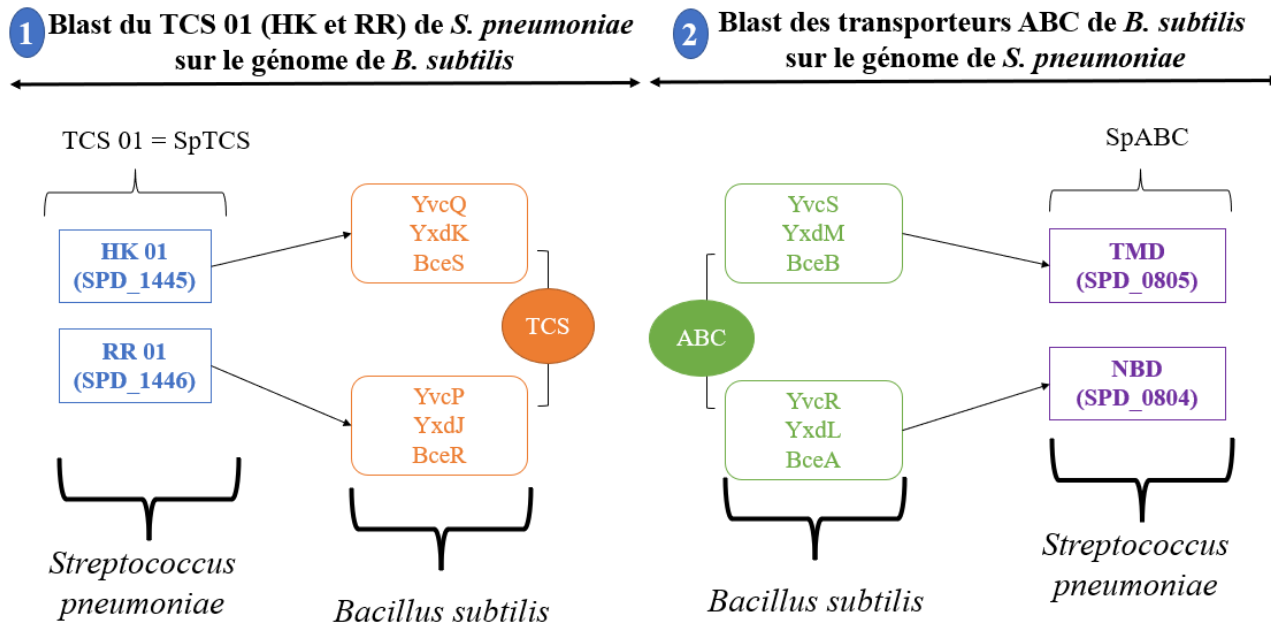
*S. pneumoniae* fait partie des 12 pathogènes listés par l'OMS comme étant des priorités dans la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques. C'est une bactérie commensale de l'homme qui peut devenir pathogène sous certaines conditions et coloniser différents sites, causant ainsi de nombreuses infections.

La capacité que possède le pneumocoque pour passer d'un stade inoffensif à un état pathogène est gouverné par son habilité à détecter les changements environnementaux, de mettre en place une réponse adaptée et de garantir sa survie. Pour y parvenir, le pneumocoque dispose de différents moyens de contrôle tels que les systèmes de régulation à deux composants.

### 1.1. Un TCS du pneumocoque potentiellement impliqué dans la résistance aux peptides antimicrobiens

Dans le génome de *S. pneumoniae*, il existe 13 TCS dont un qui est très peu caractérisé, il s'agit du TCS01. En délétant les 13 TCS du pneumocoque, Throup et ses collègues ont montré en 2000, que ce TCS01 faisait partie des TCS impliqués dans la virulence du pneumocoque chez la souris. En effet, la délétion de l'opéron *tcs01* induit une importante diminution de la croissance du pneumocoque (de 10 000 fois) dans la voie respiratoire du modèle souris (Throup et al. 2000).

Une recherche de similarité de séquences basée sur les séquences primaires de l'HK et du RR du TCS01 a été effectuée. Un blast de ces séquences protéiques est réalisé dans le génome de *B. subtilis*, qui est l'archétype des bactéries à Gram positif. On note que les trois plus proches homologues de l'HK01 sont les protéines YvcQ, YxdK et BceS (**Tableau 17**) et ceux du RR01 sont YvcP, YxdJ et BceR (**Tableau 18**) (**Figure 48**). Ces HK et RR identifiés chez *B. subtilis* sont encodés sur le même opéron et ces trois TCS (YvcPQ, YxdJK et BceRS) appartiennent à un groupe de protéines connues pour être impliquées dans la résistance à certains PAMs. Dans ces modules de détoxification, le TCS collabore avec un transporteur ABC appartenant au groupe BceAB pour détecter puis résister aux PAMs (Dintner et al. 2011; Ohki et al. 2003; Rietkötter et al. 2008). Dans la majorité des bactéries *Firmicutes* incluant *B. subtilis*, les gènes codant ces TCS sont adjacents à ceux codant pour les transporteurs ABC partenaires. Toutefois chez le pneumocoque, la présence d'un transporteur ABC n'a pas été détectée à proximité immédiate de l'opéron *tcs01*. Nous avons donc ensuite entrepris de rechercher s'il y avait chez le pneumocoque des transporteurs ABC similaires aux BceAB de *B. subtilis*.



**Figure 48 : Analyse utilisée pour identifier le couple SpABC/SpTCS**

	Score Max	Score total	Couverture référence	E-value	% identité	Code uniprot
Histidine kinase senseur <b>YxdK</b>	140	140	70%	4 <sup>-40</sup>	34.44	P42422
Histidine kinase senseur <b>BceS</b>	140	140	95%	4 <sup>-40</sup>	28.66	O35044
Histidine kinase senseur <b>YvcQ</b>	127	127	63%	6 <sup>-35</sup>	33.32	O06979
Histidine kinase senseur <b>WalK</b>	67.8	67.8	33%	2 <sup>-13</sup>	36.75	Q45614
Protéine senseur de la synthèse de l'alkaline phosphatase <b>PhoR</b>	54.3	54.3	60%	2 <sup>-9</sup>	24.88	P23545

**Tableau 17 : Résultats des recherches de Blastp dans *B. subtilis* en utilisant l'HK 01 de *S. pneumoniae* D39 comme référence**

	Score Max	Score total	Couverture référence	E-value	% identité	Code uniprot
Protéine de transduction du signal <b>BceR</b>	199	199	99%	2 <sup>-65</sup>	44.2	O34951
Protéine de régulation transcriptionnelle <b>YxdJ</b>	199	199	99%	3 <sup>-65</sup>	42.48	P42421

Protéine de régulation transcriptionnelle non caractérisée <b>YvcP</b>	186	186	97%	3 <sup>-60</sup>	39.56	O06978
Protéine de régulation transcriptionnelle non caractérisée <b>YclJ</b>	138	138	96%	1 <sup>-41</sup>	34.68	P94413
Protéine de régulation transcriptionnelle <b>WalR</b>	136	135	99%	1 <sup>-40</sup>	32.31	P37478

**Tableau 18 : Résultats des recherches de Blastp dans *B. subtilis* en utilisant le RR 01 de *S. pneumoniae* D39 comme référence**

Il existe chez *B. subtilis* trois transporteurs ABC appartenant à la famille des BceAB (BaCitracin Efflux) (Ohki et al. 2003) (YvcRS, YxdLM, BceAB) qui collaborent étroitement avec les TCS situés à proximité immédiate (YvcPQ, YxdJK, BceRS) pour résister aux PAMs (Staroń et al. 2011) (**Tableau 19**). Les transporteurs de type BceAB sont composés de deux sous-unités (TMD et NBD). Une recherche de similarité, basée sur la séquence primaire de chacun de ces transporteurs ABC de *B. subtilis* a été effectuée dans le génome de *S. pneumoniae* (**Figure 48**). Toutefois, à cause de la haute conservation de séquences des NBDs chez la superfamille des protéines ABC, les résultats donnés par les séquences des TMDs sont plus informatifs. Pour chacun des trois TMDs de *B. subtilis* testés, nous avons obtenu un seul résultat chez *S. pneumoniae* : SPD\_0805 (**Tableau 19**). Nous avons obtenu beaucoup plus de protéines similaires lorsque l'on utilise la séquence des NBDs comme référence. Toutefois, la protéine SPD\_0804 est toujours apparue dans la première entrée de la liste (**Tableau 20**). Ainsi, SPD\_0805 et SPD\_0804, dont les gènes sont en opéron, forment les TMDs et les NBDs du seul transporteur de la sous-famille BceAB présent chez *S. pneumoniae*. Par la suite, nous nommerons ce transporteur SpABC et TCS01 sera nommé SpTCS. A noter que selon la souche de pneumocoque utilisée, SpABC et SpTCS présentent une nomenclature différente (**Tableau 21**).

	Score Max	Score total	Couverture référence	E-value	% identité	Code uniprot
Query : YvcS <b>SPD_0805</b>	137	137	98%	4 <sup>-35</sup>	22.85	A0A0H2ZPF3
Query : YxdM <b>SPD_0805</b>	110	110	98%	1 <sup>-26</sup>	24.7	A0A0H2ZPF3
Query : BceB <b>SPD_0805</b>	122	122	48%	2 <sup>-30</sup>	27.44	A0A0H2ZPF3

**Tableau 19 : Résultats des recherches de Blastp dans *S. pneumoniae* en utilisant les TMDs YvcS, YxdM et BceB de *B. subtilis***

	Score Max	Score total	Couverture référence	E-value	% identité	Code uniprot
Query : YvcR <b>SPD_0804</b>	236	236	97%	2 <sup>-79</sup>	47.24	A0A0H2ZN40
<b>SPD_0687</b>	177	177	84%	1 <sup>-56</sup>	42	A0A0H2ZMS1
<b>SPD_1176</b>	161	161	83%	3 <sup>-50</sup>	39.35	A0A0H2ZMW2
Query : YxdL <b>SPD_0804</b>	243	243	96%	5 <sup>-82</sup>	47.62	A0A0H2ZN40
<b>SPD_0687</b>	174	174	85%	2 <sup>-55</sup>	42.27	A0A0H2ZMS1
<b>SPD_1176</b>	163	163	87%	7 <sup>-51</sup>	38.46	A0A0H2ZMW2
Query : BceA <b>SPD_0804</b>	245	245	97%	3 <sup>-83</sup>	48.19	A0A0H2ZN40
<b>SPD_0687</b>	183	183	83%	6 <sup>-59</sup>	43.60	A0A0H2ZMS1
<b>SPD_1176</b>	147	147	81%	7 <sup>-45</sup>	38.65	A0A0H2ZMW2

**Tableau 20 : Résultats des recherches de Blastp dans *S. pneumoniae* en utilisant les NBDs YvcR, YxdL et BceA de *B. subtilis***

	<b>R6</b>	<b>TIGR4</b>	<b>D39</b>
<b>HK</b>	SPR1473	SP_1632	SPD_1445
<b>RR</b>	SPR1474	SP_1633	SPD_1446
<b>ABC</b>	SPR0812	SP_0912	SPD_0804
<b>TMD</b>	SPR0813	SP_0913	SPD_0805

**Tableau 21 : Nomenclature des protéines BceRS et BceAB dans différentes souches de *S. pneumoniae***

En 2009, Becker et ses collègues ont montré que le transporteur SpABC était impliqué dans la résistance à la bacitracine. De plus, ils ont suggéré que ce transporteur fonctionnait peut-être avec TCS01 dont les gènes sont localisés à 0,64 Mb de distance sur le génome, ce qui est inhabituel pour



les BceAB/TCS classiques (Becker et al. 2009). L'année suivante, Majchrzykiewicz et les autres auteurs ont montré l'implication du transporteur SpABC dans la résistance contre la bacitracine et la nisine (Majchrzykiewicz et al. 2010).

Grâce à un programme de prédiction (TMHMM), la topologie du TMD du transporteur SpABC a été prédite. Tout comme les TMDs des transporteurs YvcRS, YxdLM et BceAB, elle présente 10 hélices transmembranaires avec un large domaine extracellulaire d'environ 200 acides aminés compris entre l'hélice 7 et l'hélice 8 du TMD, ce qui est caractéristique de la sous-famille BceAB (**Figure 49**). De plus, il existe un important pourcentage d'identité entre les trois systèmes trouvés chez *B. subtilis* et le couple SpABC/SpTCS découvert chez *S. pneumoniae* (**Tableau 22**). Cela suggère que SpTCS pourrait collaborer avec SpABC pour résister aux PAMs. Dans leur étude publiée en 2011, Dintner et ses collègues ont utilisé environ 250 transporteurs de type BceAB et des TCS provenant de bactéries *Firmicutes* pour effectuer des analyses co-évolutives et phylogénétiques. Grâce aux résultats obtenus, ils ont prédit des liens fonctionnels entre certaines protéines qui n'étaient pas voisines sur le génome. Parmi ces protéines se trouvaient le couple SpABC/SpTCS de *S. pneumoniae* (Dintner et al. 2011). Toutefois, aucune preuve expérimentale n'a démontré cette hypothèse.

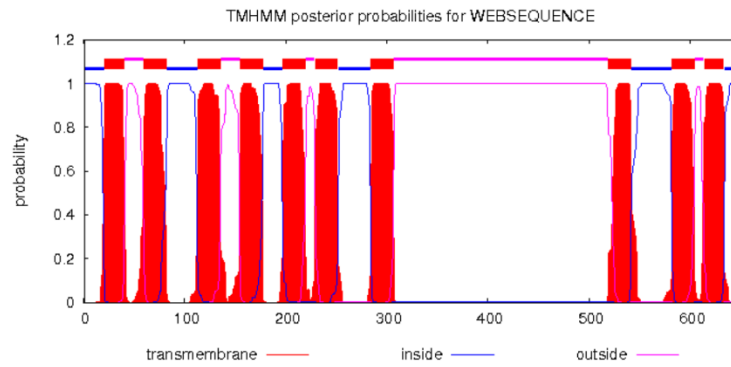
	Système à deux composants (TCS)		Transporteur ABC	
Protéines dans <i>S. pneumoniae</i>	SPD_1445 (HK)	SPD_1446 (RR)	SPD_0804 (NBD)	SPD_0805 (TMD)
Protéines dans <i>B. subtilis</i> 168	YvcQ (26 <sup>a</sup> /50 <sup>b</sup> ) YxdK (27 <sup>a</sup> /56 <sup>b</sup> ) BceS (27 <sup>a</sup> /53 <sup>b</sup> )	YvcP (38 <sup>a</sup> /67 <sup>b</sup> ) YxdJ (42 <sup>a</sup> /70 <sup>b</sup> ) BceR (43 <sup>a</sup> /68 <sup>b</sup> )	YvcR (46 <sup>a</sup> /71 <sup>b</sup> ) YxdL (44 <sup>a</sup> /72 <sup>b</sup> ) BceA (47 <sup>a</sup> /74 <sup>b</sup> )	YvcS (21 <sup>a</sup> /52 <sup>b</sup> ) YxdM (20 <sup>a</sup> /46 <sup>b</sup> ) BceB (21 <sup>a</sup> /51 <sup>b</sup> )

**Tableau 22 : Homologie de séquences entre différentes protéines de *S. pneumoniae* et *B. subtilis***

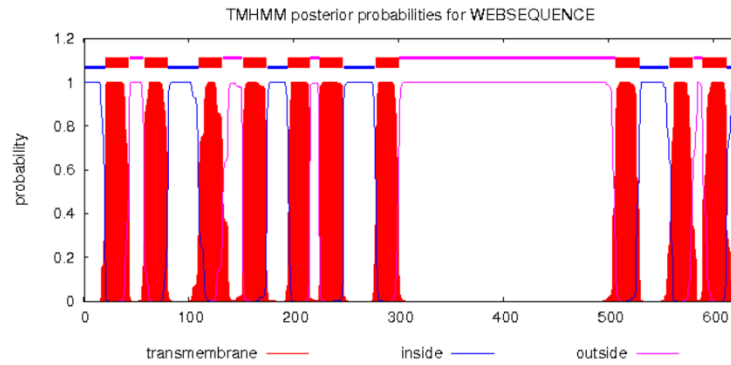
<sup>a</sup> Indique le pourcentage d'identité entre les protéines des deux organismes bactériens.

<sup>b</sup> Indique le pourcentage d'identité + le pourcentage de forte similarité entre les protéines des deux organismes bactériens.

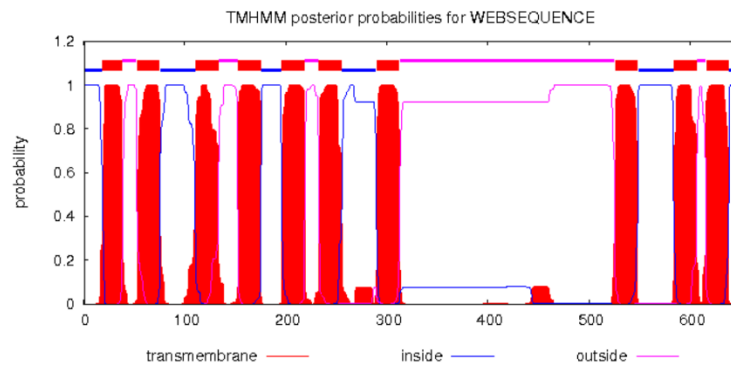
**YvcS**



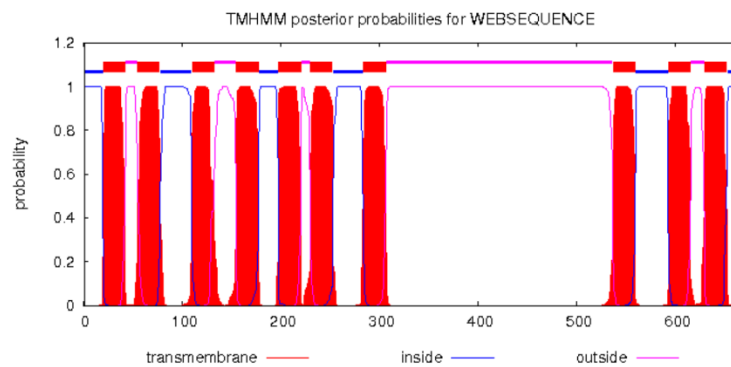
**YxdM**



**BceB**



**TMD de  
SpABC**



**Figure 49 : Prédiction de la topologie des TMDs de la sous-famille BceAB chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae***

Le serveur <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> a été utilisé.

## 1.2. Le couple BceAB-RS de *S. pneumoniae* est impliqué dans la résistance aux PAMs

### 1.2.1. Fonction de SpABC et SpTCS dans la résistance aux PAMs

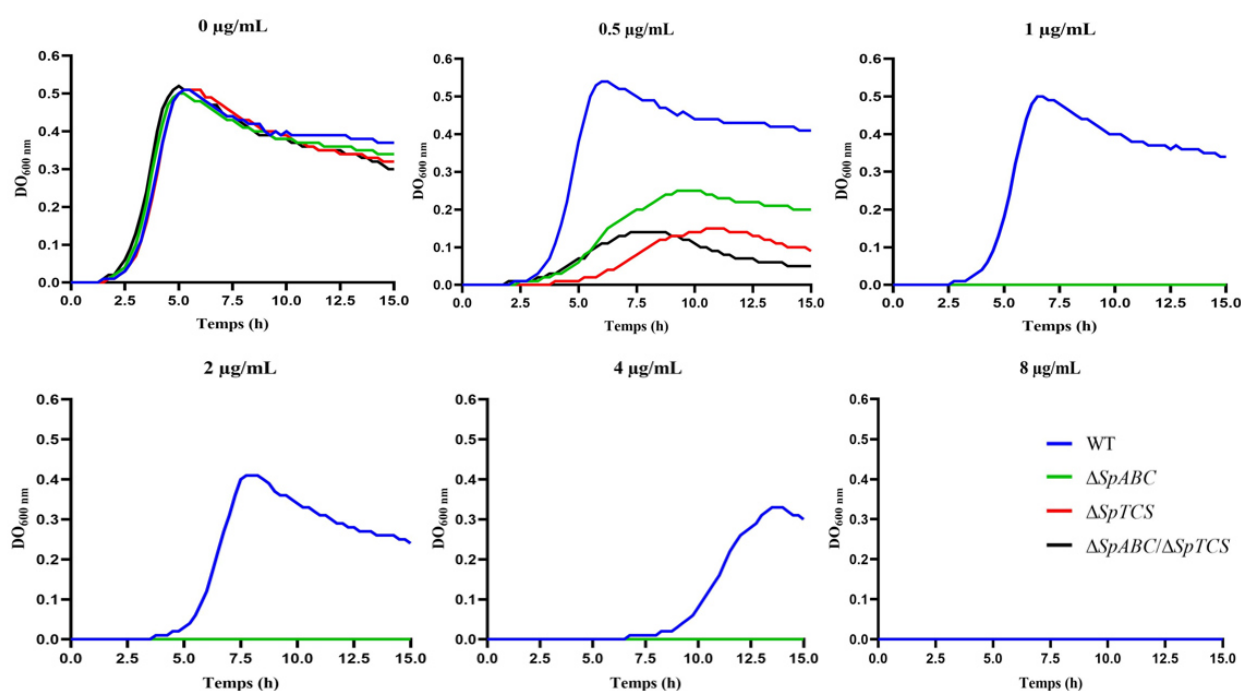
Les analyses bio-informatiques précédemment menées laissent supposer que le transporteur SpABC et le système à deux composants SpTCS de *S. pneumoniae* pourraient collaborer pour résister à des peptides antimicrobiens. Une grande partie de mon objectif de thèse a été de démontrer cette interaction fonctionnelle.

Nous avons utilisé des mutants de la souche R6 générées par le Dr Claire Durmort de l'IBS (Grenoble). Cette souche, dérivée de la souche pathogène D39 est avirulente et a son génome complètement séquencé permettant ainsi d'assurer la sécurité du manipulateur et une malléabilité génétique (Hoskins et al. 2001). Dans cette souche, le Dr Claire Durmort a délété les gènes codant le transporteur SpABC ( $\Delta spABC$ ) et le système à deux composants SpTCS ( $\Delta spTCS$ ). Elle a aussi effectué une double délétion ( $\Delta spABC/\Delta spTCS$ ).

La croissance des souches R6 *wt*,  $\Delta spABC$ ,  $\Delta spTCS$  et  $\Delta spABC/\Delta spTCS$  dans un milieu Todd-Hewitt a été suivie durant 15 h par un lecteur de microplaques. On remarque que les souches mutantes présentent la même courbe de croissance que la souche sauvage (**Figure 50**). Ce résultat montre que la délétion des gènes d'intérêt n'impacte pas la croissance normale du pneumocoque. Par la suite, dans le but de déterminer l'implication de SpABC et de SpTCS dans la résistance aux PAMs, la sensibilité de cette souche R6 à la bacitracine a été étudiée en utilisant la méthode de microdilution du milieu pour déterminer la concentration minimale inhibitrice. En présence de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine, on remarque un retard de croissance des mutants comparé à la souche sauvage. En présence de 1  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine, les souches mutantes ne présentent plus de croissance bactérienne alors que la souche WT continue à croître jusqu'à une concentration de 8  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine. Ces résultats montrent que la délétion de SpABC ou de SpTCS sensibilisent le pneumocoque à la bacitracine. En effet les souches mutantes sont 8 fois plus sensibles à la bacitracine que la souche sauvage (**Figure 50**).

La sensibilité de la souche R6 à d'autres PAMs a été étudiée (**Tableau 23**). L'inactivation des gènes codant SpABC et SpTCS sensibilise notablement la bactérie à une large gamme de PAMs provenant de diverses origines bactériennes tels que l'actagardine et le NAI-802 (espèces d'actinoplanes), la nisine (*L. lactis*), la planosporicine (espèces de *planomonospora*), la microbisporicine (espèces de *microbispora*) et le NAI-857 (espèces de *streptomyces*). En présence de

certaines de ces PAMs précédemment cités, les souches mutantes présentent des MIC réduites de 8 à 16 fois par rapport à la souche sauvage. L'implication du transporteur SpABC dans la résistance aux PAMs montrée par nos résultats est en accord avec les observations préliminaires faites par Becker (Becker et al. 2009) et Majchrzykiewicz (Majchrzykiewicz et al. 2010). En effet, Majchrzykiewicz et ses collègues ont montré que la délétion de SpABC dans la souche pathogène D39 augmentait la sensibilité de la bactérie à la bacitracine et la nisine alors que Becker et les autres auteurs ont démontré que l'inactivation de SpABC rendait la souche avirulente R6 sensible à la bacitracine. Nos résultats confirment donc les données déjà publiées et montrent par ailleurs l'implication de SpABC dans la résistance à une multitude d'autres PAMs.



**Figure 50 : Croissance des souches R6 WT,  $\Delta SpABC$ ,  $\Delta SpTCS$  et  $\Delta SpABC/\Delta SpTCS$  en absence et en présence de bacitracine**

Toutefois, le fait que la délétion de SpTCS présente exactement les mêmes effets que celle de SpABC est remarquable. En effet, la souche  $\Delta spTCS$  affiche le même niveau de sensibilité aux PAMs que la souche  $\Delta spABC$  (**Tableau 23**). Par ailleurs, il est important de noter que le double mutant ( $\Delta spABC/\Delta spTCS$ ) présente la même sensibilité que les souches ayant une simple délétion (**Tableau 23**). Il n'y a donc pas d'effet additif des mutations de délétion.

L'ensemble de ces résultats montrent que le couple SpABC/SpTCS confère une résistance notable à la bacitracine, la nisine, l'actargadine, la planosporicine, la microbisporicine, le NAI-857 et

le NAI-802, mais pas à d'autres PAMs tels que la ramoplanine, la vancomycine ou la gramicidine par exemple.

	PAMs	Souches R6				Niveau de résistance
		<i>wt</i>	$\Delta spABC$	$\Delta spTCS$	$\Delta spABC / \Delta spTCS$	
CMI en $\mu\text{g/mL}$	Actagardine	32	2	2	2	16 fois
	Bacitracine	8	1	1	1	8 fois
	Nisine	3,2	0,4	0,4	0,4	8 fois
	Planosporicine (NAI-97)	16	2	2	2	8 fois
	NAI-802	16	2	2	2	8 fois
	Microbisporicine (NAI-107)	0,016	0,008	0,008	0,008	4 fois
	NAI-857	4	2	2	2	2 fois
	Ramoplanine	0,016	0,016	0,016	0,016	1 fois
	Vancomycine	0,5	0,5	0,5	0,5	1 fois
	Gramicidine	0,016	0,016	0,016	0,016	1 fois
	Ionomyicine	2	2	2	2	1 fois
	Polymixine B	256	256	256	256	1 fois
	Colistine	256	256	256	256	1 fois
	Mastoporane	32	32	32	32	1 fois
	Duramycine	> 1250	> 1250	> 1250	> 1250	ND
	Abaecine	> 128	> 128	> 128	> 128	ND
	Cécropine	> 128	> 128	> 128	> 128	ND
	Magainine	> 128	> 128	> 128	> 128	ND
	LL-37	> 128	> 128	> 128	> 128	ND

**Tableau 23 : CMI de différents PAMs contre la souche R6**

N.D : Non Déterminé

Dans les souches D39 et R800 (celle-ci est une souche dérivée de la souche R6 ayant une mutation lui permettant de résister à la streptomycine, facilitant la sélection de constructions génétiques (Sung et al. 2001)), les mêmes effets sont observés lorsque *spABC* et *spTCS* sont délétés

(Tableaux 24 et 25). Une fois encore, l'intégrité des gènes codant SpABC et SpTCS est nécessaire au pneumocoque pour résister aux PAMs identifiés précédemment. L'ensemble de tous ces résultats suggère que SpABC et SpTCS collaborent étroitement pour permettre à la bactérie de résister à une large gamme de PAMs présentant des structures diverses (seuls la plansporicine, la microbisporicine et le NAI-857 ont des structures similaires) (Figure 51). Malgré la diversité structurale, il faut noter que tous ces PAMs ciblent des précurseurs de la synthèse de la paroi l'undécaprényl-pyrophosphate ou le lipide II (Breukink et de Kruijff 2006; Grein et al. 2019; Hsu et al. 2004; Lanne et al. 2019; Maffioli et al. 2015; Münch et al. 2014; Economou et al. 2013).

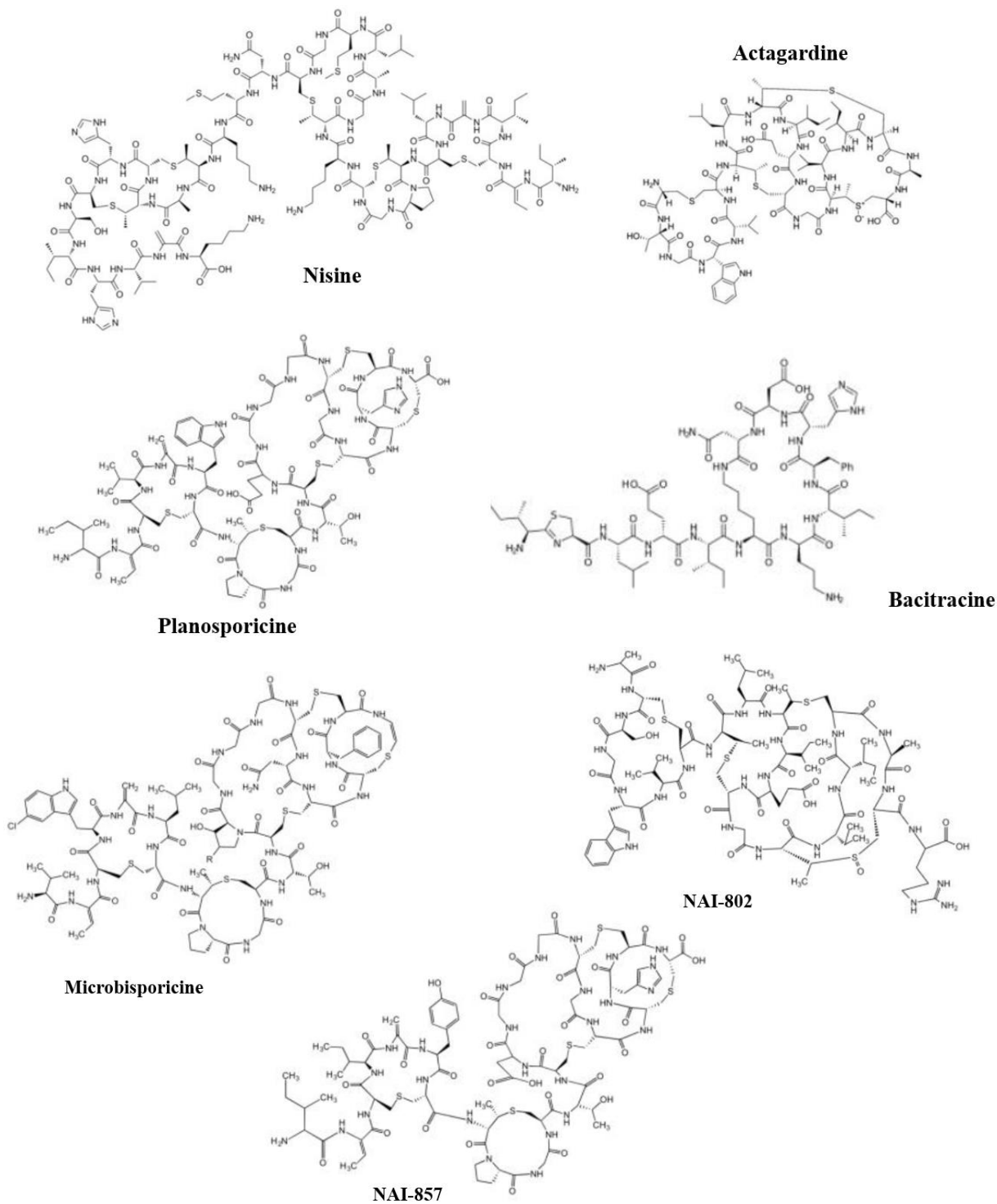
CMI en µg/mL	PAMs	Souches D39				Niveau de résistance
		<i>wt</i>	$\Delta spABC$	$\Delta spTCS$	$\Delta spABC / \Delta spTCS$	
	Actagardine	32	2	2	2	16 fois
	Nisine	3,2	0,2	0,2	0,2	16 fois
	Bacitracine	4	1	1	1	4 fois
	Vancomycine	0,25	0,25	0,25	0,25	1 fois
	Ramoplanine	0,03	0,03	0,03	0,03	1 fois

**Tableau 24 : CMI de différents PAMs contre la souche D39**

La détermination des CMI de ce tableau a été réalisée par le Dr Claire Durmort de l'IBS et M<sup>me</sup> Agathe Faure, doctorante en 1<sup>ère</sup> année dans le laboratoire.

CMI en µg/mL	PAMs	Souches R800				Niveau de résistance
		<i>wt</i>	<i>spABC-gfp</i>	<i>spABC-gfp / Δhk</i>	$\Delta spABC$	
	Actagardine	32	32	2	2	16 fois
	Nisine	1,6	0,2	0,2	0,2	8 fois
	Bacitracine	4	4	0,5	0,5	8 fois
	Vancomycine	0,25	0,25	0,25	0,25	1 fois

**Tableau 25 : CMI de différents PAMs contre la souche R800**



**Figure 51 : Structures de différents PAMs substrats du système de résistance SpABC/SpTCS**

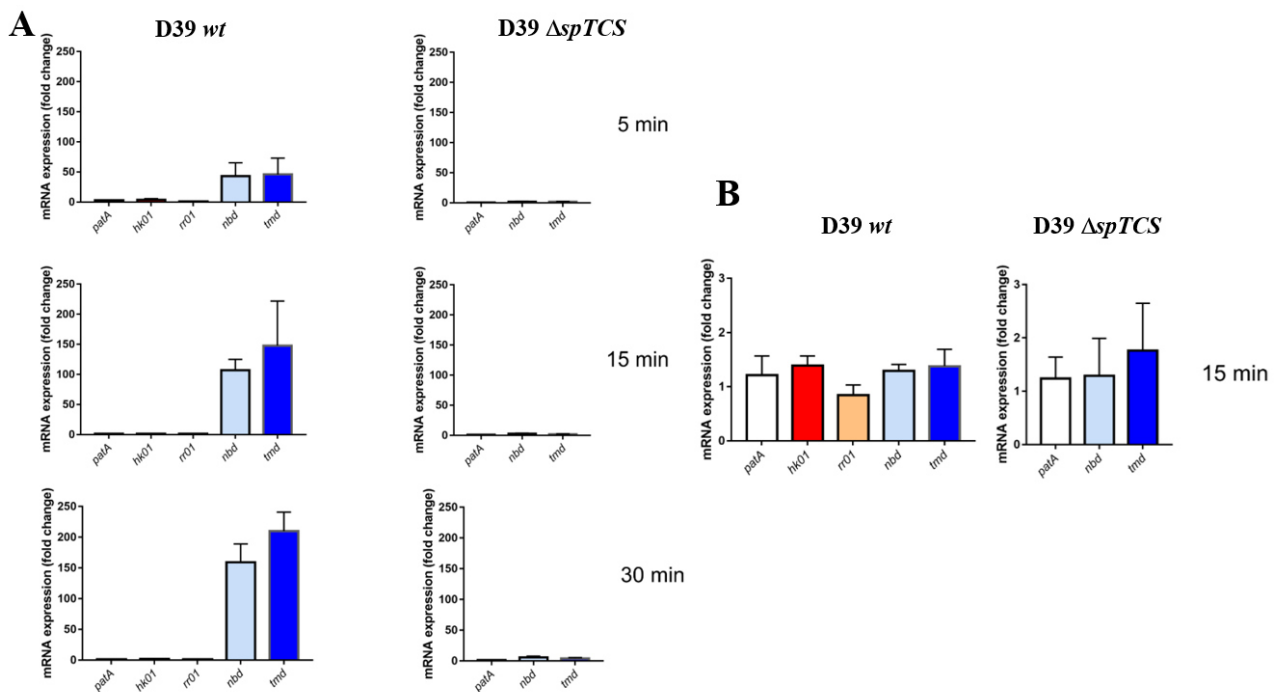
### 1.2.2. Rôle de SpTCS dans la stimulation de la transcription des gènes codant SpABC

Parce qu'ils collaborent pour résister aux PAMs, nous avons voulu savoir le rôle exact de SpABC et SpTCS dans ce système. Il a été décrit dans la littérature que dans beaucoup de systèmes

BceRS-AB, le transporteur ABC est non seulement responsable de la résistance aux PAMs mais aussi de la détection et du transfert du signal au TCS partenaire (Gebhard 2012). En effet, le transporteur ABC de la famille des BceAB détecte les PAMs via son domaine extracellulaire. Cela a été montré par Hiron et ses collègues en 2011 chez *S. aureus* (Hiron et al. 2011). Toutefois, chez cette bactérie, il existe un transporteur qui détecte le signal et le transmet au TCS partenaire qui déclenche l'induction d'un deuxième transporteur ABC dédiée à la détoxification de la bactérie.

Des expériences de qPCR ont été réalisées par le Dr Claire Durmort à l'IBS. Avec cette expérience, nous voulions évaluer l'expression des gènes *SpABC* et *SpTCS* en présence et en absence de PAMs. Le gène *pataA*, qui code pour l'une des sous-unités d'un transporteur de multiples drogues, est utilisé comme un contrôle négatif car il ne répond pas aux PAMs utilisés dans cette expérience (Orelle et al., 2018). Les souches D39 sauvage et  $\Delta spTCS$  ont été incubées pendant 5, 15 et 30 min en présence de 1  $\mu$ g/mL de bacitracine. Les ARNm de ces souches sont extraits et quantifiés par qPCR en se référant à l'expérience contrôle (absence de bacitracine). En présence de bacitracine, les gènes codant pour *SpABC* sont surexprimés dans la souche sauvage tandis que la quantité d'ARNm pour *SpTCS* reste inchangée (**Figure 52 A**). Lorsque *spTCS* est délété, la présence de bacitracine ne permet plus de surexprimer le gène *spABC*. On remarque aussi que plus le temps d'incubation augmente et plus les transcrits de *spABC* s'accumulent (**Figure 52 A**). Ces résultats montrent que l'activation de la transcription des gènes codant *SpABC* en présence de bacitracine est strictement dépendante de l'intégrité des gènes codant *SpTCS*. Les souches sauvage et  $\Delta spTCS$  ont été incubées 15 min en présence de 375 ng/mL de vancomycine, un autre PAM qui n'est pas substrat de ce système de résistance (**Tableau 24**). On observe qu'en présence de vancomycine, la transcription de *SpABC* n'est pas stimulée, qu'il y ait ou non les gènes codant *SpTCS* (**Figure 52 B**). L'ensemble de ces résultats montre que *SpTCS* est nécessaire à l'induction des gènes de *SpABC* en présence de bacitracine et que cette induction est une condition incontournable pour établir la résistance aux PAMs. En présence de bacitracine, l'expression des gènes codant *SpTCS* n'est pas stimulée, montrant que ce TCS ne régule pas sa propre expression.





**Figure 52 : Quantification de l'expression de *SpABC* dans *S. pneumoniae* en présence de bacitracine (A) ou de vancomycine (B)**

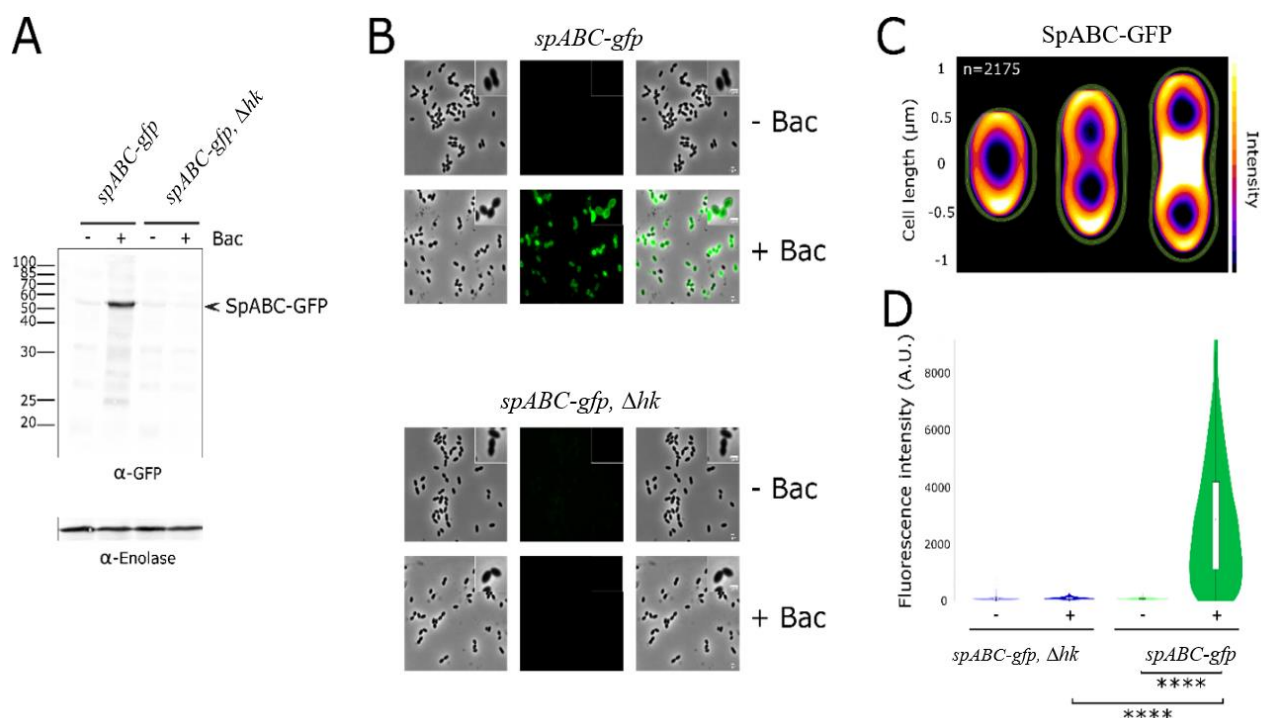
**A.** Quantification par qPCR des ARNm extraits des souches D39 après traitement avec 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bacitracine durant 5, 15 et 30 min.

**B.** Quantification par qPCR des ARNm extraits des souches D39 après traitement avec 375  $\text{ng}/\text{mL}$  de vancomycine durant 15 min.

Les expériences ont été réalisées en triplicat. Les gènes de *spABC* sont dans les tons bleus, ceux de *spTCS* sont en orange/rouge et celui de *patA* est en blanc. Ces expérimentations ont été réalisées par C. Durmort et L. Bellard (IBS, Grenoble).

Après avoir visualisé l'augmentation des transcrits de *spABC* en présence de bacitracine, nous avons voulu savoir si on observait le même effet au niveau protéique. Toutes les expériences décrites dans cette partie ont été réalisées par M<sup>me</sup> Anaïs Pelletier. Les souches R800 *spABC-gfp* et R800  $\Delta HK/spABC-GFP$  ont été utilisées pour cette expérience. La présence de la protéine GFP au niveau de l'extrémité C-terminale du NBD de SpABC n'impacte pas la fonctionnalité du transporteur. En effet, la souche R800 *SpABC-GFP* présente le même niveau de sensibilité aux PAMs que la souche R800 WT (**Tableaux 25 et 26**). L'expression de la protéine SpABC-GFP a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti-GFP dans les souches R800 *SpABC-GFP* et  $\Delta SpHK/SpABC-GFP$  en absence et en présence de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bacitracine. On observe sur la **Figure 53 A** la présence de la protéine SpABC-GFP uniquement dans la souche R800 *SpABC-GFP* mise en présence de bacitracine. Ce résultat montre que la protéine SpABC-GFP est surexprimée dans cette souche en présence de bacitracine. Pour consolider ce résultat, la réponse des pneumocoques au stress causé par

le traitement à la bacitracine a été quantifiée par microscopie de fluorescence. Dans la souche R800 SpABC-GFP, la présence de la bacitracine entraîne une stimulation de l'expression du transporteur dans la majorité des bactéries alors que dans la souche où l'histidine kinase de SpTCS avait été délétée, la présence de la bacitracine n'induit pas l'expression du transporteur (**Figure 53 B et D**). La **Figure 53 C** montre que la majorité de la fluorescence observée est localisée au niveau des membranes bactériennes. De ce fait, la fluorescence détectée n'est pas due à des NBDs qui se sont détachés mais provient du transporteur entier qui a été bien adressé à la membrane bactérienne.



**Figure 53 : Analyse de la surexpression de SpABC-GFP dans *S. pneumoniae* traité à la bacitracine**

- A. Visualisation par Western blot de l'expression de SpABC-GFP dans les souches R800 *spABC-gfp* et R800 *spABC-gfp, Δhk* traitées (+ BAC) ou non (- BAC) avec 1 µg/mL de bacitracine. Les lysats bactériens sont révélés soit avec un anticorps anti-GFP soit avec un anticorps anti-énolase qui sert de contrôle de quantité pour le dépôt sur gel. La flèche noire indique la position de la protéine GFP fusionnée du côté C-terminal du gène codant le NBD de SpABC.
- B. Images de microscopie de fluorescence des bactéries *S. pneumoniae* permettant d'analyser l'effet de la présence de bacitracine sur l'expression de SpABC-GFP dans les souches R800 *spABC-gfp* et R800 *spABC-gfp, Δhk* traitées (+ BAC) ou non (- BAC) avec 1 µg/mL de bacitracine. Contraste de phase (panneaux de gauche), signal fluorescent de la GFP (panneaux du milieu) et la superposition de la phase de contraste et les images de la fluorescence de la GFP (panneaux de droite). Un agrandissement d'images est montré en haut à droite de chaque panneau. La barre d'échelle est de 1 µm.
- C. Localisation de SpABC-GFP dans *S. pneumoniae* durant le cycle cellulaire. Le nombre n représente le nombre de cellules analysées dans une seule expérience représentative. Ces expériences ont été menées en triplicat.

**D.** Distribution de l'intensité de la fluorescence cellulaire dans chaque bactérie de l'expérience B. La p-value (\*\*\*\*,  $p < 0,001$ ) est dérivée des tests Mann-Whitney. Un total de 10442 cellules a été analysé.

Finalement, ces résultats montrent que la stimulation de l'expression de SpABC-GFP en présence de bacitracine est effectivement dépendante de l'intégrité du gène *SpHK*. Cette conclusion confirme encore l'existence d'une collaboration fonctionnelle entre SpABC et SpTCS.

### 1.2.3. Expression des protéines dépendantes de SpTCS

Nous avons voulu savoir si le système à deux composants qui nous intéresse régule l'expression d'autres protéines impliquées dans la résistance aux PAMs. C'est le cas de *S. aureus* où la résistance aux PAMs est médiée par deux transporteurs ABC : le premier détecte le signal et induit la cascade de réactions qui permet d'exprimer le second transporteur qui détoxifie la bactérie (Hiron et al. 2011). Pour déterminer les protéines dont l'expression est dépendante de SpTCS, nous avons utilisé une approche de protéomique quantitative basée sur le marquage TMT (Tandem Mass Tag). Il s'agit d'une méthode de quantification relative permettant de comparer les quantités protéiques contenues dans différents échantillons. A la suite de la digestion enzymatique des protéines contenues dans chaque échantillon les peptides obtenus sont marqués par un réactif TMT. Lors de la fragmentation MS/MS, le réactif TMT génère un ion fragment de masse connue. La quantité de chaque ion fragment reflète celle de la protéine marquée. Cela permet la quantification relative des protéines dans les différents échantillons à tester. Les protéines sont identifiées en comparant les masses et spectres MS/MS des peptides qui en sont issus avec ceux des protéines déjà recensées dans les bases de données disponibles.

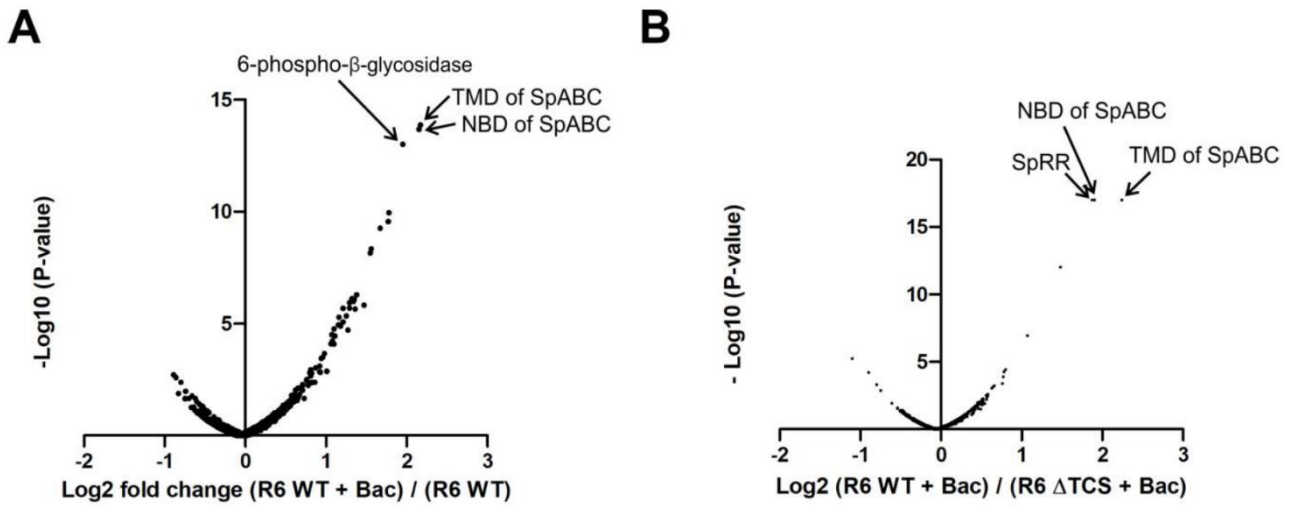
Pour cette expérience, nous avons comparé le protéome de la souche R6 *wt* et celui de la souche R6  $\Delta$ *spTCS* en absence et en présence de 1  $\mu$ g/mL de bacitracine. Nous avons testé deux stratégies pour obtenir la meilleure couverture possible. Dans la 1<sup>ère</sup> expérience, les protéines marquées sont fractionnées avant d'être analysées par LC-MS/MS. Dans la 2<sup>ème</sup> expérience, les protéines marquées n'ont pas été fractionnées mais elles ont été séparées dans une plus longue colonne C18 pour l'analyse LC-MS/MS. Grâce à ces deux stratégies, nous avons respectivement détecté 1146 et 1024 protéines couvrant ainsi 50 à 55% du protéome de *S. pneumoniae* (Hoskins et al. 2001).

Après un traitement à la bacitracine, la souche R6 WT présente une accumulation moyenne de SpABC de  $7 \pm 3$  fois alors que le même traitement n'a pas d'incidence sur la quantité de SpABC dans la souche R6  $\Delta$ SpTCS (en moyenne  $0.99 \pm 0.09$  fois) (**Figure 54 panels A**). Seule la 1<sup>ère</sup> expérience nous a permis de détecter la présence du RR alors que l'HK n'a pu être détecté dans aucun

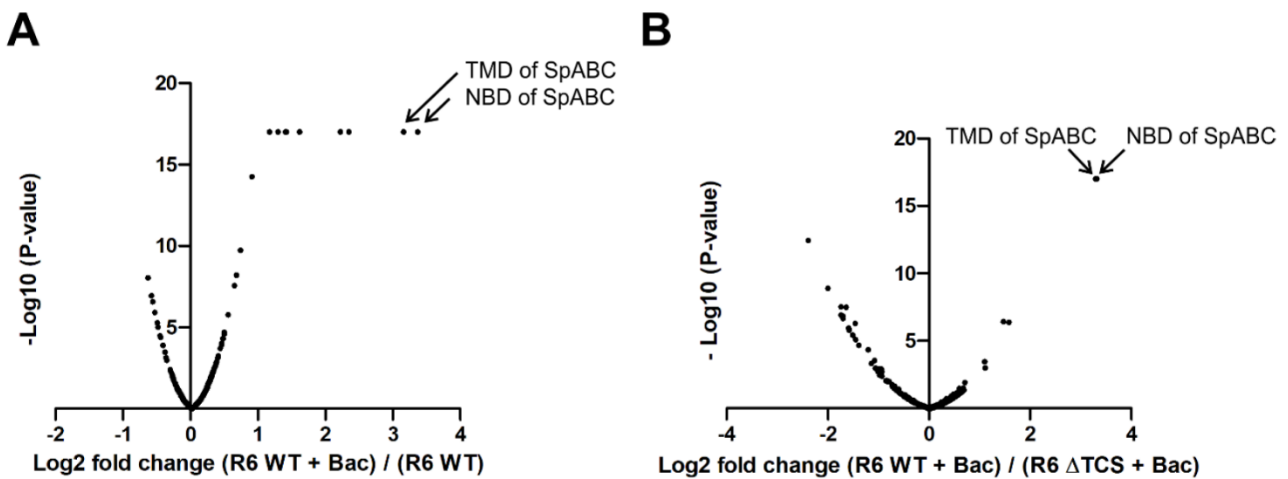
échantillon. Dans la 1<sup>ère</sup> expérience, la comparaison de la souche R6 WT avec et sans bacitracine a montré que l'expression du RR n'est pas affectée par la présence du PAM (Fold change = 1,122). En effet, une protéine est considérée comme étant surexprimée lorsque son fold change est supérieur ou égal à 2.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment en qPCR et en fluorescence. Le NBD et TMD de SpABC sont les protéines les plus significativement surexprimées dans la souche R6 WT traitée à la bacitracine alors qu'elles ne le sont pas dans la souche mutée (**Figure 54 panels B**). D'autres protéines ont aussi été surexprimées ou sous-exprimées dans les différentes conditions utilisées. Les tableaux des résultats sont consignés dans l'annexe 4.

## Expérience 1



## Expérience 2



**Figure 54 : Volcano plots montrant les analyses protéomiques des souches R6 *wt* et  $\Delta$ TCS en absence et en présence de bacitracine**

### Expérience 1

- A. Comparaison entre les protéomes de la souche R6 *wt* en présence et en absence de 1  $\mu$ g/mL de bacitracine
- B. Comparaison entre les protéomes de la souche R6 *wt* et de la souche R6  $\Delta$ *spTCS* en présence de 1  $\mu$ g/mL de bacitracine

### Expérience 2

- A. Comparaison entre les protéomes de la souche R6 *wt* en présence et en absence de 1  $\mu$ g/mL de bacitracine
- B. Comparaison entre les protéomes de la souche R6 *wt* et de la souche R6  $\Delta$ *spTCS* en présence de 1  $\mu$ g/mL de bacitracine

**Note<sup>1</sup>** : les protéines sont significativement surexprimées lorsque le  $\log_2$  (Fold change)  $> 1$  et que le  $-\log_{10}$  (p-value)  $> 1,3$ . Les protéines sont significativement sous-exprimées lorsque le  $\log_2$  (Fold change)  $< -1$  et que le  $-\log_{10}$  (p-value)  $> 1,3$ .

**Note<sup>2</sup>** : vous trouverez la liste des protéines significativement surexprimées et sous-exprimées dans les conditions utilisées lors des deux expériences en Annexe 4.

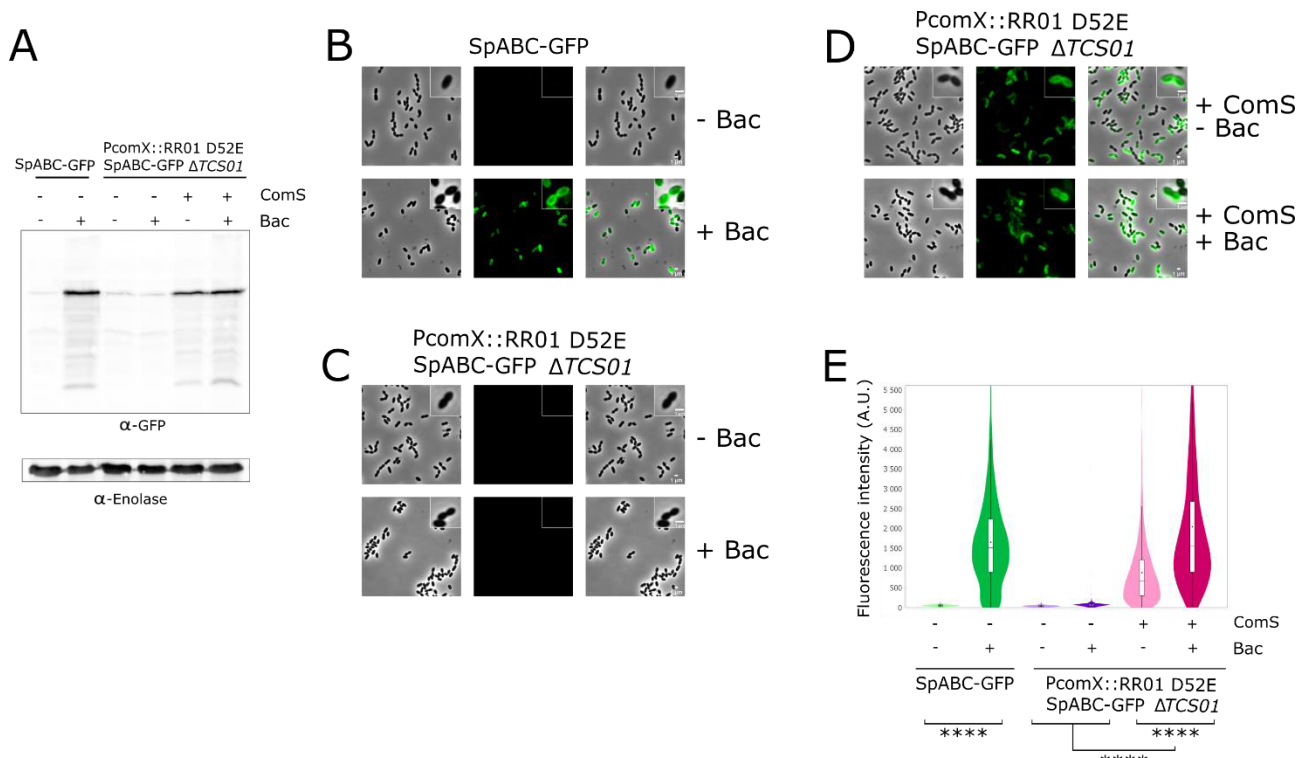
L'analyse de ces volcano plots a montré que SpTCS était essentiel pour la transmission du signal de détection des PAMs et l'induction de l'expression de SpABC. De plus, les analyses protéomiques ont d'abord montré que SpTCS ne régulait pas un autre transporteur ABC impliqué dans la résistance à la bacitracine et suggère que la seule surexpression de SpABC était suffisante pour permettre au pneumocoque de résister aux PAMs. Cette conclusion est en accord avec les observations faites par Reiners et ses collègues pour un homologue de SpABC. En effet, dans cette étude, la seule surexpression du transporteur de type BceAB de *S. agalactiae*, nommé NsrFP, chez la bactérie *L. lactis* confère à cette dernière une résistance à la nisine de 16 fois (Reiners et al. 2017).

#### 1.2.4. Complémentation du couple SpABC/SpTCS

Pour confirmer que les effets précédemment montrés sont bien dus à la délétion des gènes codant SpABC et SpTCS, nous avons voulu compléter ces gènes. Pour cela, M<sup>me</sup> Anaïs Pelletier, une de nos collaboratrices, a généré des mutants de la souche R800 listés dans le **Tableau 8**. Comme nous allons le voir ci-dessous, l'interprétation de ces résultats est parfois difficile.

Différentes souches R800 comportant un RR phosphomimétique (mutation de l'aspartate conservé D52 en glutamate E) ont été créées soit sur le chromosome ( $rr^*$ ) ou mis sous le contrôle d'un promoteur nommé PcomX situé sur une autre partie du chromosome (PcomX  $rr^*$ ) et inductible par un peptide appelé ComS. Le but était d'activer en permanence le système de résistance aux PAMs. Cependant, la présence ou l'absence du peptide ComS n'ont aucune incidence sur la résistance des souches avec les protéines d'intérêt mises sous le contrôle du promoteur PcomX alors qu'elles impactent l'expression du transporteur SpABC sous le contrôle de PcomX. En présence de bacitracine, les souches contenant le  $RR^*$  meurent à la même concentration que la souche  $\Delta spABC$ , montrant que ces constructions ne restaurent pas la résistance de la souche sauvage (**Tableau 26**). Ce résultat suggère que le  $RR^*$  n'est pas phosphomimétique ou que ce mutant est mal exprimé. Toutefois, il y a une exception. On observe que la souche *spABC-gfp* /  $\Delta spTCS$  / PcomX  $rr^*$  présentait la même sensibilité que les souches *wt* et *spABC-gfp* (**Tableau 26**). L'expression de la protéine SpABC-GFP a d'abord été évaluée par Western blot. On observe qu'en présence du peptide ComS, la souche R800 *spABC-gfp* /  $\Delta spTCS$  / PcomX  $rr^*$  exprime SpABC-GFP indépendamment de la présence de bacitracine dans le milieu (**Figure 55 A**). Par microscopie de fluorescence, la présence de la bacitracine induit l'expression de SpABC-GFP dans la souche *spABC-GFP* (**Figure 55 B**) mais n'a

pas d'impact sur l'expression de SpABC-GFP dans la souche *spABC-gfp / ΔspTCS / PcomX rr\** (**Figure 55 C**). On observe l'expression de SpABC-GFP dans la souche *spABC-gfp / ΔspTCS / PcomX rr\** lorsqu'elle est incubée avec le peptide inducteur ComS (**Figure 55 D**). Ces observations montrent que lorsque SpTCS est délété et que le RR\* phosphomimétique est mis sous le contrôle du promoteur PcomX, le transporteur SpABC-GFP est uniquement exprimé lorsque la souche est incubée avec le peptide inducteur ComS (**Figure 55 E**). C'est un résultat surprenant à double titre. D'abord, aucune autre souche contenant le RR\* n'avait restaurée la sensibilité à la bacitracine et l'on peut se demander si la présence de la GFP pourrait stabiliser le transporteur. Deuxièmement, nous avons observé que la résistance de la souche *spABC-gfp / ΔspTCS / PcomX rr\** était indépendante de la présence de l'inducteur ComS (résultat non montré).



**Figure 55 : Analyse de l'expression de SpABC-GFP dans les souches R800 *spABC-gfp*, et *spABC-gfp*,  $\Delta tcs01$ , PcomX *rr\**.**

- A. Visualisation par Western blot de l'expression de SpABC-GFP dans les souches R800 *spABC-gfp* et R800 *spABC-gfp*,  $\Delta tcs01$ , PcomX *rr\** traitées (+ BAC) ou non (- BAC) avec 1  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine et (+ ComS) ou non (- ComS) avec 0,5  $\mu\text{M}$  de peptide inducteur ComS. Les lysats bactériens sont révélés soit avec un anticorps anti-GFP soit avec un anticorps anti-énolase qui va servir de contrôle de quantité pour le dépôt sur gel.
- B. Images de microscopie de fluorescence des bactéries *S. pneumoniae* permettant d'analyser l'effet de la présence de bacitracine sur l'expression de SpABC-GFP dans la souche R800 *spABC-gfp* traitée (+ BAC) ou non (- BAC) avec 1  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine. Contraste de phase (panneaux de gauche), signal fluorescent de la GFP (panneaux du milieu) et la superposition de la phase de contraste et les images de la fluorescence de la GFP (panneaux de droite).
- C. Images de microscopie de fluorescence des bactéries *S. pneumoniae* permettant d'analyser l'effet de la présence de bacitracine sur l'expression de SpABC-GFP dans la souche R800 *spABC-gfp*,  $\Delta tcs01$ , PcomX *rr\** traitée (+ BAC) ou non (- BAC) avec 1  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine. Contraste de phase (panneaux de gauche), signal fluorescent de la GFP (panneaux du milieu) et la superposition de la phase de contraste et les images de la fluorescence de la GFP (panneaux de droite).
- D. Images de microscopie de fluorescence des bactéries *S. pneumoniae* permettant d'analyser l'effet de la présence de bacitracine et de ComS sur l'expression de SpABC-GFP dans la souche R800 *spABC-gfp*,  $\Delta tcs01$ , PcomX *rr\** traitée (+ BAC) ou non (- BAC) avec 1  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine et traitée (+ ComS) ou non (- ComS) avec 0,5  $\mu\text{M}$  de ComS. Contraste de phase (panneaux de gauche), signal fluorescent de la GFP (panneaux du milieu) et la superposition de la phase de contraste et les images de la fluorescence de la GFP (panneaux de droite).
- E. Distribution de l'intensité de la fluorescence cellulaire dans chaque bactérie des expériences B, C et D.

Dans différentes souches, le gène codant la protéine SpABC-GFP a aussi été intégré soit dans le chromosome soit mis sous le contrôle du promoteur PcomX. Lorsque l'un des gènes d'intérêt (*spABC* ou *spTCS*) est délété, la souche comportant aussi *spABC-gfp* sous le contrôle de PcomX ne restaure pas la résistance de la souche *wt* en absence ou en présence du peptide inducteur ComS. De plus, lorsque la construction PcomX *spABC-GFP* est mis en complément du système *spABC/spTCS* situé dans le chromosome, le pneumocoque ne présente pas une résistance accrue à la bacitracine (**Tableau 26**). Pour expliquer ces résultats, nous avons émis plusieurs hypothèses :

- La protéine n'est pas exprimée sous le contrôle de PcomX. Toutefois cette hypothèse est infirmée par une expérience d'Anaïs Pelletier montrant la fluorescence de la GFP dans cette souche. En effet, la GFP a été fusionnée à l'extrémité 3' du gène codant le NBD dans le chromosome.
- La protéine exprimée n'est pas fonctionnelle.
- La protéine n'est pas produite en quantité suffisante pour permettre à la bactérie de résister. Pour apporter une réponse à cette interrogation, il serait possible de comparer la fluorescence de la GFP dans les souches R800 ayant le gène *spABC-gfp* sous le contrôle



du promoteur PcomX et la fluorescence détectée de SpABC-GFP au locus dans la souche R800 en présence de concentrations sous-inhibitrices de bacitracine.

Souches R800	[Bacitracine] en $\mu\text{g/mL}$	Niveau de résistance	Fluorescence de la GFP détectée	Impact du peptide ComS sur la résistance
<i>wt</i>	4	Résistance de base	NA	-
<i>spABC-gfp</i>	4	Même niveau de résistance que le WT	Oui	-
$\Delta hk / spABC-gfp$	0,5	8 fois moins résistant que le WT	Non	-
$\Delta spABC$	0,5	8 fois moins résistant que le WT	NA	-
$\Delta hk$	0,5	8 fois moins résistant que le WT	NA	-
$\Delta hk / PcomX hk$	512	128 fois plus résistante que le WT	NA	Aucun impact sur la résistance
<i>rr*</i> (D52E)	0,5	8 fois moins résistant que le WT	NA	-
PcomX <i>rr*</i>	0,5	8 fois moins résistant que le WT	NA	Aucun impact sur la résistance
$\Delta spTCS / PcomX rr^*$	0,5	8 fois moins résistant que le WT	NA	Aucun impact sur la résistance
<i>spABC-gfp / \Delta spTCS / PcomX rr^*</i>	4	Même niveau de résistance que le WT	Oui	Aucun impact sur la résistance
$\Delta spABC / PcomX spABC-gfp$	0,5	8 fois moins résistant que le WT		Aucun impact sur la résistance
$\Delta spTCS / PcomX spABC-gfp$	0,5	8 fois moins résistant que le WT	Oui	Aucun impact sur la résistance
PcomX <i>spABC-gfp</i>	4	Même niveau de résistance que le WT		Aucun impact sur la résistance

**Tableau 26 : Résistance de différentes souches R800 mutantes à la bacitracine**

- NA : Non Applicable
- Toutes les expériences de détection de la fluorescence de la GFP ont été réalisées par M<sup>me</sup> Anaïs Pelletier.

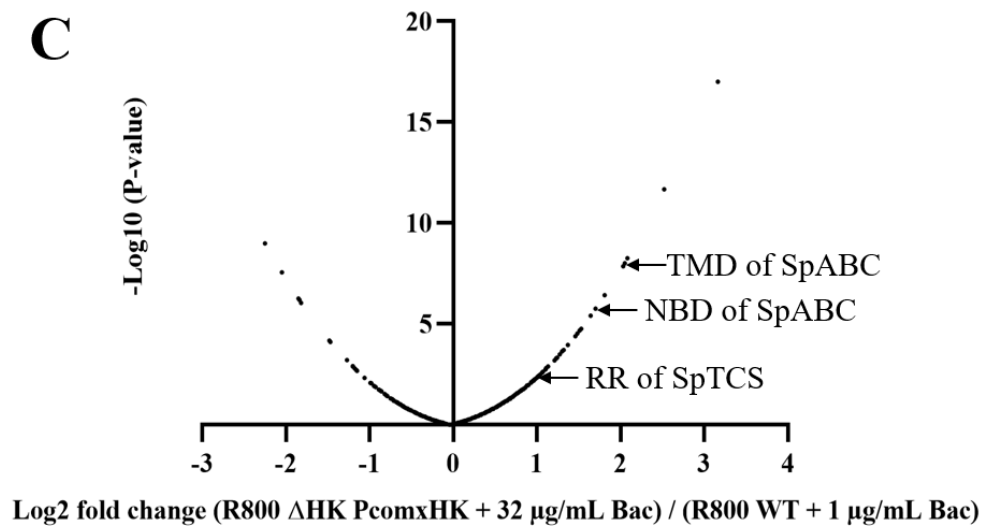
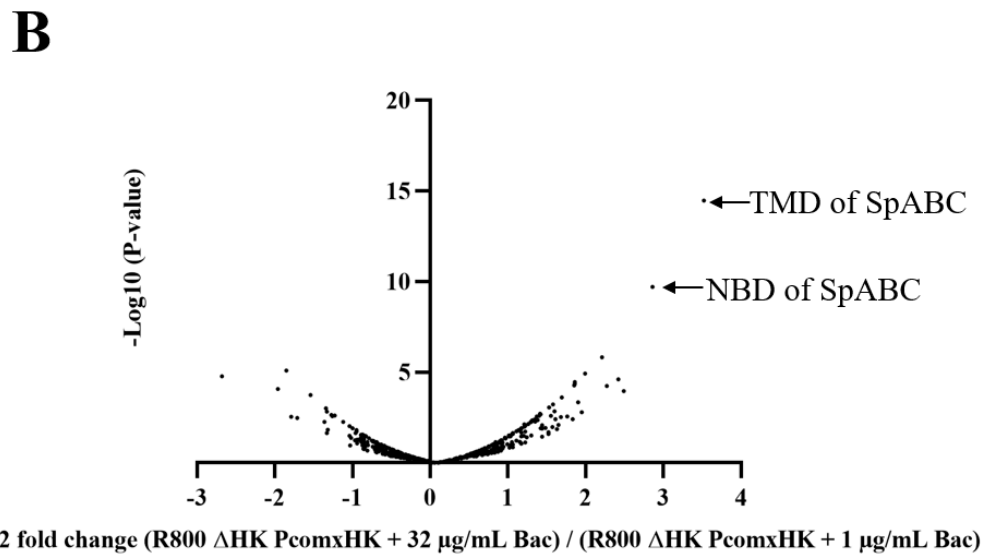
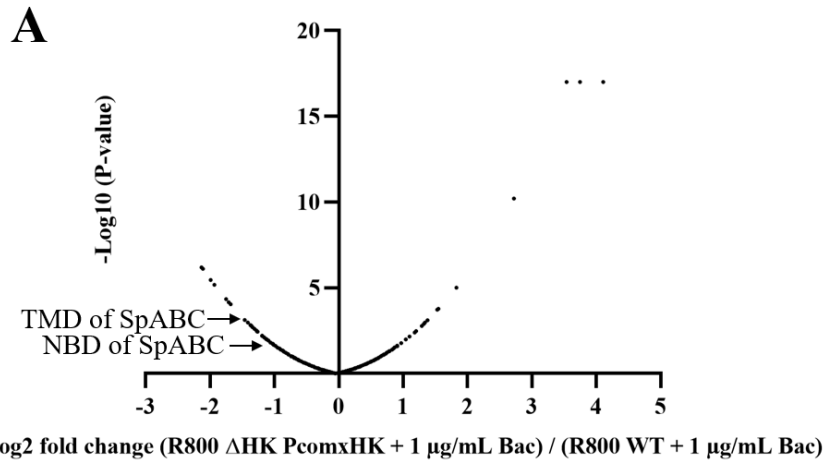
Enfin, la souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* a présenté des résultats surprenants mais très intéressants, car cette souche mutante est 128 fois plus résistante à la bacitracine que la souche R800 *wt* (Tableau 26). Nous avons aussi réalisé des tests de résistance en présence d'autres types de PAMs

(nisine, actagardine et microbisporicine) pour voir si ce phénomène était appliqué aux autres substrats (**Tableau 27**).

CMI en $\mu\text{g/mL}$	PAMs	Souches R800			Niveau de résistance de R800 $\Delta hk$ PcomX $hk$ par rapport à R800 $wt$
		$wt$	$\Delta hk$	$\Delta hk$ PcomX $hk$	
	Bacitracine	4	0,5	512	128 fois
	Nisine	3,2	0,4	>3,2	ND
	Actagardine	32	2	128	4 fois
	Microbisporicine	0,064	0,016	0,5	8 fois

**Tableau 27 : CMI de divers PAMs substrats contre la souche R800  $\Delta hk$  PcomX  $hk$**

La souche R800  $\Delta hk$  PcomX  $hk$  présente une résistance accrue aux PAMs substrats allant de 4 à 128 fois par rapport à la souche sauvage (**Tableau 27**). Nous avons émis l'hypothèse que la quantité de HK exprimé sous le contrôle du promoteur PcomX était supérieure à la quantité physiologique permettant ainsi d'augmenter l'expression de SpABC et le niveau de résistance. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons déterminé le protéome des souches R800  $wt$  et R800  $\Delta hk$  PcomX  $hk$  en présence de 1 et 32  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine. A noter que la souche sauvage ne survit pas à 32  $\mu\text{g/mL}$ , donc cette concentration n'a été utilisée que pour la souche super-résistante (R800  $\Delta hk$  PcomX  $hk$ ). Les échantillons ont été préparés dans les mêmes conditions que pour les souches R6  $wt$  et  $\Delta spTCS$ . Les échantillons ont été marqués au TMT puis fractionnés avant d'être analysés en spectrométrie de masse. L'HK et le RR ont été détectés dans tous les échantillons même si les p-values de l'HK ne sont pas significatives. En effet, pour qu'une p-value soit significative, il faut qu'elle soit inférieure à 0,05.



**Figure 56 : Volcano plots montrant les analyses protéomiques des souches R800 *wt* et  $\Delta hk$  PcomX *hk* en absence et en présence de différentes concentrations de bacitracine**

- A. Comparaison entre le protéome de la souche R800 super résistante et la souche R800 *wt* en présence de 1 µg/mL de bacitracine
- B. Comparaison entre les protéomes de la souche R800 super résistante en présence de 32 µg/mL et 1 µg/mL de bacitracine
- C. Comparaison entre le protéome de la souche R800 super résistante en présence de 32 µg/mL de bacitracine et le protéome de la souche R800 *wt* en présence de 1 µg/mL de bacitracine

**Note<sup>1</sup>** : les protéines sont significativement surexprimées lorsque le log<sub>2</sub> (Fold change) > 1 et que le -log<sub>10</sub> (p-value) > 1,3. Les protéines sont significativement sous-exprimées lorsque le log<sub>2</sub> (Fold change) < -1 et que le -log<sub>10</sub> (p-value) > 1,3.

**Note<sup>2</sup>** : vous trouverez la liste des protéines significativement surexprimées et sous-exprimées dans les conditions utilisées lors des deux expériences en Annexe 5.

Lorsque R800 *wt* et R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* sont soumises à 1 µg/mL de bacitracine, les expressions de l'HK et du RR sont similaires dans les deux souches mais le transporteur SpABC est plus exprimé dans la souche sauvage (**Figure 56 A**). Lorsque la concentration de bacitracine est augmentée à 32 µg/mL, la souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* présente une surexpression de SpABC d'environ 4 fois et du RR d'environ 2 fois par rapport à la souche R800 *wt* traitée avec 1 µg/mL de bacitracine (**Figures 56 B** et **56 C**). Lorsque l'on compare les protéomes de la souche super-résistante traitée avec 32 µg/mL et 1 µg/mL, le NBD et le TMD de SpABC sont les deux protéines les plus exprimées montrant que l'augmentation de la quantité de bacitracine induit une plus grande synthèse du transporteur SpABC (**Figure 56 B**). D'autres protéines ont aussi été surexprimées ou sous-exprimées dans les différentes conditions testées. Les tableaux des résultats ont été consignés dans l'annexe 5.

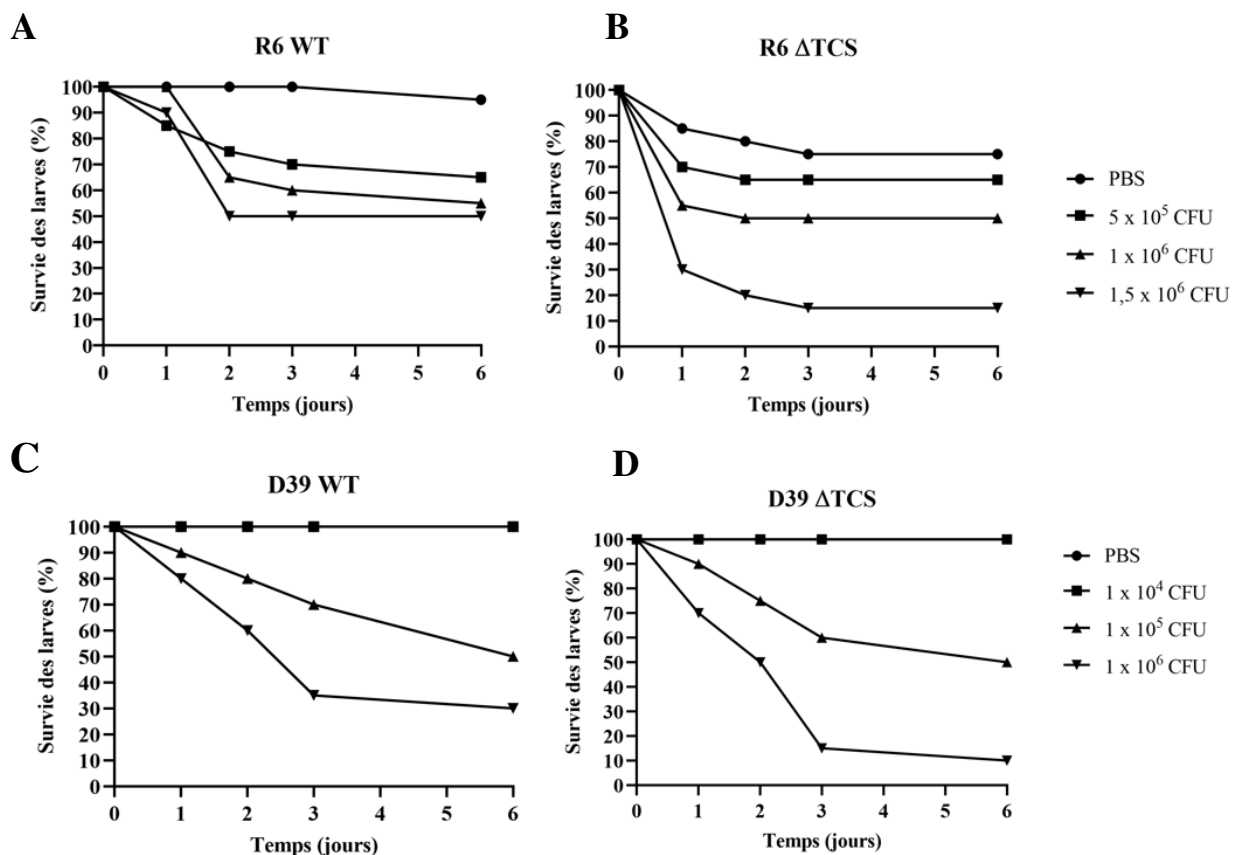
## 2. Implication du couple SpABC/SpTCS dans la virulence du pneumocoque

### 2.1. Etude de la virulence chez *G. mellonella*

*S. pneumoniae* est une bactérie commensale humaine qui peut devenir pathogène sous certaines circonstances. Plusieurs études ont montré que SpTCS était impliqué dans la virulence du pneumocoque dans des modèles murins et de lapin (Throup et al. 2000; Trihn et al. 2013).

Pour étudier le rôle de SpTCS dans la virulence du pneumocoque, nous avons infecté des larves de *G. mellonella* avec des quantités connues de R6 et de D39 (*wt* et  $\Delta spTCS$ ). L'infection de ces larves est parfaitement visible à l'œil car elles présentent une coloration noire due à la mélanisation qui est un système défensif. Toutes les 24h, le nombre de larves mortes est relevé.

Les larves injectées avec du PBS sont utilisées comme contrôle. Le taux de mortalité des larves avec PBS observé lors de l'expérience avec les souches R6 est dû à une mauvaise injection qui a dû percer les larves et conduire à la mort (**Figure 57 A et B**). Avec une bonne injection du PBS, aucune mort n'est détectée durant l'expérience avec les souches D39 (**Figure 57 C et D**). Plusieurs inocula de bactéries ont été testés pour déterminer lesquels étaient plus adaptés. On observe que l'augmentation de la quantité de bactéries injectées est corrélée avec celle des larves mortes. Les bactéries tuent les larves suivant une dose-réponse (**Figure 57**). Nous avons pu déterminer la quantité de bactéries à injecter aux larves pour bien observer les effets induits. Il s'agit de l'inoculum  $1 \times 10^6$  CFU qui sera utilisé pour les infections futures.

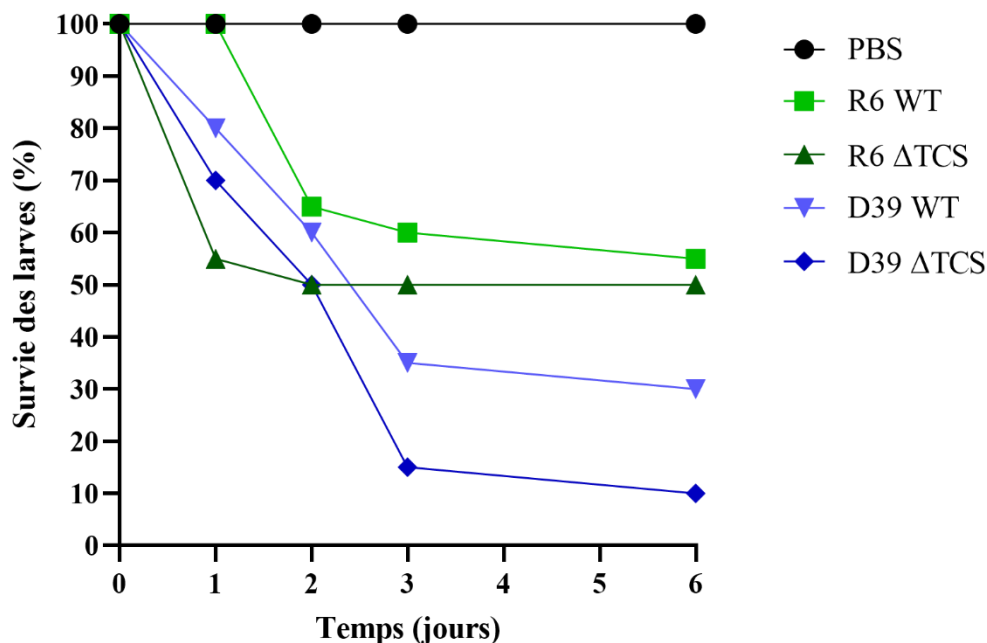


**Figure 57 : Survie des larves de *G. mellonella* en fonction des inocula**

- 20 larves de *G. mellonella* sont utilisées dans chaque condition.

Lorsque l'on infecte les larves avec les souches R6 du pneumocoque, on observe la mort des larves dès les premières 24 h chez la souche  $\Delta spTCS$  (45% des larves sont mortes) alors que la souche *wt* ne cause sensiblement la mort qu'au bout de 48 h (35% des larves sont mortes) (**Figure 58**). On observe au cours des jours que la mort des larves connaît un pic durant les premières 48 h mais qu'elle s'est stabilisée après (**Figure 58**). Nous en avons conclu que les larves meurent plus à cause du choc

antigénique causé par l'injection des bactéries qu'à cause de la prolifération bactérienne dans l'organisme de *G. mellonella*. En effet, il semblerait qu'au bout de 48 h, les larves aient réussi à endiguer l'infection bactérienne car, au bout du 6<sup>ème</sup> jour, la moitié des larves de départ étaient encore vivantes (**Figure 58**).



**Figure 58 : Taux de survie des *G. mellonella* après infection au cours du temps**

- Inocula de  $10^6$  CFU ont été utilisés pour chaque condition. Pour la condition PBS, le volume des inocula de bactéries de bactéries est remplacé par le même volume de PBS.
- 20 larves de *G. mellonella* ont été utilisées pour chaque condition

Par la suite, nous avons décidé de privilégier la souche pathogène D39 pour voir son effet chez le modèle *G. mellonella*. La présence de la capsule polysaccharidique de la souche D39 est un élément important de la virulence de la bactérie. Dès les premières 24 h, on relève des morts chez les larves infectées avec un nombre sensiblement supérieur dans le lot des larves infectées par la souche D39  $\Delta spTCS$  (**Figure 58**). Au fil des jours, les larves continuent à succomber à l'infection jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour où il reste 30% des larves infectées par D39 *wt* et 10% des larves infectées par D39  $\Delta spTCS$ . La souche mutante semble plus tuer les larves que la souche sauvage. D'autre part, ces résultats montrent que les larves ont du mal à résister à l'infection par les souches D39 et que les bactéries ont pu se répliquer (**Figure 58**). Les résultats des expériences avec les souches R6 et D39 suggèrent ainsi que la souche pathogène se multiplie dans les larves alors que ce n'est pas le cas pour la souche avirulente (**Figure 58**). Des constatations similaires ont été observées avec d'autres bactéries. Lorsque

les larves de *G. mellonella* sont infectées par des souches sauvage et avirulente de *Shigella*, les auteurs ont démontré que la souche virulente pouvaient se multiplier dans la larve alors que la souche non pathogène est rapidement neutralisée par le système de défense du modèle (Barnoy et al. 2017).

Pour la souche R6, la délétion de la capsule polysaccharidique qui inhibe la phagocytose pourrait expliquer l'absence de réplication dans les larves (Wood et Smith 1949). Ces dernières auront plus de facilité à phagocyter la souche R6 que la souche D39 empêchant ainsi la souche avirulente de se multiplier. Evans et ses collègues ont montré que la souche Rx1 de *S. pneumoniae* ne se répliquaient pas dans les larves alors que la souche Portugal<sup>19F</sup>-21, qui est une souche très virulente du pneumocoque pouvaient se multiplier et ainsi échapper à la défense de l'hôte. Cette souche Rx1 dérive de la souche D39 comme la souche R6 (Evans et Rozen 2012). Cependant, la souche Rx1 ne présente que l'absence de capsule alors que la souche R6 est délétée de sa capsule et d'un autre facteur de virulence DltA ce qui rend la souche R6 encore moins pathogène que la souche Rx1 (Evans et Rozen 2012). Toutefois, pour être parfaitement sûr que les souches que nous avons utilisées se répliquent à l'intérieur de la larve, il faudrait récupérer l'hémolymphe des larves à des temps donnés après l'infection et les étaler sur une boîte de pétri contenant du sang de cheval pour dénombrer le nombre de bactéries.

Les larves infectées par les souches délétées du système à deux composants affichent une plus grande mortalité (**Figure 57 et 58**). De ce fait, l'absence de SpTCS favoriserait la virulence du pneumocoque chez ces larves. Ces résultats ne s'alignent pas à ceux des études précédemment publiées où la délétion de *SpTCS* entraînait une atténuation de la virulence du pneumocoque chez des modèles murin et lapin (Hava et Camilli 2002; Throup et al. 2000; Trihn et al. 2013). Cependant, les larves de *G. mellonella* sont très différentes de ces modèles murins. En effet, il a été montré pour la bactérie *Streptococcus suis* que la délétion du système à deux composants CiaRH qui contribue à la virulence induisait une augmentation de la survie des larves de *G. mellonella* (Velikova et al. 2016).

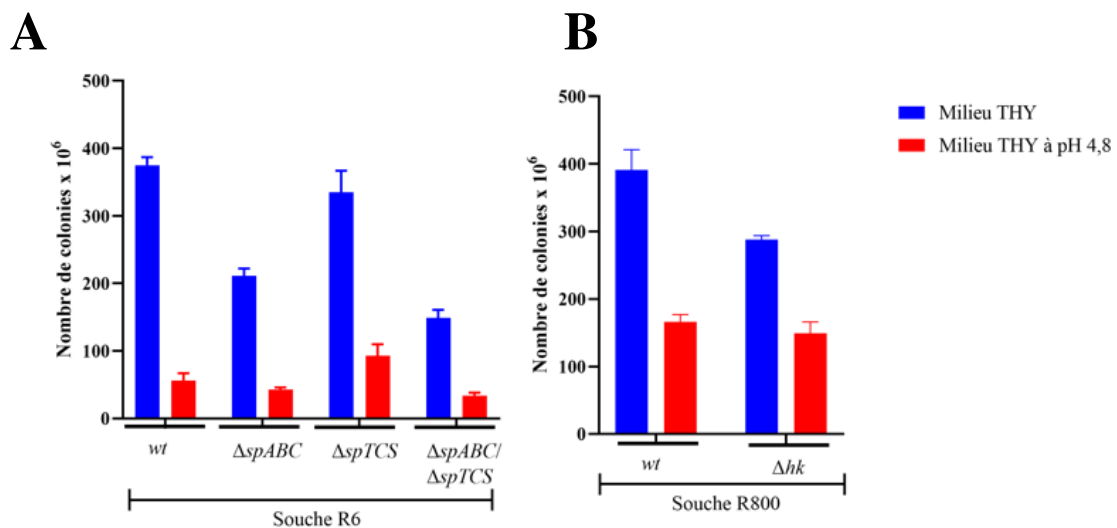
Toutes les expériences d'infection des larves de *G. mellonella* ont chacune été réalisées une seule fois. Il faudrait refaire ses expériences au moins en triplicat pour voir si la tendance que nous avons observée se réitère, à savoir que la délétion de *spTCS* induirait une augmentation de la virulence du pneumocoque chez *G. mellonella*.

## 2.2. Importance du couple SpABC/SpTCS dans la survie de *S. pneumoniae*

Les TCS contribuent beaucoup à l'adaptabilité du pneumocoque face aux différents environnements de son hôte. Récemment, une étude a montré l'implication de SpTCS dans la survie du pneumocoque lorsque les cellules hôtes sont infectées par le virus influenza à travers une résistance

aux stress acide et oxydant associés aux infections virales (Reinoso-Vizcaíno et al. 2020). Ces auteurs ont incubé des souches de *S. pneumoniae* sauvage et délété au niveau du RR 01 (TCS01) dans du milieu de culture acide (pH 4,8) ou supplémenté de 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour mimer *in vitro* l'environnement acide et oxydant causé par l'infection du virus influenza. Après cette incubation, les bactéries sont étalées sur des boîtes de pétri contenant du sang pour compter le nombre de bactéries encore vivantes. Ils observent qu'en absence du RR 01, la survie des pneumocoques baissent 1000 fois dans le milieu acide et 30 fois dans le milieu oxydant.

Nous avons voulu reproduire ces expériences au laboratoire en analysant non seulement la délétion de SpTCS mais aussi celle de SpABC pour déterminer si le transporteur jouait aussi un rôle dans la survie du pneumocoque en milieu acide et oxydant. Toutefois, nous n'avons pas pu répéter les résultats publiés. On observe sur la **Figure 59** que l'absence de SpTCS (ou SpHK) n'impacte pas significativement la survie du pneumocoque (R6 et R800) dans un milieu acide comme mentionné par l'étude publiée en 2020. Il en est de même pour le transporteur SpABC (**Figure 59 A**). De plus, les souches R800 et R6 utilisées ne présentent aucune croissance dans un milieu THY supplémenté de 5, 10, 15 ou 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'après nos résultats, SpTCS n'est pas impliqué dans la survie du pneumocoque en milieu acide ou dans un contexte de stress oxydant lorsque le milieu est supplémenté d'au moins 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 59 : Survie de *S. pneumoniae* en milieu acide**

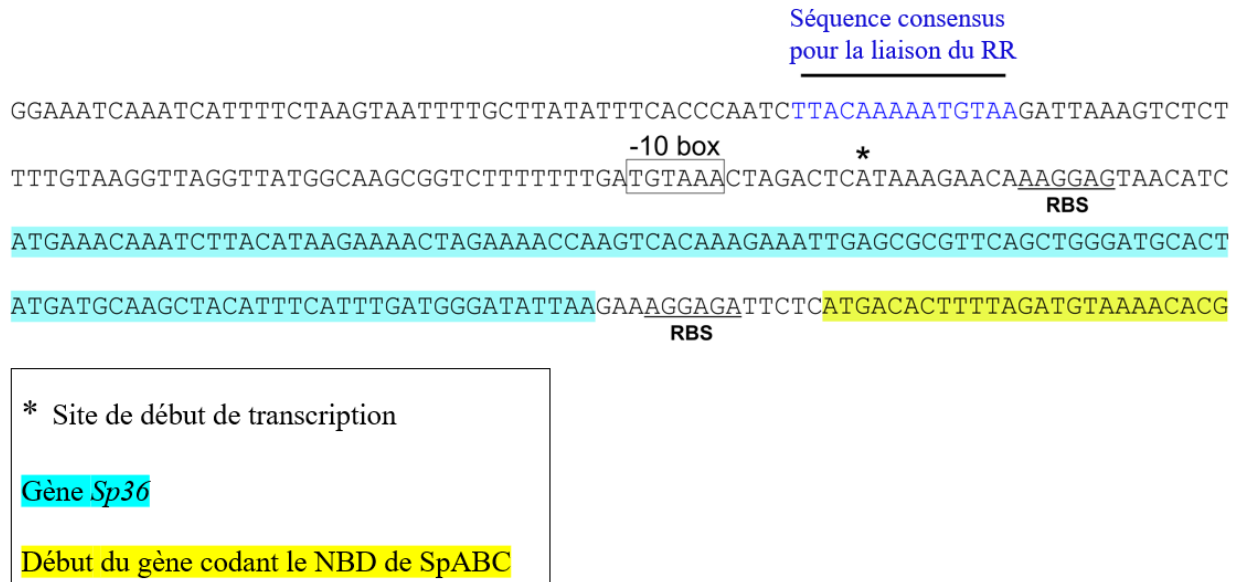
- A. Survie des souches R6 *wt*, *ΔspABC*, *ΔspTCS* et *ΔspABC/ΔspTCS* dans un milieu THY acide
- B. Survie des souches R800 *wt* et *Δhk* dans un milieu THY acide



## 2.3. Sp36, un peptide de fonction inconnue

### 2.3.1. Un peptide codé dans l'opéron *SpABC*

Dans le génome de *S. pneumoniae*, il existe une séquence de 108 paires de bases annotées tout juste en amont du gène codant le transporteur SpABC. Situé à 23 bases après le site d'initiation de la transcription, ce gène nommée *spr0811a* forme un opéron avec les gènes codant SpABC (Becker et al. 2009) (**Figure 60**). En amont de ces gènes, il existe une séquence consensus permettant de lier les régulateurs de réponse cytoplasmiques qui collaborent avec les transporteurs de type BceAB. Cette séquence consensus est identifiée comme suit : TNACA-N4-TGTAA avec une région riche en AT séparée au centre par 4 nucléotides (de Been et al. 2008; Dintner et al. 2011; Gebhard 2012) (**Figure 60**). Dans leur étude publiée en 2009, Becker et ses collaborateurs ont mentionné la traduction de ce petit gène. Ils ont testé la traduction d'une fusion du gène *spr0811a :lacZ* sans toutefois montrer les résultats (Becker et al. 2009). Muni d'un fort RBS (Ribosome Binding Site) riche en purines (AAGGAG) situé à 7 bases en amont, ce gène code pour un peptide de 36 acides aminés que nous avons appelé Sp36 (**Figure 60**). Etant sur le même opéron que SpABC, ce petit peptide est donc aussi supposé être sous le contrôle de SpTCS.



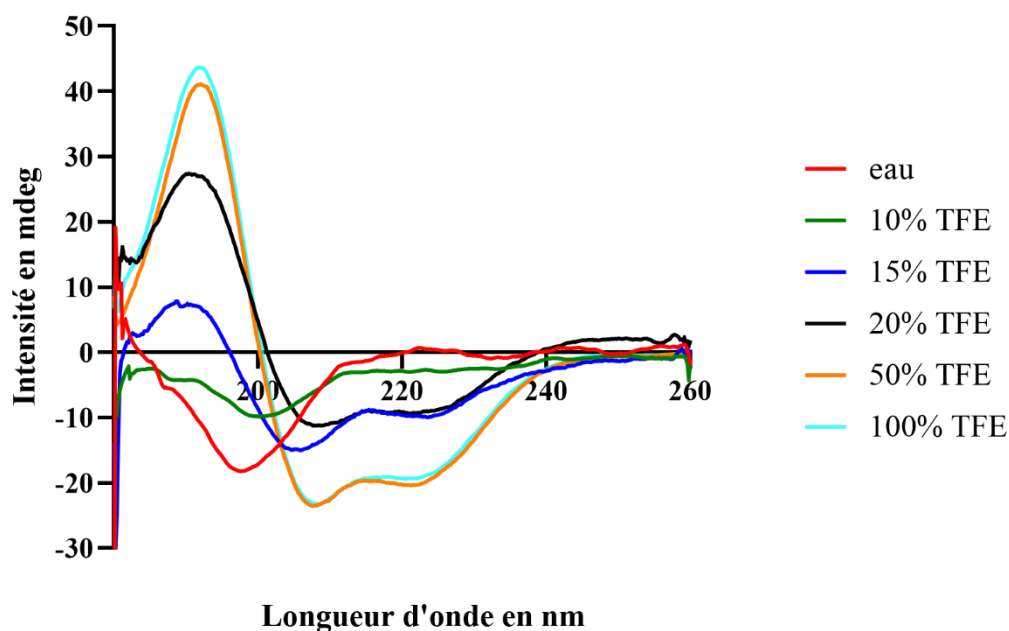
**Figure 60 : Organisation du début de l'opéron *SpABC***

Le site d'initiation de la transcription a été déterminé par Becker et ses collaborateurs ((Becker et al. 2009).

Dans le but d'étudier la fonction de ce peptide Sp36, il a été synthétisé chimiquement par la plateforme PSF (Protein Science Facility UMS 3444). Avant de l'utiliser dans diverses expériences,

ce peptide synthétique a été analysé par dichroïsme circulaire pour visualiser sa conformation. Plusieurs conditions ont été testées pour visualiser le repliement de ce peptide. Tout d'abord, le peptide est dissout dans un tampon HEPES mais les résultats obtenus ne pouvaient pas être analysés car il y avait du bruit de fond provenant du tampon utilisé qui masquait le signal. Le test avec un tampon phosphate a montré que le peptide Sp36 n'était pas soluble dans ces conditions. L'utilisation du tampon Tris-HCl a donné les mêmes résultats que le tampon HEPES. En effet, ces tampons sont souvent inutilisables car ils absorbent la lumière dans la gamme favorable au dichroïsme circulaire ce qui amène un bruit qui masque le signal de la protéine d'intérêt. On observe sur la **Figure 60** qu'en présence d'eau, le peptide n'est pas replié. Il a été mentionné par différentes études que des peptides pouvaient se replier en présence d'ions tels que  $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $\text{HCO}_3^-$  (Avitabile et al. 2015; Brogden 2005). Toutefois, la présence de ces ions n'a pas permis le repliement du peptide d'intérêt. Certains peptides demeurent non repliés jusqu'à ce qu'ils se lient à leurs cibles (Avitabile et al. 2015).

Le peptide Sp36 étant sur le même opéron que le transporteur ABC impliqué dans la résistance aux PAMs, nous avons émis l'hypothèse que ce peptide pourrait être un PAM synthétisé par le pneumocoque pour attaquer les autres micro-organismes qui occupent la même niche écologique. Suivant cette hypothèse, nous avons entré la séquence d'acides aminés de Sp36 dans la banque de données des PAMs (<https://wangapd3.com/main.php>) qui prédit que ce peptide pourrait former des hélices  $\alpha$  et qu'il pourrait avoir au moins 8 résidus sur la même surface hydrophobe. De plus, la banque de données prédit que le peptide Sp36 pourrait être une PAM et interagir avec des membranes. Nous avons aussi trouvé cinq PAMs qui avaient entre 31 et 35% d'identité avec Sp36. Lorsque nous avons renseigné la séquence de ce peptide Sp36 sur le site de la RPBS (Ressource Parisienne de la Bioinformatique Structurale <https://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>), nous avons obtenu un modèle de Sp36 qui prédisait un repliement en 3 hélices  $\alpha$ . De ce fait, nous avons voulu déterminer les structures secondaires de ce peptide en présence de différentes quantités de lipides totaux d'*E. coli* et des lipides de soja. Les résultats étaient inexploitable à cause du bruit occasionné par la présence de ces lipides. Puis, pour s'affranchir du bruit occasionné par la présence de lipides tout en conservant une topologie de lipides, nous nous sommes intéressés aux détergents notamment le LMNG qui a une tête polaire et deux chaînes aliphatiques comme les lipides. En présence de DDM ou de LMNG, il n'y a pas de bruits qui gênent le signal mais le peptide est toujours non replié. Par la suite, nous avons testé le trifluoroéthanol (TFE) qui est un solvant organique très utilisé dans les études de repliement des protéines. Nous avons observé que plus la concentration de TFE augmente dans l'échantillon et plus le peptide Sp36 se replie en hélice  $\alpha$  comme mentionné dans la prédiction de structures (**Figure 61**).



**Figure 61 : Repliement du peptide Sp36 en présence d'eau ou de TFE**

Grâce à un logiciel disponible sur le site <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>, nous avons pu déterminer le pourcentage de structures secondaires en fonction de la quantité de TFE utilisée.

Sp36	Hélices $\alpha$ (%)	Feuillets $\beta$ (%)	Boucles (%)	Non structuré (%)
Dans l'eau	3	36	22	37
Avec 10% de TFE	18	24	27	31
Avec 15% de TFE	55	15	12	19
Avec 20% de TFE	63	10	12	14
Avec 50% de TFE	82	9	3	6
Avec 100% de TFE	87	6	2	5

**Tableau 28 : Pourcentage de structures secondaires du peptide Sp36 en présence d'eau et de TFE**

Comme le montre le **Tableau 28**, en présence d'eau, il y a un important pourcentage (37%) du peptide qui n'est pas structuré. Lorsqu'on met Sp36 en présence de 10% de TFE, on remarque que le pourcentage d'hélices  $\alpha$  commence à augmenter. Plus la quantité de TFE est augmentée, plus le pourcentage d'hélices  $\alpha$  augmente pour avoisiner 90%. Ces résultats sont en accord avec les

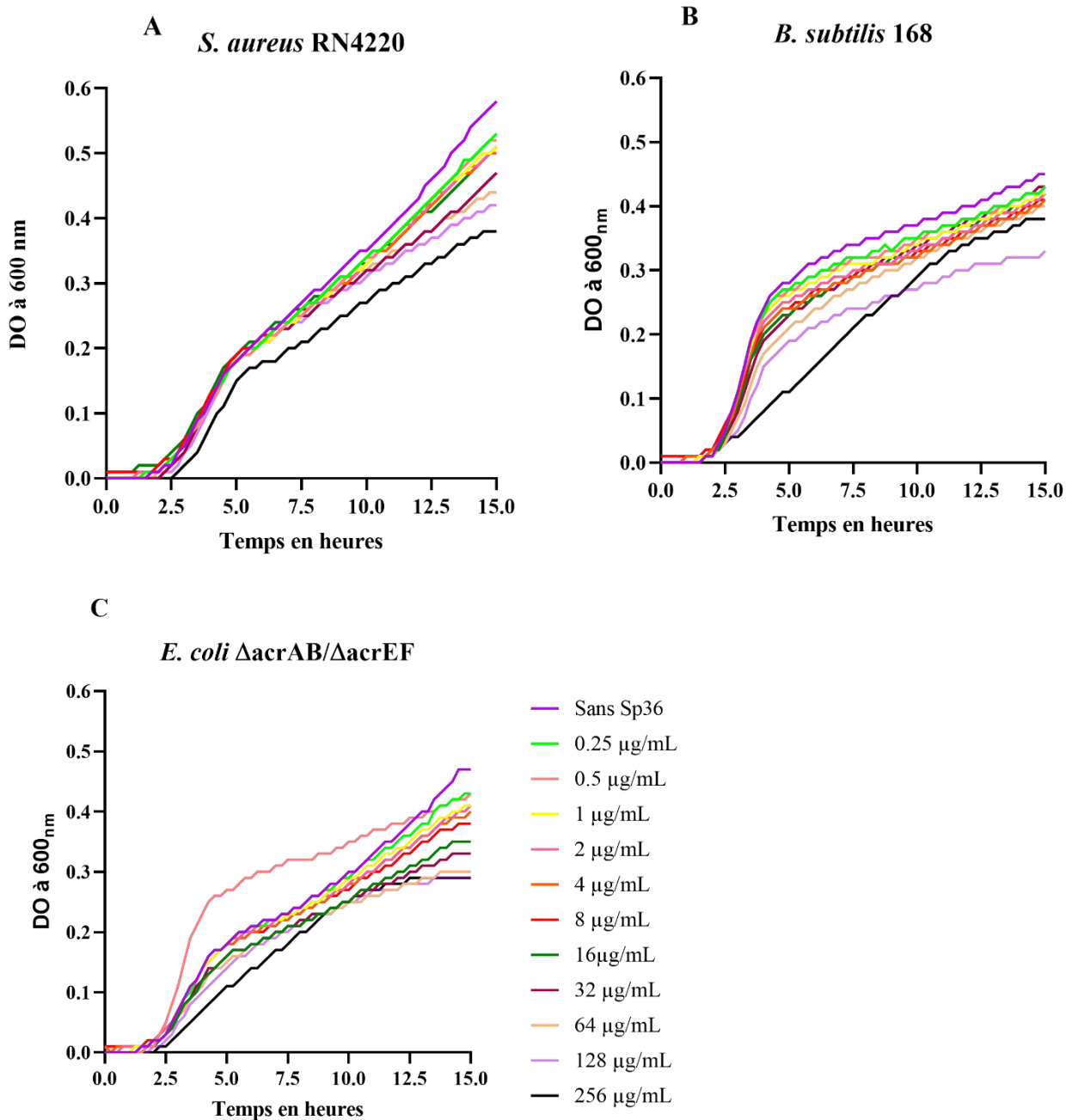
prédictions de structures secondaires. Toutefois, il est connu que le TFE aide au repliement des structures secondaires mais à forte concentration, il peut fortement affecter la structure des protéines.

D'après les résultats obtenus, le peptide Sp36 ne se replie qu'en présence d'au moins 15% de TFE. Le fait qu'il ne se replie pas en absence de TFE n'est pas alarmant car il peut faire partie de la catégorie de peptides qui n'adopte leurs structures qu'en contact de leurs cibles (Avitabile et al. 2015). Toutefois, les questions qui se posent sont : quelle est la cible de ce peptide Sp36 ? Quelle est sa fonction ? Nous avons émis quelques hypothèses et réalisé des expériences pour les vérifier.

### 2.3.2. Sp36 est-il un peptide antimicrobien ?

L'une des premières hypothèses que nous avons émises est que le peptide Sp36 soit un peptide antimicrobien synthétisé par le pneumocoque pour attaquer les compétiteurs de la même niche écologique. Nous avons entré la séquence de Sp36 dans la DBAASP (DataBase Antimicrobial Activity and Structure of Peptides) pour prédire quels organismes seront susceptibles d'être les cibles du peptide (<https://dbaasp.org/prediction/general>) : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis*, érythrocytes humains, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. Pour vérifier que Sp36 présentait une activité antimicrobienne, des tests de résistance en présence trois souches bactériennes ont été réalisés : *S. aureus* RN4220, *B. subtilis* 168 et *E. coli*  $\Delta$ acrAB/ $\Delta$ acrEF.

Nous avons suivi la croissance de ces bactéries durant 15 h à une DO de 600 nm en présence d'une gamme de concentrations en Sp36 allant de 0 à 256  $\mu$ g/mL. On n'observe pas une inhibition significative de la croissance de ces bactéries en présence de Sp36 pour aucune des bactéries utilisées (**Figure 62**). Ces résultats suggèrent que le peptide Sp36 n'a pas d'activité antimicrobienne.



**Figure 62 : Résistance des bactéries *S. aureus* RN4220, *B. subtilis* 168 et *E. coli*  $\Delta$ acrAB/ $\Delta$ acrEF**

- A. Résistance de *S. aureus* RN4220 en présence du peptide Sp36
- B. Résistance de *B. subtilis* 168 en présence du peptide Sp36
- C. Résistance de *E. coli*  $\Delta$ acrAB/ $\Delta$ acrEF en présence du peptide Sp36

### 2.3.3. Sp36 est-il une toxine ?

Après avoir montré que le peptide Sp36 n'avait pas d'activité antimicrobienne sur les souches de bactéries testées, nous nous sommes dirigés vers notre seconde hypothèse : Sp36 serait une toxine contre les cellules humaines, contribuant ainsi à la virulence de *S. pneumoniae*.

Nous avons évalué l'effet du peptide Sp36 sur la survie de deux lignées cellulaires du poumon humain (A549 et 16HBE). Ces expérimentations ont été réalisées dans le laboratoire de notre collaboratrice le Dr Patricia Rousselle (LBTI, Lyon). Pour faire notre contrôle, nous avons fait synthétiser chimiquement par la plateforme PSF un peptide ayant la même composition en acides aminés que Sp36 mais agencé avec un ordre différent que nous avons appelé « Sp36 scrambled ». Pour dessiner la séquence de « Sp36 scrambled », nous avons entré la séquence de Sp36 dans un site de prédiction de structures secondaires YASPIN. Ayant prédit la présence de 3 hélices  $\alpha$ , nous avons voulu déstabiliser ces hélices en changeant la position des acides aminés. Cela nous permet d'avoir un contrôle ayant les mêmes acides aminés que le peptide d'intérêt mais avec une séquence et une structure différente.

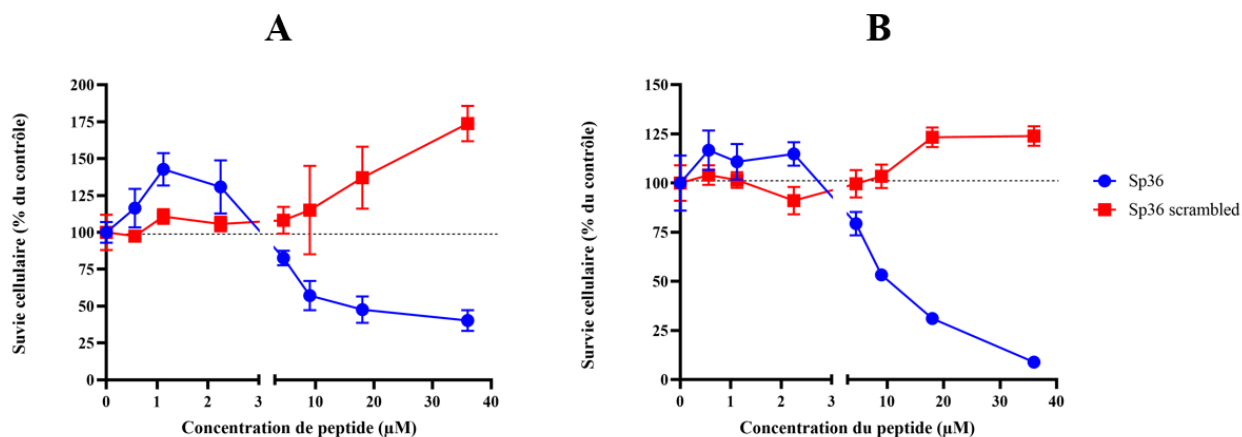
#### Séquence d'acides aminés de Sp36

MKQILHKKTRKPSHKEIERVQLGCTMMQATFHLMGY

#### Séquence d'acides aminés de « Sp36 scrambled »

MYKGQMILHHKFKTTARQKMPMSTHCKGELIQEVL

On observe qu'en présence d'une concentration supérieure de 3  $\mu$ M, le peptide Sp36 devient toxique pour les deux types cellulaires avec un pourcentage de morts plus élevé chez les cellules immortalisées 16HBE. Le peptide « Sp36 scrambled » quant à lui n'a pas d'effet inhibiteur sur ces cellules (**Figure 63**). Cela montre que l'effet observé pour le peptide Sp36 est intrinsèquement lié à sa structure.



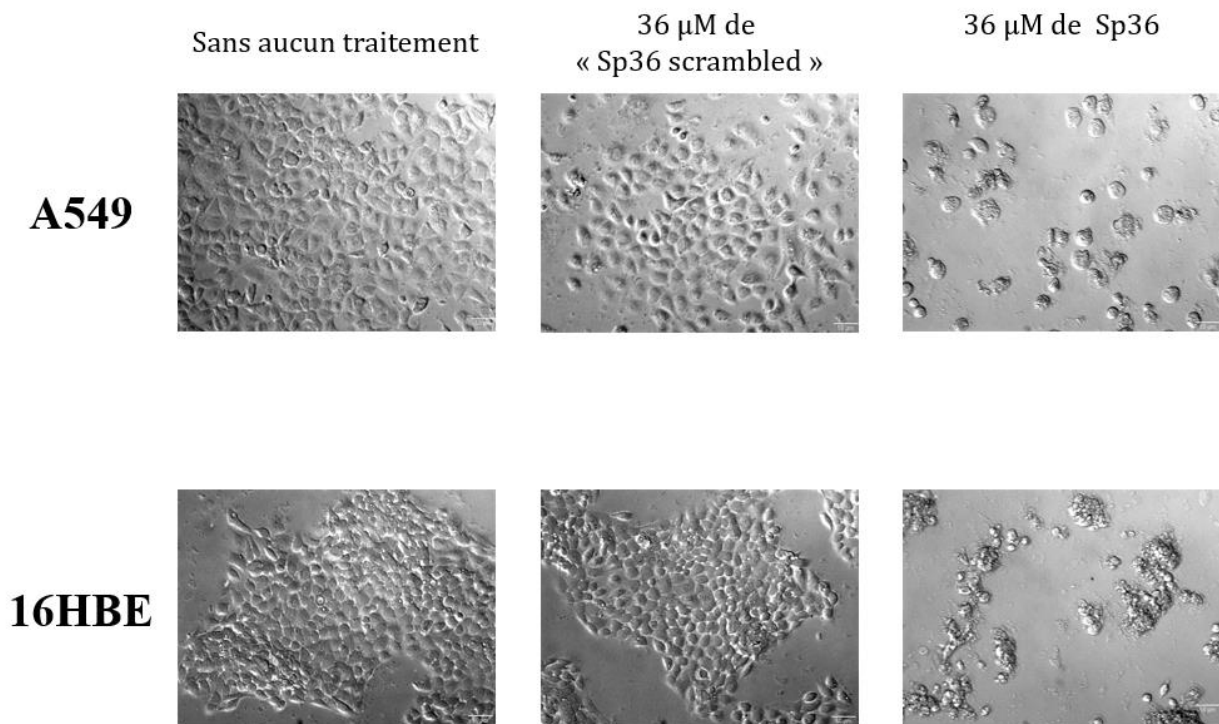
**Figure 63 : Survie des cellules A549 et 16HBE en présence des peptides Sp36 et « Sp36 scrambled »**

**A.** Survie des cellules A549 en présence des peptides Sp36 et « Sp36 scrambled »

**B.** Survie des cellules A549 en présence des peptides Sp36 et « Sp36 scrambled »

Ces expérimentations ont été réalisées à 6 reprises avec à chaque fois 6 réplicats techniques.

Nous avons visualisé au microscope l'état des cellules A549 et 16HBE en présence de Sp36 ou « Sp36 scrambled ». On observe qu'en présence de 36 μM de peptide « Sp36 scrambled », les cellules humaines présentent le même aspect que les cellules qui n'ont subi aucun traitement. En présence de 36 μM de peptide Sp36, l'aspect des cellules humaines est totalement différent. Les cellules présentent un aspect nécrosé (**Figure 64**).



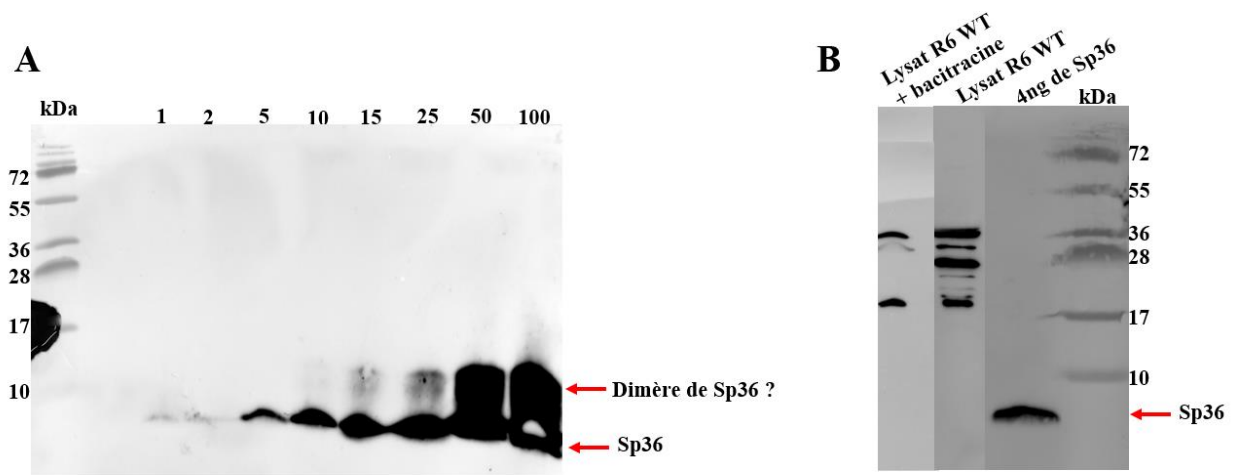
**Figure 64 : Visualisation des cellules A549 et 16HBE traitées avec les peptides Sp36 et « Sp36 scrambled »**

#### 2.3.4. Détection du peptide Sp36

Nous avons montré que le peptide Sp36 synthétisé avait un effet toxique sur les cellules du poumon humain. Toutefois, la traduction de ce peptide dans *S. pneumoniae* n'est pas complètement établie même si Becker et ses collaborateurs l'ont mentionnée sans montrer les données (Becker et al. 2009). Pour détecter la synthèse de ce peptide chez le pneumocoque, nous avons utilisé plusieurs stratégies.

- 1<sup>ère</sup> stratégie : Nous avons fait synthétiser un anticorps polyclonal dirigé contre le peptide Sp36 pour détecter sa présence dans le pneumocoque (Biotem). Nous avons d'abord vérifié la capacité de cet anticorps à reconnaître le peptide synthétique. Pour cela, nous avons réalisé le Western blot de différentes quantités de Sp36 synthétique (1 à 100 ng). On observe sur la **Figure 65 A** que l'anticorps anti-Sp36 détecte jusqu'à 1 ng de Sp36 synthétique. Cet anticorps a aussi été utilisé pour détecter la présence du peptide Sp36 dans le lysat de la souche R6 WT seule et traitée avec 1  $\mu$ g/mL de bacitracine (qui permettrait d'induire les gènes de l'opéron SpABC). Aucune bande correspondant à la taille théorique de Sp36 n'a été détectée dans les lysats bactériens. Toutefois, on observe des bandes non spécifiques dans ces lysats situées à des tailles supérieures à celle de Sp36 qui est d'environ 4 kDa (**Figure 65 B**).





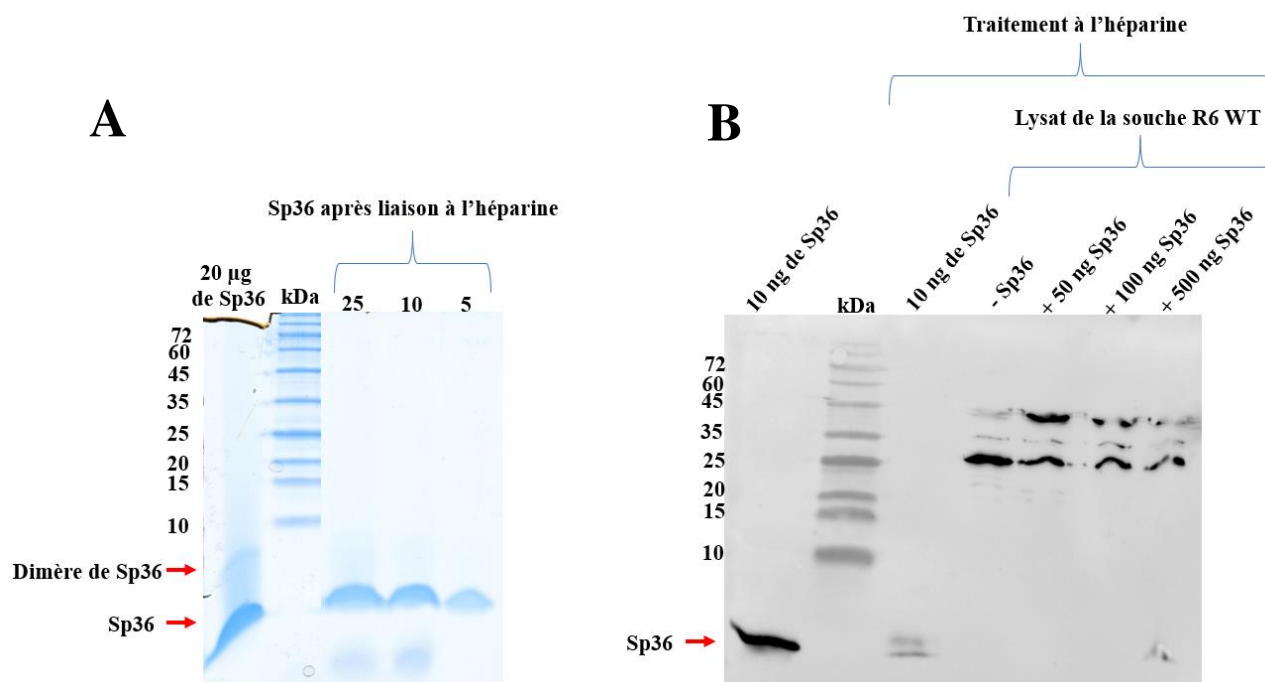
**Figure 65 : Détection du peptide Sp36 par Western blot**

**A.** Limite de détection de Sp36

**B.** Détection de Sp36 dans des lysats de bactéries R6 WT et R6 WT traitée à la bacitracine

On remarque la présence d'une double bande de Sp36 (**Figure 65 A**). Cette 2<sup>ème</sup> bande située vers 10 kDa pourrait s'agir d'un dimère de Sp36. La **Figure 65 B** ne présente pas une 2<sup>ème</sup> bande de Sp36. La différence réside dans le fait que l'échantillon de Sp36 de la **Figure 65 B** a été chauffé.

- 2<sup>ème</sup> stratégie : celle-ci s'appuie sur le fait que le peptide Sp36 est pourvu de plusieurs acides aminés chargés positivement. Cela a permis de faire une hypothèse : le peptide pourrait interagir avec l'héparine qui est un polyanion. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mis en présence de billes d'héparine différentes quantités de Sp36 (5, 10 et 25 µg). On remarque sur la **Figure 66 A**, que les billes d'héparine ont lié le peptide Sp36. Grâce aux différentes quantités de Sp36 testées, on observe qu'à partir de 10 µg de Sp36, la quantité de billes d'héparine utilisée est saturée. En effet la bande à 25 µg de Sp36 est sensiblement la même que la bande à 10 µg de Sp36.



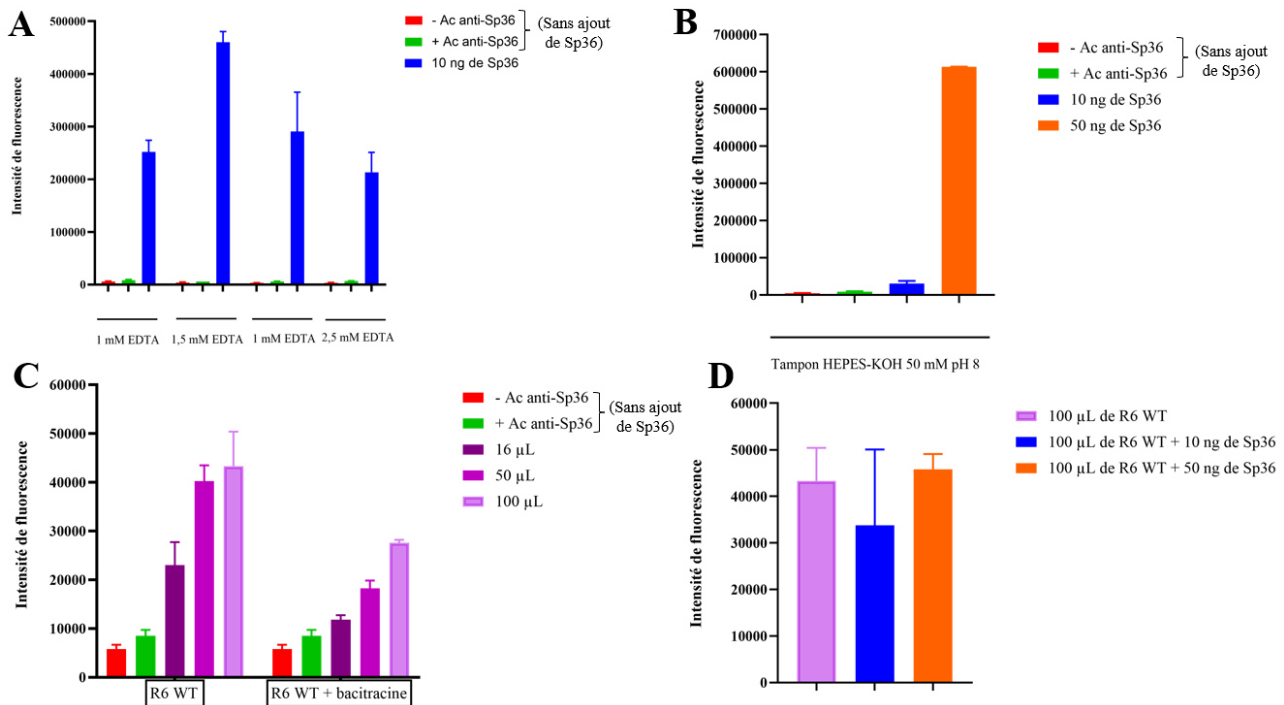
**Figure 66 : Détection du peptide Sp36 via son interaction avec l'héparine**

- A.** Fixation du peptide Sp36 synthétique à l'héparine.
- B.** Détection du Sp36 synthétique dans un milieu complexe via son interaction avec l'héparine.

Par la suite nous avons voulu détecter une quantité connue de Sp36 mélangée à un milieu complexe notamment le lysat cellulaire de la souche R6 WT. Pour cela, nous avons mélangé à ce lysat différentes quantités de Sp36 (50, 100 et 500 ng) (**Figure 66 B**). On observe que le lysat seul, avec 50 ng de Sp36 ou avec 100 ng de Sp36 ne présente pas de bandes correspondant à Sp36 comme pour le contrôle positif. En présence de 500 ng de Sp36 dans le lysat, on remarque une faible bande à la taille de Sp36. Donc il a fallu ajouter une importante quantité de Sp36 pour la détecter dans le lysat bactérien. Nous avons aussi mis 10 ng de Sp36 synthétique en présence des billes d'héparine. On observe que la quantité de Sp36 fixée sur les billes est très inférieure à la quantité initiale si on compare avec le dépôt de 10 ng de Sp36 qui n'a pas été en contact avec les billes d'héparine. Avec ces résultats, nous avons conclu que la méthode utilisée n'était pas assez sensible pour la détection du peptide Sp36 dans le lysat bactérien.

Nous nous sommes tournés vers une autre méthode beaucoup plus sensible basée sur la fluorescence. Les lysats de bactéries ont été ajoutés dans les puits d'une plaque 96 puits recouverts d'héparine. Les protéines ayant une affinité avec l'héparine vont s'accrocher puis une série de lavages est réalisée pour enlever les protéines non liées. L'anticorps primaire anti-Sp36 puis un second anticorps marqué avec une sonde fluorescente (Europium) ont été ajoutés aux différents puits. Les

puits ont été lavés pour enlever les anticorps non fixés puis une solution permettant la libération de l'Europium a été ajoutée. Cela induit la formation d'une molécule hautement fluorescente dont l'excitation à 320 ou 340 nm permet une émission détectable à 615 nm. La quantité de fluorescence détectée est proportionnelle à la quantité de protéines détectée par l'anticorps anti-Sp36.



**Figure 67 : Détection du peptide Sp36**

- Détection du peptide Sp36 ajouté en fonction de la quantité d'EDTA.
- Détection du peptide Sp36 ajouté dans un tampon HEPES-KOH 50 mM pH 8
- Détection du peptide Sp36 synthétisé par les bactéries dans les lysats
- Détection du peptide Sp36 ajouté dans les lysats de bactéries

- Les barres rouges représentent la fluorescence du milieu Tris 10 mM – EDTA x mM en présence de l'anticorps secondaire seul sans aucun ajout de Sp36
- Les barres vertes représentent la fluorescence du milieu Tris 10 mM – EDTA x mM en présence des anticorps primaire et secondaire sans aucun ajout de Sp36.

Nous avons d'abord testé la validité de l'expérimentation. Pour cela, les fixations aspécifiques des anticorps anti-Sp36 (barres vertes) et secondaire (barres rouges) ont été mesurées. On observe que les valeurs de fluorescence obtenues sont similaires. Lorsqu'une quantité de 10 ng de Sp36 synthétique a été ajoutée, on observe une augmentation significative de la fluorescence montrant que le peptide Sp36 a été détecté dans le milieu (**Figure 67 A**).

Au cours de nos expérimentations, nous avons observé que la quantité d'EDTA présente dans le milieu influait la fixation du peptide Sp36 sur l'héparine. En effet, une plus grande quantité de Sp36 est détectée lorsque le peptide est dans un environnement ayant 1,5 mM d'EDTA (**Figure 67 A**). L'EDTA semble favoriser l'interaction entre le peptide Sp36 et l'héparine. Cela a été montré par le fait qu'une solution d'HEPES-KOH ayant 50 ng de Sp36 présente une quantité de fluorescence similaire à une solution de 1,5 mM EDTA ayant 10 ng de Sp36 (**Figure 67 A et B**).

Plus la quantité de lysat bactérien est augmentée, plus l'intensité de fluorescence augmente montrant qu'il y a une dose réponse (**Figure 67 C**). Pour la souche R6 *wt*, on observe sensiblement la même intensité de fluorescence entre l'ajout de 50  $\mu$ L et de 100  $\mu$ L de lysat montrant que le système de détection était saturé. Il y a une différence de détection notable entre la souche R6 *wt* et celle traitée avec la bacitracine. Cela est peut-être dû au fait que le dépôt de lysat ne s'est pas fait selon la quantité de protéines obtenue (que nous aurions pu déterminer par un dosage au BCA) mais selon une normalisation basée sur l'absorbance de la culture de départ. On observe une plus grande quantité de peptide Sp36 dans la souche R6 WT seule (**Figure 67 C**). Cela est surprenant car le gène codant Sp36 est dans le même opéron que *spABC* donc l'expression de Sp36 devrait être stimulée en présence de bacitracine. Pour être certain que la différence de détection n'est pas due à une différence de dépôt de quantité de protéines, il faudra effectuer un dosage au BCA et déposer la même quantité de protéines. On observe sur la **Figure 67 D** que l'ajout de Sp36 synthétique dans le lysat de R6 *wt* seul ne change pas l'intensité de fluorescence. La quantité d'héparine utilisée est saturée par la quantité de lysat déposé (100  $\mu$ L). Cette méthode de détection allie l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre le peptide Sp36 et d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome la rendant très sensible. De ce fait, comme contrôle négatif, il serait très intéressant de refaire cette expérience avec une souche R6  $\Delta$ *sp36* pour montrer que l'anticorps primaire est complètement spécifique au peptide Sp36.

- 3<sup>ème</sup> stratégie : elle consiste à détecter la présence du peptide Sp36 par spectrométrie de masse.

Pour cela, la souche R6 est incubée en présence d'une concentration sub-inhibitrice de bacitracine pour exprimer les gènes de l'opéron *SpABC* incluant le gène codant Sp36. Par la suite, les bactéries sont récupérées, lysées et centrifugées pour se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant obtenu est passé sur des concentrateurs de 10 kDa et 30 kDa et la solution non retenue par les filtres est conservée dans le but de s'affranchir des grosses protéines qui peuvent empêcher la détection du peptide Sp36 de 4 kDa. Les différents surnageants ainsi que la solution de Sp36 synthétique ont été traités par la chymotrypsine avant d'être analysés par la spectrométrie de masse. Après la digestion de Sp36 par la chymotrypsine, deux peptides d'intérêt ont été ciblés : HKKTRKPSHKEIERVQL et

KQILHKKTRKPSHKEIERVQL. Le peptide HKKTRKPSHKEIERVQL a été très bien identifié en mode PRM (Parallel Reaction Monitoring) ce qui permet de valider la méthode d'acquisition PRM. Toutefois, le peptide d'intérêt n'a été détecté dans aucun des échantillons de lysat de *S. pneumoniae*.

### 3. Discussion et Perspectives

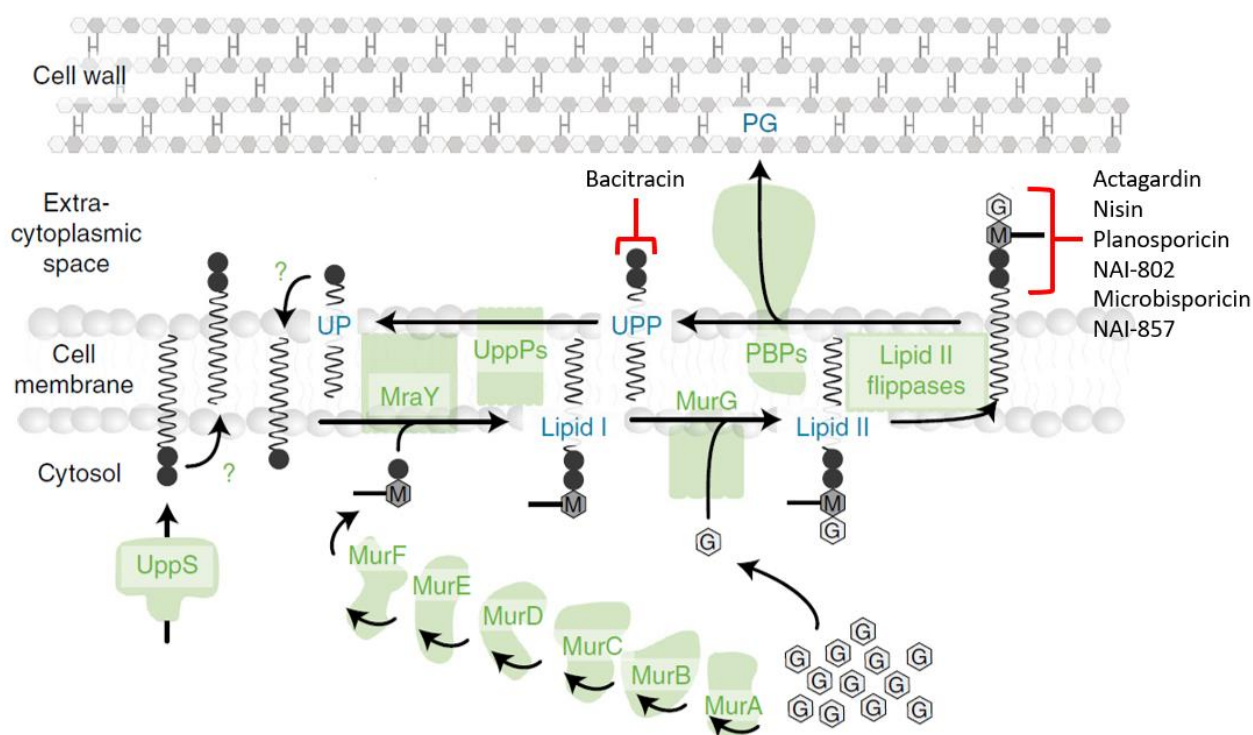
Dans cette étude, nous avons démontré par différentes méthodes que le transporteur SpABC (constitué des produits des gènes SPD\_0804 et SPD\_0805) et le système à deux composants TCS01 (un des 13 TCS du pneumocoque) collaborent étroitement pour permettre au pneumocoque de résister à des PAMs.

Le transporteur SpABC appartient à la famille des BceAB où les membres sont connus pour coopérer la plupart du temps avec des TCS adjacents pour établir la résistance dans les bactéries *Firmicutes* ayant une faible proportion de G+C (Gebhard, 2012). Toutefois, chez *S. pneumoniae*, les opérons *spABC* et *spTCS* sont distants de 0,64 Mb. Les transporteurs de type BceAB ne sont pas uniquement responsables de la résistance aux PAMs mais transmettent le signal à leur TCS partenaire (Bernard et al. 2007; Dintner et al. 2014). En effet, ils disposent d'un domaine extracellulaire composé d'environ 200 acides aminés capables de reconnaître et fixer les substrats (Dintner et al. 2014; Hiron et al. 2011) qui manque au TCS partenaire.

#### 3.1. Spécificité de substrats du couple SpABC/SpTCS

Les PAMs que nous avons identifiés ciblent des précurseurs de la paroi bactérienne : l'undécaprényl pyrophosphate (UPP ou C55-P), un composant du lipide II, dans le cas de la bacitracine et le lipide II dans le cas des autres. Toutefois, il existe une exception parmi la liste de PAMs testés. La ramoplanine présente une structure similaire à l'actagardine (Cudic et al. 2002) et inhibe la biosynthèse du peptidoglycane mais elle n'est pas reconnue par le couple SpABC/SpTCS. La ramoplanine agit en bloquant deux étapes séquentielles de la synthèse du peptidoglycane : la conversion du lipide I en lipide II catalysée par la transférase MurG et la transglycosylation du lipide II (Fang et al. 2006). Toutefois, l'inhibition de cette étape de transglycosylation est préférentiellement choisie par la ramoplanine car le PAM présente une affinité de l'ordre du nanomolaire avec le lipide II (Fang et al. 2006; Hu et al. 2003). Cependant cette liaison au lipide II requiert la présence de MurNAc-Ala- $\gamma$ -D-Glu pyrophosphate (Cudic et al. 2002). Quand à l'actagardine, il interagit avec le MurNAc-GlcNAc pyrophosphate du lipide II (Brötz et al. 1998). Il a été montré chez *B. subtilis* que l'actagardine induit l'expression des transporteurs BceAB et YvcRS, ce qui n'est pas le cas pour la ramoplanine (Staroń, et al. 2011). De ce fait, les transporteurs ABC de la sous-famille des BceAB

sont capables d'induire une résistance envers des PAMs très différents structurellement mais aussi de différencier des PAMs très similaires (Revilla-Guarinos et al. 2020). Cependant certains PAMs sont capables d'induire l'expression d'un transporteur de type BceAB qui n'aboutit pas à la mise en place d'une résistance. On observe ce cas chez *B. subtilis* où l'expression du transporteur YvcRS est induite par l'actagardine mais ce transporteur ne permet pas la résistance à ce PAM. Ces résultats montrent que chez certains BceAB, la détection d'un signal n'est pas systématiquement suivi par la mise en place de la résistance (Kallenberg et al. 2013; Revilla-Guarinos et al. 2020). Même s'ils présentent de fortes similarités de séquences, les transporteurs de type BceAB de *B. subtilis* et *S. pneumoniae* ne répondent pas aux mêmes PAMs. Chez *B. subtilis*, la nisine, l'actagardine et la bacitracine sont prises en charge par deux transporteurs séparés. YvcRS encore appelé PsdAB résiste à la nisine alors que BceAB établit la résistance contre l'actagardine et la bacitracine (Starón et al. 2011). Par contre, le transporteur SpABC protège *S. pneumoniae* de tous ces PAMs.



**Figure 68 : Sites d'action des PAMs substrats de SpABC**

D'après (Piepenbreier et al. 2019)

Comme le montre la **Figure 68**, la bacitracine lie l'UPP et inhibe la déphosphorylation de l'UPP en UP, empêchant ainsi le recyclage du lipide II. La nisine, utilise le lipide II comme molécule d'ancrage pour créer des pores au niveau de la membrane bactérienne. L'actagardine inhibe la

biosynthèse du peptidoglycane en formant un complexe avec le lipide II en se liant au MurNAc-GlcNAc pyrophosphate. Le NAI-802, le NAI-857, la planosporicine et la microbisporicine se lient au lipide II pour arrêter la biosynthèse du peptidoglycane (Jabés et al. 2011; Sherwood et al. 2013; Simone et al. 2013). A ce jour, le mécanisme exact de résistance à ces PAMs est toujours débattu parmi la communauté scientifique. Tout d'abord, un mécanisme d'export des PAMs a été proposé (Reiners et al. 2017) mais récemment, une autre étude a émis l'hypothèse que le système de résistance serait en fait basé sur une protection de la cible. Les transporteurs de type BceAB agissent en dissociant le lipide II et ses intermédiaires des PAMs qui les ciblent (Kobras et al. 2020). Le fait que SpABC permet au pneumocoque de résister à au moins cinq PAMs avec des structures différentes qui ciblent tous des précurseurs de la biosynthèse du peptidoglycane est en accord avec l'hypothèse de la protection de la cible.

### 3.2. Régulation du système SpABC/SpTCS

La liaison des PAMs au domaine extracellulaire de SpABC entraîne une cascade de signalisation où l'HK s'autophosphoryle et transfère son phosphate sur le RR qui induit l'expression de SpABC. Les expériences de qPCR ont montré que la stimulation de l'expression des gènes de *spABC* était due à l'intégrité des gènes de *spTCS*. Toutefois, SpTCS ne régule pas sa propre expression. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature. En effet, d'autres études ont montré que l'expression de *spTCS* n'était pas affectée par la présence de bacitracine ou d'autres PAMs ((Eldholm et al. 2010; Majchrzykiewicz et al. 2010). Toutefois, un autre TCS de *S. pneumoniae* est activé par la présence de PAMs qui ont pour cible la paroi bactérienne tels que la bacitracine, la vancomycine, la ramoplanine et la nisine. C'est le cas du TCS03 communément appelé LiaRS (Eldholm et al. 2010). Ce fait pourrait peut-être expliquer pourquoi le rôle physiologique de SpTCS a été compliqué à déterminer. La réponse de LiaRS aux PAMs a pu masquer le rôle de SpTCS dans la résistance aux PAMs. Toutefois, LiaRS répond seulement aux fortes concentrations de bacitracine et de manière indirecte car il ne détecte pas directement la bacitracine mais les dégâts occasionnés par cette dernière au niveau de la paroi (Rietkötter et al. 2008). Il existe un autre système de régulation chez *S. mutans*. Les expressions du transporteur ABC et du TCS homologues à SpABC et SpTCS sont tous les deux stimulées par la présence de bacitracine. De ce fait, le TCS de *S. mutans* régule sa propre expression. En effet, dans cette bactérie, le transporteur ABC (MbrAB) et son TCS partenaire (MbrCD) appartiennent au même opéron ((Ahmad et al. 2020; Ouyang et al. 2010). La stimulation de l'expression de SpABC en présence de bacitracine ainsi que l'absence d'impact de la présence de ce même PAM sur l'expression de SpTCS ont aussi été montrées au niveau protéique (**Figures 52, 53 et 54 A et B**). Cependant, on observe que la souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* traitée avec

32 µg/mL de bacitracine présente une stimulation de l'expression du RR comparée à la souche R800 *wt* traitée avec 1 µg/mL. Cette situation peut s'expliquer par le fait qu'à cette concentration de 32 µg/mL, le système de résistance est mis en présence d'une quantité de bacitracine que naturellement elle n'aurait pas eu à supporter. L'hypothèse émise est que la souche super-résistante produit plus de HK que la souche sauvage même en absence de bacitracine. Cette augmentation de HK permettrait alors de phosphoryler et de stabiliser plus RR permettant leur détection significative en spectrométrie de masse. Cela induit une plus grande expression du transporteur SpABC conduisant la bactérie à mieux résister à la bacitracine. Pour vérifier cette explication, il faudrait comparer l'expression génique de l'HK dans les bactéries R800 WT à 1 µg/mL et souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* à 32 µg/mL car la quantification protéique ne permet pas de détecter significativement l'HK. Dans la souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk*, on observe qu'en plus du transporteur SpABC, de nombreuses autres protéines sont surexprimées. Pour montrer que ces protéines surexprimées ne participent pas à la résistance aux PAMs, la souche R800  $\Delta hk$   $\Delta spABC$  PcomX *hk* a été construite. Si cette souche perd sa résistance aux PAMs, cela montrera que c'est le transporteur ABC qui médie cette super-résistance aux PAMs chez le pneumocoque. Les résultats de ces expérimentations sont en cours d'analyse par M<sup>me</sup> Agathe Faure, une doctorante de notre laboratoire travaillant sur le même système.

### 3.2. Rôle du système SpABC/SpTCS dans la virulence de *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures humaines qui peut devenir un pathogène opportuniste. Dans sa niche écologique, cette bactérie est exposée à de nombreux PAMs produits par l'hôte humain ou les autres bactéries compétitrices. Outre le fait que le TCS01 (SpTCS) est impliqué dans la virulence du pneumocoque ((Throup et al. 2000; Trihn et al. 2013), il existe d'autres TCS mieux caractérisés qui jouent un rôle important dans cette virulence. Ces TCS (CiaRH et WalRK) répondent à la présence des antibiotiques qui perturbent l'intégrité de la paroi bactérienne. La colonisation du nasopharynx par *S. pneumoniae* est un pré-requis pour causer la pneumonie et des maladies plus invasives. Cette colonisation est asymptomatique impliquant des interactions complexes entre les organismes commensaux, le système immunitaire de l'hôte et les facteurs environnementaux (Thevaranjan et al. 2016). Les bactéries commensales jouent un rôle très important dans la défense de leur organisme hôte contre des pathogènes. Elles produisent des molécules et signaux antimicrobiens qui inhibent la croissance des pathogènes respiratoires leur permettant aussi de se débarrasser d'éventuels compétiteurs pour les nutriments disponibles et les sites d'adhésion. De plus, ces bactéries agissent sur le système immunitaire de l'hôte en induisant des réponses protectives qui empêchent l'invasion du pathogène (Khan et al. 2019). Pour qu'une bactérie devienne proprement pathogène, il faut aussi qu'elle échappe au système immunitaire de son hôte.



Chez l'humain, le système immunitaire inné recrute des cellules d'immunité telles que les neutrophiles pour synthétiser des PAMs antimicrobiens incluant des défensines et des cathélicidines. Les cellules épithéliales sont aussi capables de synthétiser ce type de PAMs. Ces défensines humaines ciblent le lipide II de la membrane bactérienne (Varney et al. 2013) et contribuent au maintien de la balance entre l'éradication des bactéries pathogènes et la tolérance envers le microbiote local. Un des objectifs actuels du laboratoire est de déterminer si le couple SpABC/SpTCS est impliqué dans la résistance aux défensines. Ce travail n'est pas trivial car les défensines nécessitent les ponts disulfures appropriés pour leur bon repliement et leur fonction biologique.

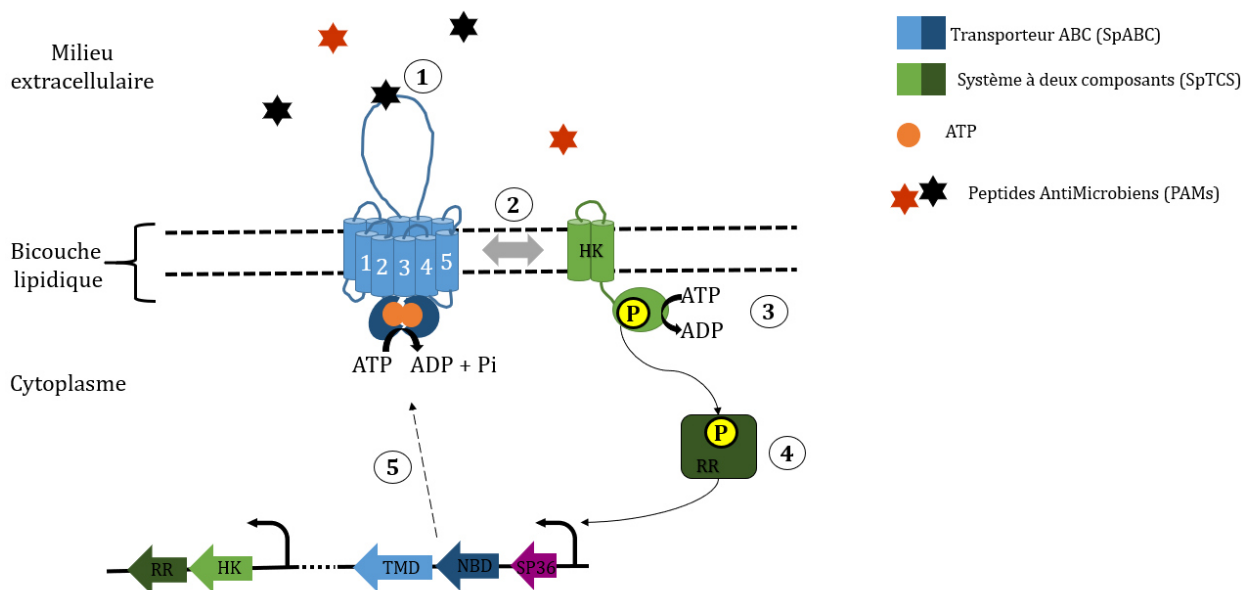
Une étude basée sur la transcriptomique du pneumocoque sous 22 différentes conditions d'infection a été publiée. Elle met en avant l'identification 498 gènes dont le niveau d'expression varie selon la condition d'infection. Parmi ces gènes, le NBD de SpABC est inclus mais pas les gènes codant SpTCS (Aprianto et al. 2018). Il serait intéressant de pouvoir infecter des modèles souris avec des souches de *S. pneumoniae* sauvage et délété au niveau du transporteur SpABC pour étudier l'impact de cette protéine dans la virulence du pathogène.

*S. pneumoniae* produit une toxine appelée pneumolysine qui est un important facteur de virulence. Etant dépourvu d'un signal de sécrétion, cette toxine n'est pas activement sécrétée. Elle est libérée lors de la lyse du pneumocoque et agit en créant des pores dans les cellules de l'hôte. Cela conduit à l'apoptose ou la lyse cellulaire en induisant des dommages au niveau de l'ADN, en séparant les jonctions entre des cellules facilitant ainsi l'invasion et en exposant de nouvelles sites de d'adhésion pour le pneumocoque (Rai et al. 2016). Lorsque les bactéries pathogènes résistent aux PAMs synthétisés par les bactéries locales ou les cellules immunitaires au cours de l'inflammation, cela favorise chaque étape du processus de colonisation (Siegel et Weiser 2015). Dans cette étude, nous avons montré que SpTCS régule les gènes de résistance aux PAMs. En amont de ces gènes (*spABC*), il y a un gène codant le peptide Sp36 pourvu de 36 acides aminés. Nous suggérons que SpTCS régule l'expression de Sp36 qui présente un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales du poumon. De ce fait, ce TCS pourrait être impliqué dans la virulence de *S. pneumoniae* via la résistance aux PAMs mais aussi par la régulation de l'expression du peptide cytotoxique Sp36. Le fait de retrouver un peptide sur le même opéron qu'un transporteur ABC n'est pas spécifique de la bactérie *S. pneumoniae*. C'est le cas de la protéine membranaire VraH codé sur le même opéron que le transporteur VraDE de *S. aureus*. VraH est une protéine de 63 acides aminés avec deux hélices transmembranaires prédites (Popella et al. 2016). Lorsque VraH interagit avec VraDE, il permet à ce transporteur d'acquérir sa capacité totale de résistance. En plus de résister à la bacitracine et à la nisine, VraDEH permet au *S. aureus* de mieux résister à la gallidermine et à la daptomycine. VraH et

VraDE forment un système à trois composants qui est très important dans la résistance aux PAMs et dans la survie de *S. aureus* (Popella et al. 2016).

### 3.3. Modèle de fonctionnement du système de résistance aux PAMs médié par le couple SpABC/SpTCS chez *S. pneumoniae*

La **Figure 69** présente le module de fonctionnement du système SpABC/SpTCS impliqué dans la résistance aux PAMs et dans la virulence, établi grâce aux résultats que nous avons obtenus ainsi qu'aux connaissances acquises dans la littérature scientifique. Le transporteur SpABC avec ses 10 hélices transmembranaires prédites détecte et fixe les PAMs grâce à son domaine extracellulaire de 200 acides situé entre les hélices 7 et 8. Cette fixation des PAMs substrats est détectée par l'HK qui s'autophosphoryle sur son histidine conservée puis transfère le groupement phosphorylé sur l'aspartate conservé du RR. Ce dernier grâce à son domaine de liaison à l'ADN induit l'expression du transporteur SpABC et du peptide Sp36 mettant en place la résistance aux PAMs et la toxicité du pneumocoque. Toutefois, le processus de sécrétion du peptide Sp36 n'est pas encore élucidé.



**Figure 69 : Module de fonctionnement du système SpABC/SpTCS impliqué dans la résistance aux PAMs et dans la virulence**

1. Détection des PAMs
2. Transfert du signal à l'histidine kinase (HK)
3. Autophosphorylation de l'HK sur son histidine conservée
4. Transfert du groupement phosphorylé sur l'aspartate conservé du RR
5. Induction de l'expression du transporteur SpABC et de la toxine Sp36 induisant la résistance aux PAMs et la virulence de *S. pneumoniae*

Tous les systèmes de résistance aux PAMs ne présentent pas les mêmes fonctionnements. Les systèmes « classiques » de résistance aux PAMs sont constitués de deux opérons adjacents codant pour le transporteur ABC et le système de régulation à deux composants. Le transporteur ABC détecte la présence des PAMs et induit la résistance jouant ainsi un double rôle. Le TCS régule l'expression du transporteur ABC en présence des PAMs substrats mais ne régule pas sa propre expression. L'opéron codant le transportant ABC ne comporte pas un autre gène. On retrouve ces caractéristiques chez des transporteurs de PAMs de *B. subtilis* (**Figure 70**) (Staroń et al. 2011; Gebhard 2012).

Cependant, il existe des exceptions autres que le système SpABC/SpTCS de *S. pneumoniae* dont nous avons évoquées les différences dans ce manuscrit. Chez *S. mutans*, le transporteur ABC et le TCS sont dans le même opéron aboutissant au fait que le TCS régule aussi bien l'expression du transporteur ABC que sa propre expression (**Figure 70**) (Ouyang et al. 2010; Kitagawa et al. 2011). Chez *S. aureus*, il existe plusieurs systèmes de résistance aux PAMs qui présentent un fonctionnement différent. L'un des systèmes de résistance comporte un TCS nommé BraRS qui régule l'expression de deux transporteurs ABC : BraDE qui détecte la présence des PAMs substrats et VraDE qui induit la résistance en collaborant selon les circonstances avec la protéine transmembranaire VraH codé sur le même opéron (**Figure 70**) (Hiron et al. 2011; Popella et al. 2016). Toujours dans *S. aureus*, un autre système de résistance utilise une protéine soluble nommée GraX et codée sur le même opéron que le TCS GraRS comme un co-facteur important dans l'interaction entre VraG et GraS. Cela permet au transporteur VraFG qui a détecté la présence des PAMs substrats de transmettre l'information au TCS GraRS qui va induire l'expression du transporteur aboutissant à la résistance (**Figure 70**) (Falord et al. 2012).

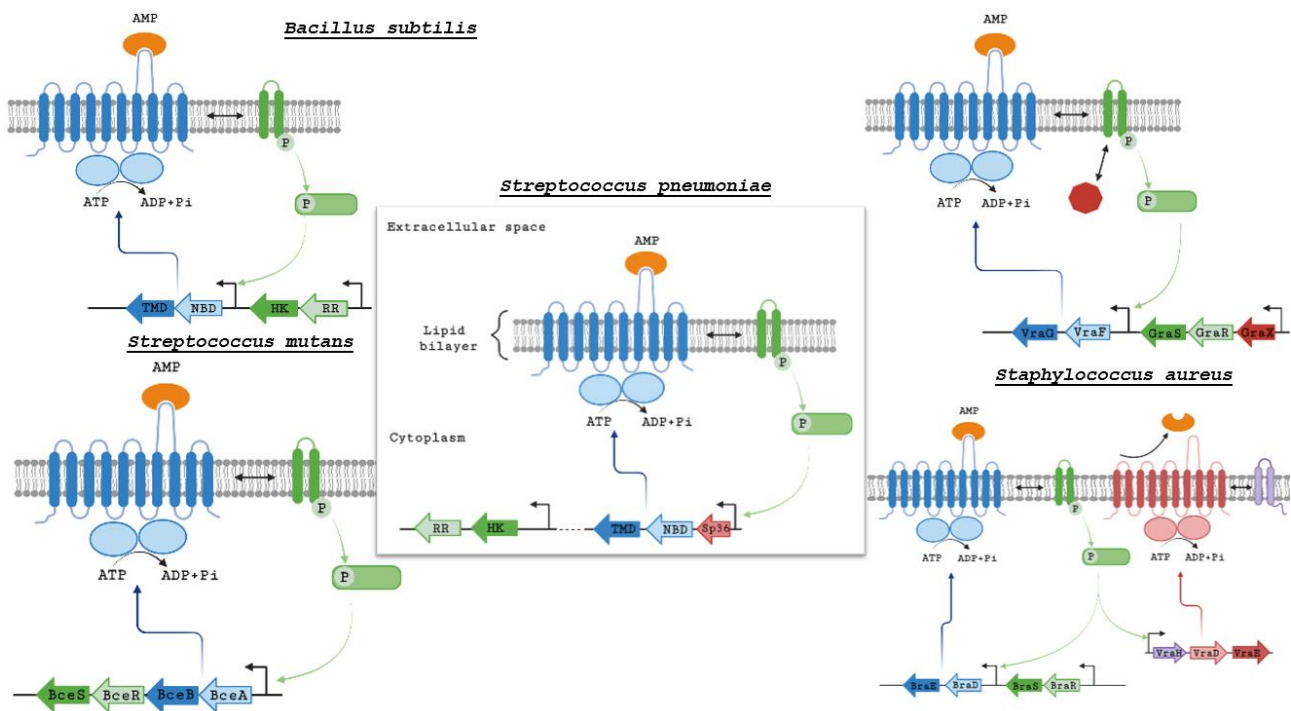
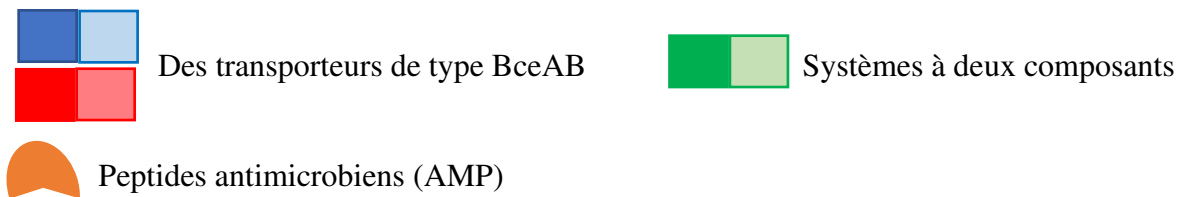


Figure 70 : Différence entre les systèmes de résistance aux PAMs chez *S. pneumoniae* et d'autres firmicutes



Les figures ont été réalisées à l'aide du site <https://biorender.com/>

## 4. Etude biochimique du transporteur ABC

Les protéines membranaires représentent 20 à 30% des protéines synthétisées chez tous les organismes (Almén et al. 2009) et jouent des rôles physiologiques très importants, ce qui fait qu'elles représentent la principale cible des agents thérapeutiques (Grimm et al. 2011). Cependant, ces protéines membranaires ne sont généralement pas suffisamment exprimées dans leurs organismes hôtes pour permettre des études biochimiques. De ce fait, elles sont surexprimées dans des organismes hétérologues tels que *E. coli* (qui est le plus largement utilisé chez les bactéries) mais aussi des levures comme *Saccharomyces cerevisiae*.

La protéine SpABC est un transporteur ABC appartenant à la sous-famille des BceAB et permet la résistance aux PAMs (Becker et al. 2009; Majchrzykiewicz et al. 2010).

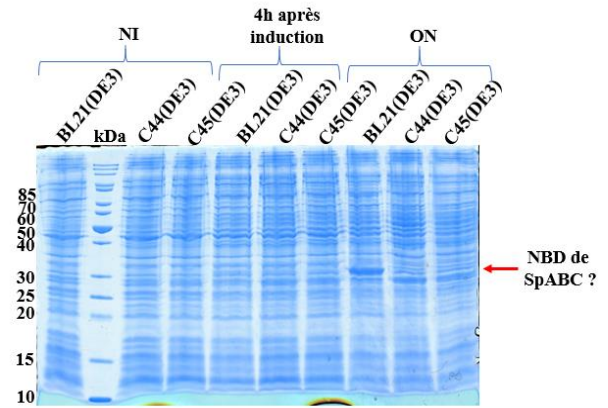
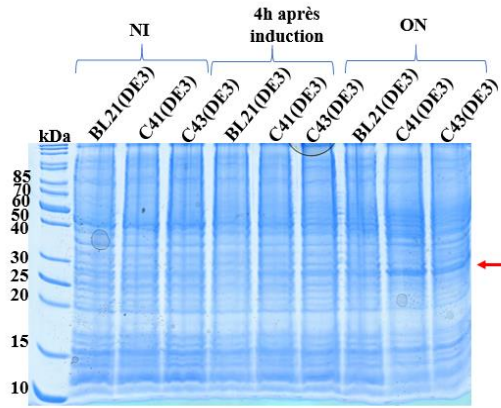
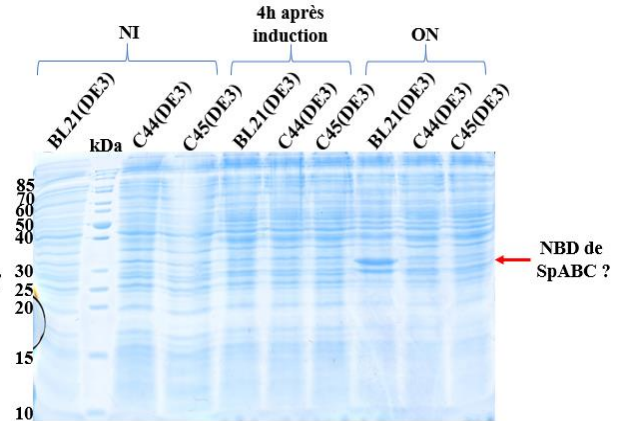
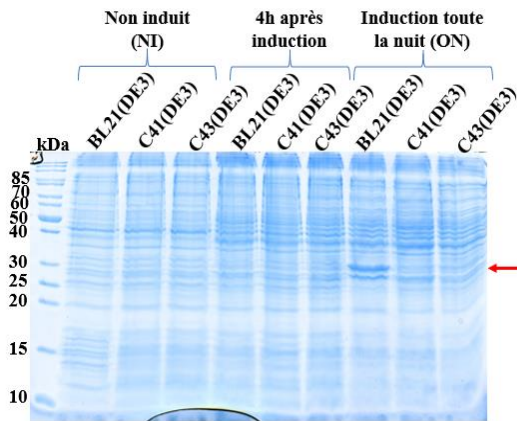
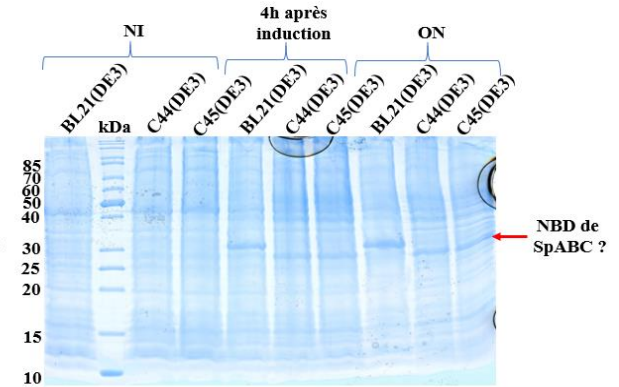
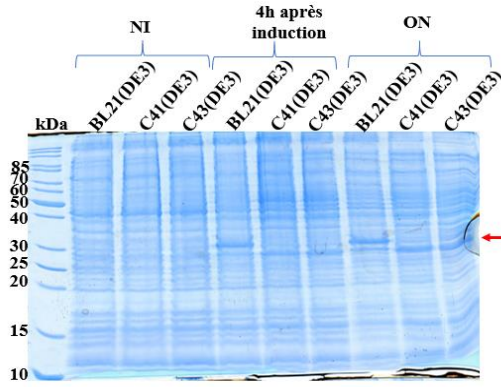
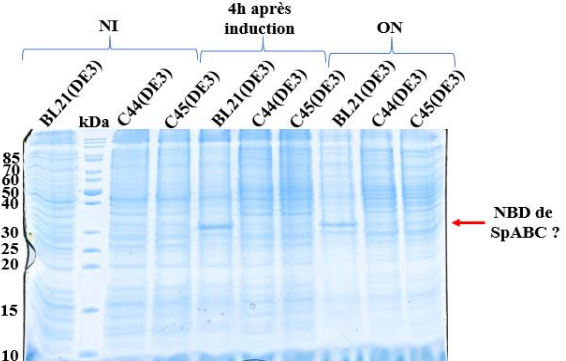
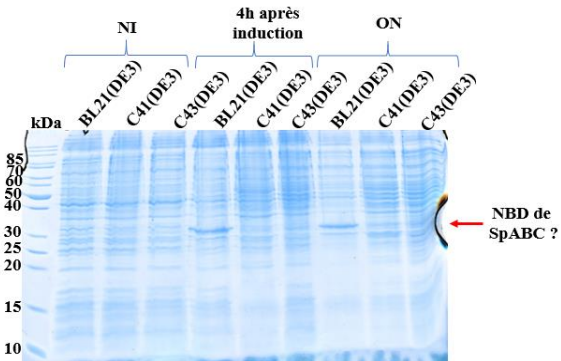
Pour étudier la biochimie de ce transporteur SpABC, nous l'avons d'abord surexprimé en quantités suffisantes dans des systèmes hétérologues puis avons déterminé les conditions dans lesquelles il est fonctionnel.

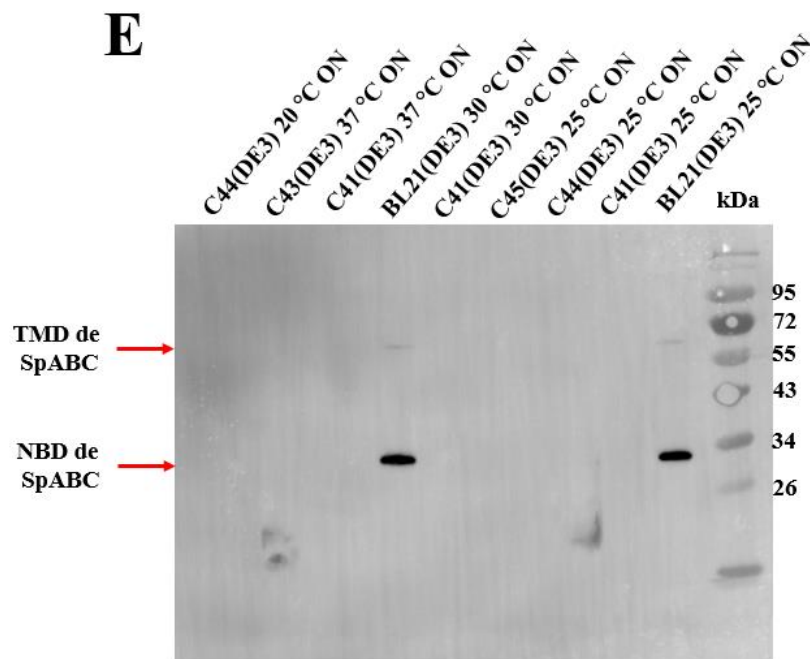
#### 4.1. Expression, Purification et Fonctionnalité de SpABC dans les souches d'*E. coli*

##### 4.1.1. Tests d'expression de SpABC dans les souches BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), C44(DE3) et C45(DE3)

L'expression du transporteur SpABC a été testée dans différents souches d'*E. coli* : BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), C44(DE3) et C45(DE3). Ces tests d'expression ont été réalisés en variant les températures (20, 25, 30 et 37 °C) et les temps d'induction (4 h et toute la nuit (ON)). L'expression du transporteur SpABC a été vérifiée sur chaque lysat bactérien après dépôt et migration sur gel SDS-PAGE (**Figure 71 A, B, C et D**). On observe sur la majorité des puits que le profil de migration est similaire à celui des lysats bactériens avant l'induction à l'IPTG, montrant ainsi que dans ces conditions, le transporteur SpABC n'est pas surexprimé. Toutefois, au niveau des puits contenant les lysats de BL21(DE3) (25 et 30 °C ON), C41(DE3) (25, 30 et 37 °C ON), C43(DE3) (37 °C ON), C44(DE3) (20 et 25 °C ON), C45(DE3) (25 °C), on observe une bande intense à ~ 30 kDa pouvant correspondre au NBD du transporteur SpABC dont la taille avec l'étiquette poly-histidine est de 29 kDa.

Pour être sûr que les bandes intenses observées correspondent aux protéines désirées, les lysats bactériens ont été utilisés pour effectuer un Western blot qui a été révélé grâce à un anticorps dirigé contre les étiquettes 6-histidine fusionnées au niveau du TMD et du NBD du transporteur (**Figure 71 E**). On observe que seuls les puits contenant les lysats des bactéries BL21(DE3) présentent deux bandes correspondant au TMD (76 kDa en taille théorique avec l'étiquette poly-histidine) et au NBD (29 kDa en taille théorique avec l'étiquette poly-histidine).

**A****B****C****D**



**Figure 71 : Tests d'expression de SpABC dans les souches d'*E. coli* BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), C44(DE3) et C45(DE3)** (Di Cesare et al. Methods Mol. Biol., sous presse)

- A. SDS-PAGE des lysats des souches d'*E. coli* induit à 20 °C.
- B. SDS-PAGE des lysats des souches d' *E. coli* induit à 25 °C.
- C. SDS-PAGE des lysats des souches d' *E. coli* induit à 30 °C.
- D. SDS-PAGE des lysats des souches d'*E. coli* induit à 37 °C.
- E. Analyse par Western blot de la surexpression de SpABC dans les lysats des souches d' *E. coli*

Un volume 16  $\mu$ L de lysat bactérien ajusté à une DO de 0,1 a été déposé dans chaque puits correspondant.

Les flèches rouges indiquent la localisation des composants du transporteur SpABC (TMD ou NBD).

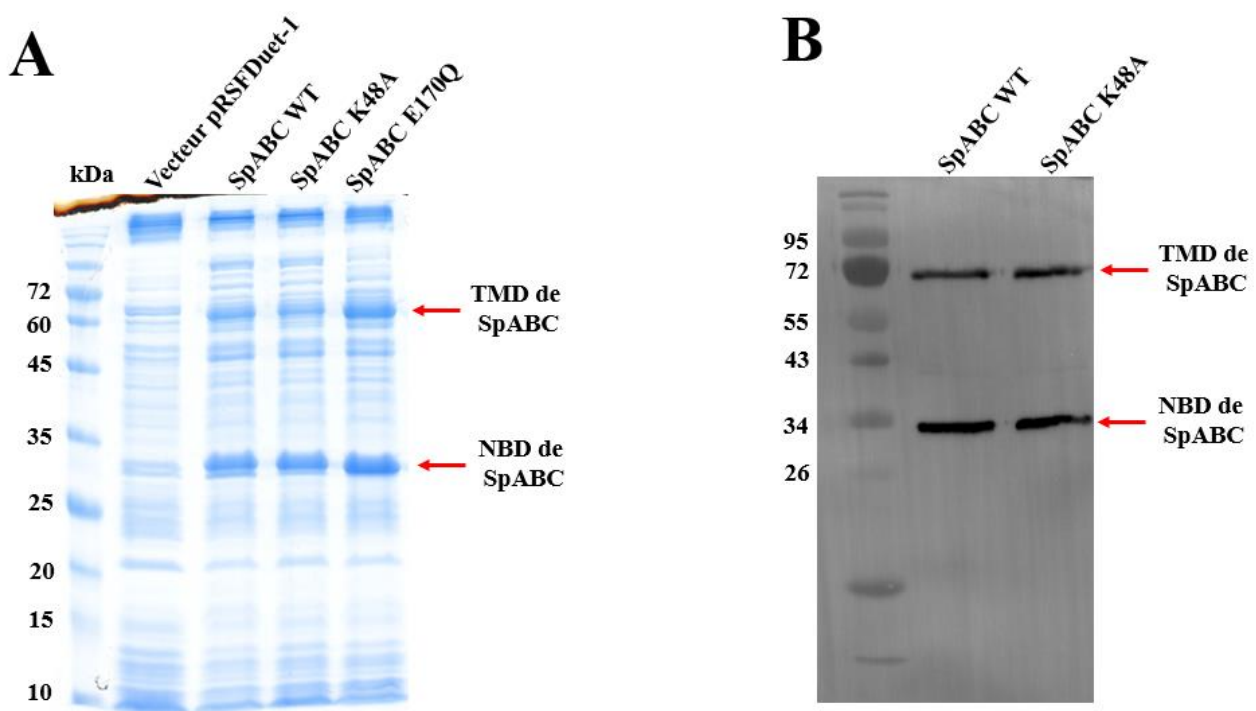
Parmi toutes les souches d'*E. coli* testées, seule la souche BL21(DE3) surexprime le transporteur SpABC. Pour des études fonctionnelles futures, la condition regroupant la souche BL21(DE3) induite à 25 °C pendant toute une nuit a été retenue. Ce choix a été fait parce qu'après l'induction, la température joue un rôle important dans le niveau d'expression et le repliement de la protéine. En effet, pour un meilleur repliement des protéines, une température d'induction basse comprise entre 18 et 25 °C est souvent utilisée.

#### 4.1.2. Expression du transporteur SpABC dans la souche BL21(DE3)

Après avoir déterminé les conditions optimales pour surexprimer SpABC dans *E. coli*, elles ont été utilisées pour produire le transporteur en grande quantité. L'expression de la protéine sauvage, de la protéine mutée au niveau de la lysine conservée du NBD (K48A) et de la protéine mutée au niveau du glutamate catalytique du NBD (E170Q) a été directement vérifiée sur la fraction

membranaire isolée après dépôt et migration sur un gel SDS-PAGE puis par des analyses en Western blot. Le transporteurs SpABC K48A et SpABC E170Q sont des transporteurs théoriquement incapables d'hydrolyser l'ATP.

On observe deux bandes intenses dans les puits de SpABC WT et SpABC K48A (**Figure 72 A**). La 1<sup>ère</sup> bande située ~ 70 kDa est composée de TMDs et la 2<sup>ème</sup> bande située ~ 30 kDa correspond aux NBDs. Ces deux bandes surexprimées sont absentes du contrôle correspondant aux membranes des bactéries transformées avec le vecteur pRSFDuet-1 vide. Pour confirmer que les deux bandes intenses que l'on observe sur le gel SDS-PAGE représentent bien les domaines de SpABC, une analyse par Western blot a été réalisée en utilisant la fraction membranaire. La révélation de la membrane grâce à un anticorps anti-his-tag couplé à la peroxydase montre deux bandes situées à hauteur de la bande de 72 kDa (TMD) et en dessous de la bande de 34 kDa (NBD) (**Figure 72 B**). Ces observations montrent que le transporteur SpABC est bien surexprimée dans la souche BL21(DE3) et que la protéine est bien adressée à la membrane bactérienne.



**Figure 72 : Surexpression de SpABC WT et mutants dans la souche BL21(DE3) d'*E. coli***

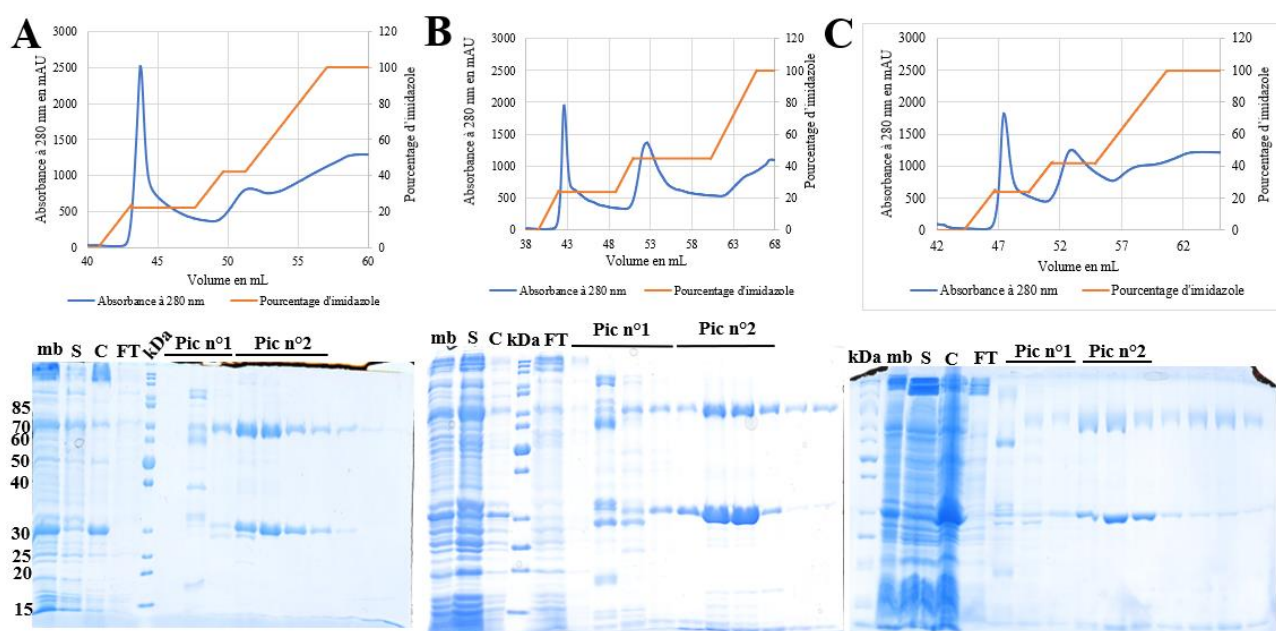
(Di Cesare et al. Methods Mol. Biol., sous presse)

- A.** SDS-PAGE de la fraction membranaire de la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. 20 µg de protéines totales ont été déposées.
- B.** Analyse par Western blot de la fraction membranaire de la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. 2 µg de protéines totales ont été déposées.



### 4.1.3. Solubilisation et Purification du transporteur SpABC avec différents détergents

Dans le but d'étudier la fonctionnalité du transporteur SpABC, les vésicules de membranes enrichies en SpABC WT ont été solubilisées à l'aide de détergents doux tels que le LMNG, le DDM et l'UDM. Puis, la fraction solubilisée a été injectée sur une colonne Ni-NTA pour purifier la protéine d'intérêt grâce à l'affinité de son étiquette poly-histidine pour le nickel. On observe sur la **Figure 73** que les trois détergents utilisés peuvent solubiliser le transporteur SpABC ; toutefois une proportion importante des NBDs se retrouve dans la fraction non solubilisée. Les chromatogrammes obtenus après chaque purification présentent des profils similaires entre les détergents utilisés, avec la présence de deux pics d'élution. Le 1<sup>er</sup> pic élimine une partie des contaminants et une petite partie du transporteur SpABC. Le 2<sup>ème</sup> pic, élué à des concentrations d'imidazole comprises entre 220 et 240 mM, contient majoritairement la protéine d'intérêt. Le TMD et le NBD du transporteur sont élués en même temps. On observe aussi que le transporteur SpABC s'accroche relativement bien à la résine car on ne le retrouve pas dans les puits contenant les flow through. Le transporteur SpABC K48A a aussi été purifié dans les mêmes conditions que le transporteur sauvage. Les chromatogrammes de la protéine mutée sont similaires à ceux de SpABC WT selon le détergent utilisé.



### Figure 73 : Solubilisation et Purification du transporteur SpABC WT en LMNG, DDM et UDM

- A. Profil d'élution (en haut) et gel SDS-PAGE (en bas) de la solubilisation et purification de SpABC WT en LMNG
- B. Profil d'élution (en haut) et gel SDS-PAGE (en bas) de la solubilisation et purification de SpABC WT en DDM
- C. Profil d'élution (en haut) et gel SDS-PAGE (en bas) de la solubilisation et purification de SpABC WT en UDM

Sur les profils d'élution, la courbe bleue représente l'absorbance à 280 nm et la courbe orange représente le pourcentage d'imidazole utilisé.

mb : membranes ; S : surnageant (fraction solubilisée) ; C : culot (fraction non solubilisée) ; FT : Flow Through (fraction non retenue par la colonne)

Les rendements de purification avec les différents détergents ont été évalués. On observe un meilleur rendement avec le DDM (**Tableau 29**).

	LMNG	DDM	UDM
Rendement en mg/L de culture	1,5	2,4	1,8

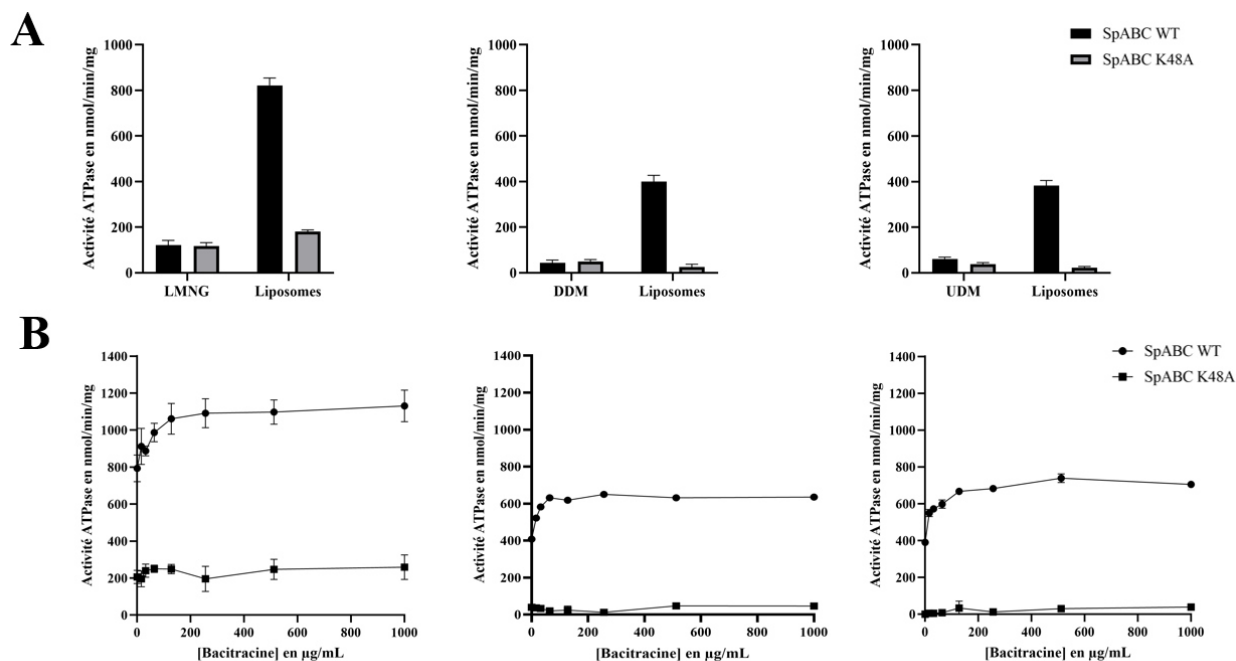
**Tableau 29 : Rendement de purification de SpABC en fonction des détergents utilisés**

Cependant, obtenir un meilleur rendement de purification n'est pas le gage que la protéine purifiée obtenue sera fonctionnelle (Mathieu et al. 2019).

#### 4.1.4. Activité ATPase du transporteur SpABC purifié avec différents détergents

La plupart des transporteurs ABC sont capables de présenter une activité ATPase basale mesurable. Cette caractéristique est alors utilisée afin de quantifier l'activité ATPase basale du transporteur SpABC après la purification. Les activités ATPases des transporteurs SpABC WT et K48A purifiés ont été mesurées en détergents ou après leurs reconstitutions en protéoliposomes avec des lipides totaux d'*E. coli*.

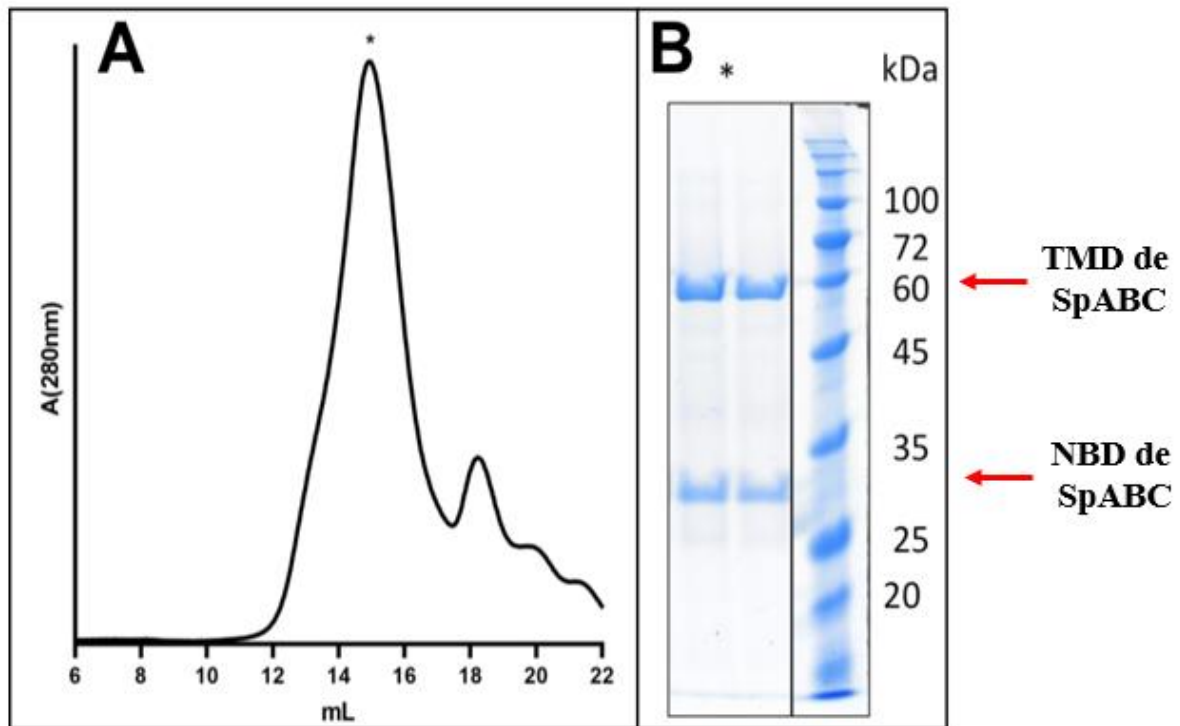
SpABC WT et SpABC K48A présentent des activités ATPases similaires en détergents (**Figure 74 A**). En UDM et en DDM, ces deux transporteurs présentent des activités ATPases d'environ 40 à 60 nmol/min/mg alors que les activités en LMNG sont comprises entre 110 et 120 nmol/min/mg. SpABC K48A est un mutant inactif n'ayant pas *a priori* la capacité d'hydrolyser l'ATP, les résultats obtenus suggèrent que l'activité mesurée est celle des contaminants ayant une activité ATPase. Cela indique que le transporteur SpABC ne présente pas d'activité ATPase significative dans ces détergents.



**Figure 74 : Activités ATPases du transporteur SpABC (WT et K48A) en détergents, en protéoliposomes et en présence de PAMs**

- A.** Activité ATPase de SpABC WT en détergent (LMNG, DDM et UDM) et en protéoliposomes
- B.** Activités ATPase des liposomes de SpABC WT et de SpABC K48A en présence de bacitracine selon les détergents utilisés

Ces protéines purifiées ont été par la suite reconstituées en protéoliposomes. Les activités ATPases des liposomes de SpABC WT et SpABC K48A étaient d'environ 800 nmol/min/mg pour les protéines purifiées en LMNG et d'environ 400 nmol/min/mg pour les protéines purifiées en DDM et en UDM (**Figure 74 A**). Le fait d'incorporer ces protéines dans des liposomes a permis d'obtenir des activités ATPases significatives. De ce fait, ces résultats indiquent qu'un environnement lipidique est nécessaire au transporteur SpABC pour permettre son activité ATPase. L'activité des liposomes de SpABC WT purifié en LMNG est deux fois supérieure à celles des liposomes de SpABC WT purifié avec les deux autres détergents. Ces résultats suggèrent que parmi les trois détergents utilisés pour solubiliser et purifier SpABC, le LMNG semble être celui qui conserve mieux l'activité ATPase du transporteur SpABC. De plus, le profil de chromatographie d'exclusion stérique obtenu en présence de LMNG présente un profil homogène du complexe TMD et NBD formant le transporteur SpABC (**Figure 75**), contrairement aux deux autres détergents. Cette expérimentation a été réalisée par le Dr Kerstin Kanonenberg. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'architecturalement, le LMNG avec sa tête polaire et ses deux chaînes aliphatiques ressemble plus aux phospholipides naturels (Breyton et al. 2019).



**Figure 75 : Profil de chromatographie d'exclusion stérique de SpABC purifié en LMNG**

- A. Profil de chromatographie d'exclusion stérique de SpABC purifié en LMNG  
 B. SDS-PAGE du pic d'élution de SpABC

Dans le but de déterminer l'effet des PAMs sur l'activité ATPase de SpABC, des protéoliposomes ont été préparés à partir des transporteurs SpABC WT et K48A purifiés avec LMNG, DDM et UDM. L'activité de ces protéoliposomes a été déterminée en présence de concentrations croissantes de bacitracine (**Figure 74 B**). On observe que la présence de la bacitracine stimule l'activité ATPase du transporteur SpABC WT (**Tableau 30**). Ces résultats suggèrent l'existence d'un site de fixation de ce PAM sur le transporteur SpABC. Ils montrent aussi que la détection des PAMs au niveau du TMD est couplée à l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBDs.

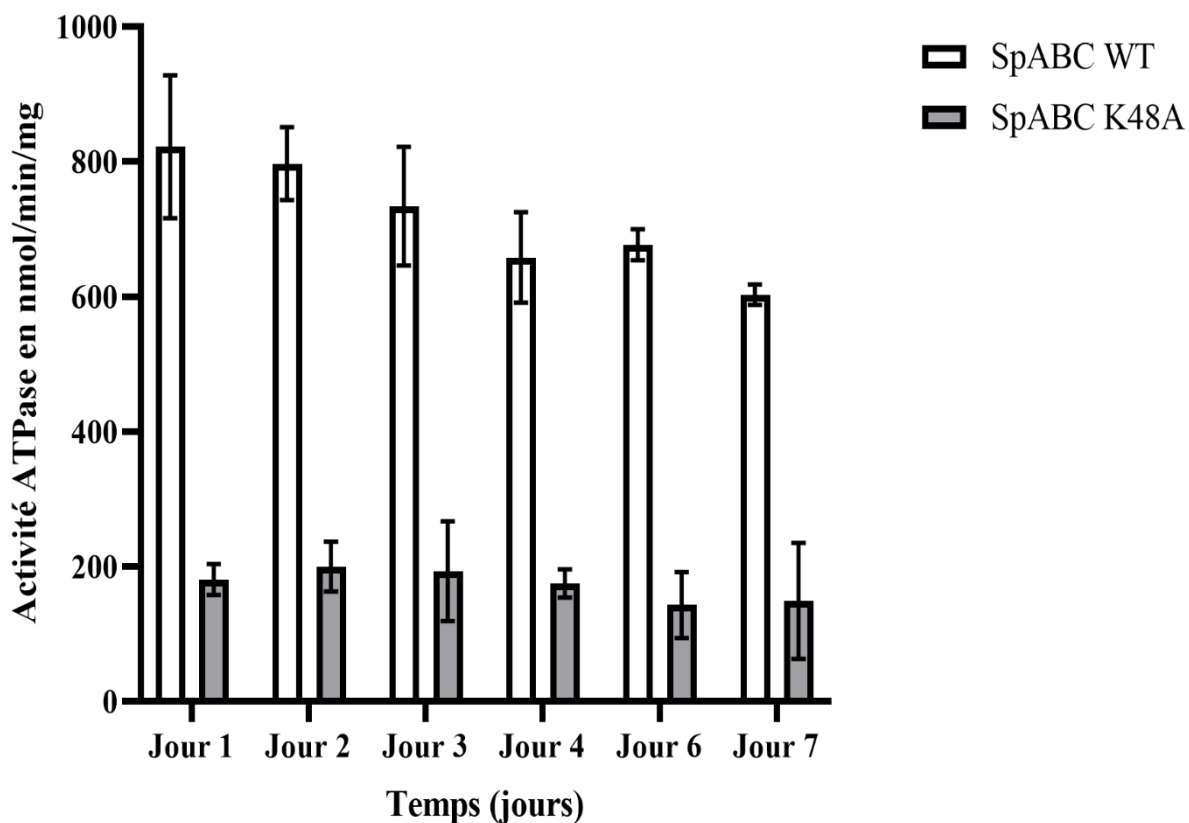
	Bacitracine
Liposomes de SpABC WT purifié en LMNG	Activité ATPase stimulée 1,4 fois
Liposomes de SpABC WT purifié en DDM	Activité ATPase stimulée 1,6 fois
Liposomes de SpABC WT purifié en UDM	Activité ATPase stimulée 1,8 fois

**Tableau 30 : Stimulation de l'activité ATPase des protéoliposomes de SpABC WT en présence de bacitracine**

Lors de la préparation des protéoliposomes, le sens de l'insertion du transporteur ABC n'est pas contrôlé de ce fait, il peut s'insérer dans les deux sens. En principe, seule la moitié des NBDs est

disponible. Cela suggère que l'activité ATPase mesurée avec les protéoliposomes est sous-estimée à condition que les protéoliposomes formés soient étanches dans les conditions expérimentales.

La stabilité des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A purifiés en LMNG a été étudiée au cours du temps (**Figure 76**).



**Figure 76 : Stabilité des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A au cours du temps**

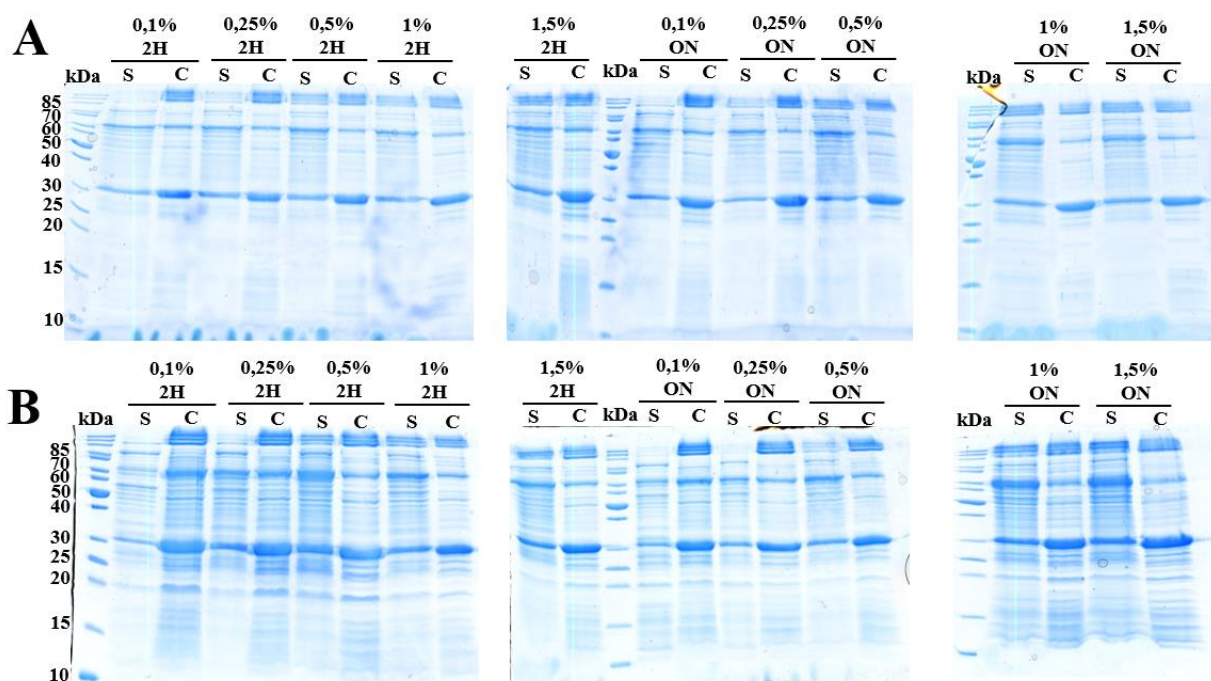
L'activité ATPase de ces protéoliposomes est mesurée le jour de leur préparation (Jour 1) puis tous les jours suivants pendant 7 jours. On observe que durant 6 jours, l'activité ATPase est relativement semblable à celle du Jour 1 qui est prise comme référence. Toutefois le 7<sup>ème</sup> jour, les protéoliposomes de SpABC WT ont perdu 30% de leur activité de référence. Ces protéoliposomes sont stables durant 6 jours avant la baisse de leur activité ATPase.

Après avoir comparé ces trois détergents et montré que le LMNG semblait être celui qui conservait mieux l'activité ATPase, une optimisation des conditions de solubilisation et de purification du transporteur SpABC en LMNG a été effectuée.

## 4.2. Optimisation de l'étude biochimique du transporteur SpABC

### 4.2.1. Optimisation de la solubilisation de SpABC

Plusieurs concentrations de détergent LMNG, deux concentrations de protéines totales (2 et 4 mg/mL) ainsi que deux durées de solubilisation (2H et toute la nuit (ON)) ont été testées pour déterminer les conditions optimales pour extraire et solubiliser le transporteur SpABC. Les fractions solubilisées (S) et insolubles (C) ont été déposées sur un gel SDS-PAGE (**Figure 77**). Quelques conditions se sont avérées satisfaisantes et nous avons choisi celle avec une concentration de protéines de 4 mg/ml, 0,5% de LMNG et 2 h de solubilisation, qui nous paraissait légèrement meilleure. En effet dans la fraction S, le transporteur SpABC est bien plus présent que dans les autres conditions. De plus, l'intensité de la bande du TMD est sensiblement similaire à celle de la bande du NBD. Toutefois, on retrouve encore une importante quantité de NBD dans la fraction non solubilisée.



**Figure 77 : Tests de solubilisation du transporteur SpABC WT en LMNG**

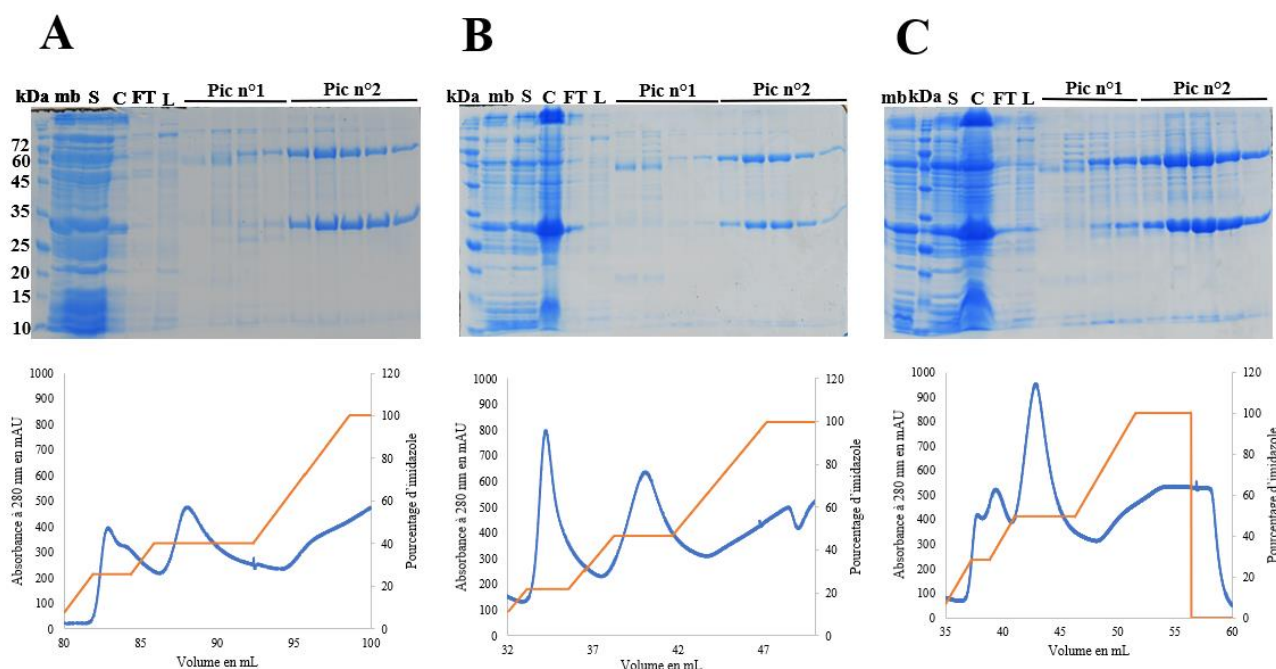
- A.** Visualisation par SDS-PAGE de la solubilisation du transporteur SpABC WT avec une concentration de 2 mg/mL
- B.** Visualisation par SDS-PAGE de la solubilisation du transporteur SpABC WT avec une concentration de 4 mg/mL

S : surnageant (fraction solubilisée) ; C : culot (fraction non solubilisée) ; ON : toute la nuit

#### 4.2.2. Optimisation de la purification du transporteur SpABC

Après avoir optimisé les conditions de solubilisation, certaines étapes de la purification ont été modifiées pour augmenter le rendement de la purification. Pour cela, 20 mM d'imidazole a été rajoutée dans le tampon A lors de l'équilibrage de la colonne pour s'affranchir dès le début de la présence de certains contaminants qui seraient élués avec cette quantité d'imidazole. Des lavages plus longs sont effectués et les tampons de purification ont été changés (voir la section 4.4.2.2.).

Les transporteurs SpABC WT, K48A et E170Q purifiés en LMNG présentent des chromatogrammes similaires avec deux pics d'éluion. Le 2<sup>ème</sup> pic d'éluion contient la protéine d'intérêt (**Figure 78**).



**Figure 78 : Optimisation de la purification des transporteurs SpABC WT, K48A et E170Q en LMNG**

- A.** Purification de SpABC WT avec le gel SDS-PAGE (en haut) et le profil d'éluion (en bas)
- B.** Purification de SpABC K48A avec le gel SDS-PAGE (en haut) et le profil d'éluion (en bas)
- C.** Purification de SpABC E170Q avec le gel SDS-PAGE (en haut) et le profil d'éluion (en bas)

Sur les profils d'éluion, la courbe bleue représente l'absorbance à 280 nm et la courbe orange représente le pourcentage d'imidazole utilisé.

mb : membranes ; S : surnageant (fraction solubilisée) ; C : culot (fraction non solubilisée) ; L : lavage  
 FT : Flow Through (fraction non retenue par la colonne)

Le profil des chromatogrammes ressemble à celui obtenu avant l'optimisation ; toutefois, le rendement de purification est meilleur. En effet, la quantité de protéines purifiées obtenue est nettement supérieure après l'optimisation de la purification (**Tableau 31**).

Cette amélioration du rendement de la purification est le résultat de l'optimisation de la solubilisation ainsi que de la purification d'affinité.

	SpABC WT	SpABC K48A	SpABC E170Q
Rendement de purification en mg/L de culture	6,5	7	10,3

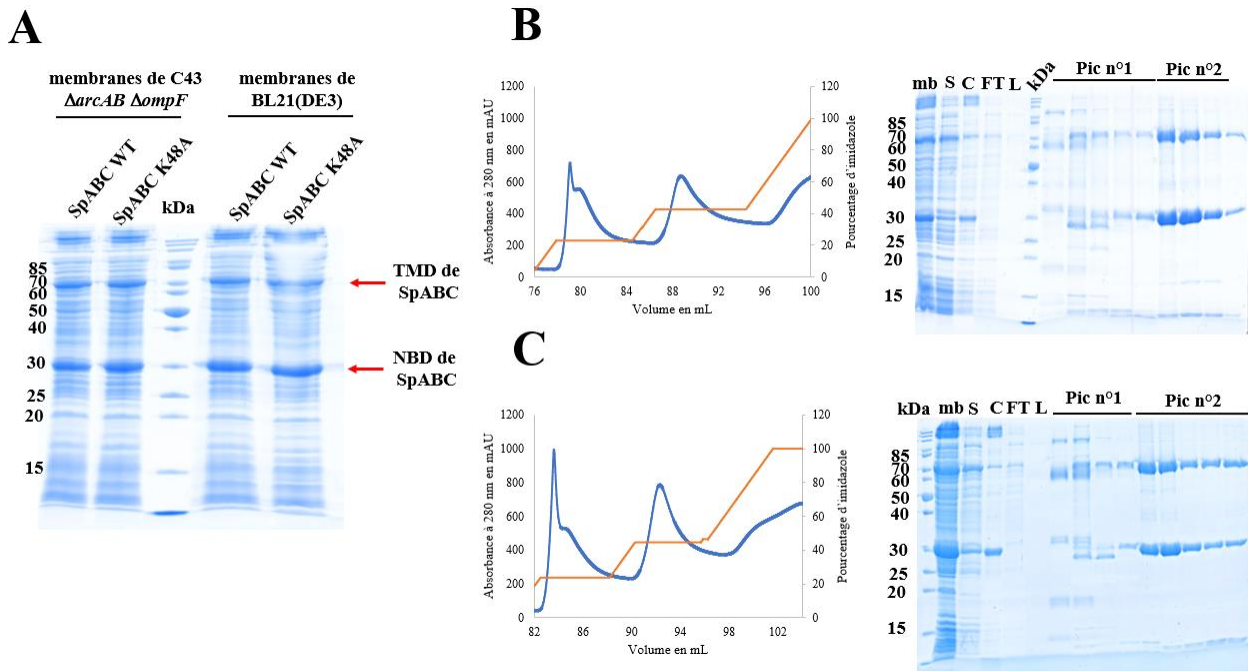
**Tableau 31 : Rendements de purification de SpABC WT, SpABC K48A et SpABC E170Q en LMNG**

#### 4.2.3. Expression et Purification du transporteur SpABC dans la souche C43

##### *ΔacrAB ΔompF*

La souche C43(DE3) *ΔacrAB ΔompF* est une souche d'*E. coli* développée par le laboratoire du Professeur Lutz Schmitt de l'Université Heinrich-Heine-University Dusseldorf en Allemagne. Dans cette souche, deux protéines qui contaminent souvent les fractions membranaires issues de *E. coli* (OmpF, une porine située dans la membrane externe de la bactérie et AcrB, un transporteur faisant partie d'une pompe à efflux tripartite (Wiseman et al. 2014) sont délétées. Cette nouvelle souche présente une composition membranaire modifiée permettant d'augmenter la surexpression ainsi que l'intégration et la stabilité des protéines membranaires (Kanonenberg 2018). Les transporteurs SpABC WT et K48A ont été transformés puis cultivés dans cette souche. Après la purification des vésicules de membranes, la surexpression du transporteur ABC est visualisée sur un gel SDS-PAGE. On observe que le transporteur SpABC est surexprimée dans cette souche et bien adressé à la membrane. Toutefois, cette surexpression n'est pas meilleure que celle obtenue avec la souche BL21 (DE3) (**Figure 79 A**).





**Figure 79 : Surenexpression de SpABC WT et SpABC K48A dans la souche C43(DE3)  $\Delta$ acrAB  $\Delta$ ompF et Purification en LMNG**

- A.** SDS-PAGE des membranes de C43(DE3) ayant surexprimé SpABC WT et SpABC K48A  
**B.** Profil d'élution et SDS-PAGE des fractions de purification de SpABC WT  
**C.** Profil d'élution et SDS-PAGE des fractions de purification de SpABC K48A

mb : membranes ; S : surnageant (fraction solubilisée) ; C : culot (fraction non solubilisée) ; L : lavage  
 FT : Flow Through (fraction non retenue par la colonne)

A la suite de cette surexpression, les transporteurs SpABC WT et SpABC K48A ont été solubilisés avec le détergent LMNG dans les mêmes conditions que précédemment. On observe les mêmes profils d'élution que la purification de SpABC exprimées dans la souche BL21(DE3) (**Figure 79 B et C**). Le 1<sup>er</sup> pic d'élution contient majoritairement des contaminants alors que l'on retrouve le TMD et le NBD de SpABC dans le 2<sup>ème</sup> pic d'élution. Les rendements de ces purifications ont été évalués et les valeurs consignées dans le **Tableau 32** :

	SpABC WT	SpABC K48A
Rendement de purification en mg/L de culture	7	6,5

**Tableau 32 : Rendement de purification en LMNG de SpABC WT et SpABC K48A exprimés dans la souche C43(DE3)  $\Delta$ acrAB  $\Delta$ ompF**

Ces rendements sont très similaires à ceux obtenus après l'optimisation de la purification de SpABC. Ces derniers résultats montrent que l'expression de SpABC dans la souche C43(DE3)  $\DeltaacrAB \DeltaompF$  et la purification sont semblables à celles effectuées dans la souche BL21(DE3).

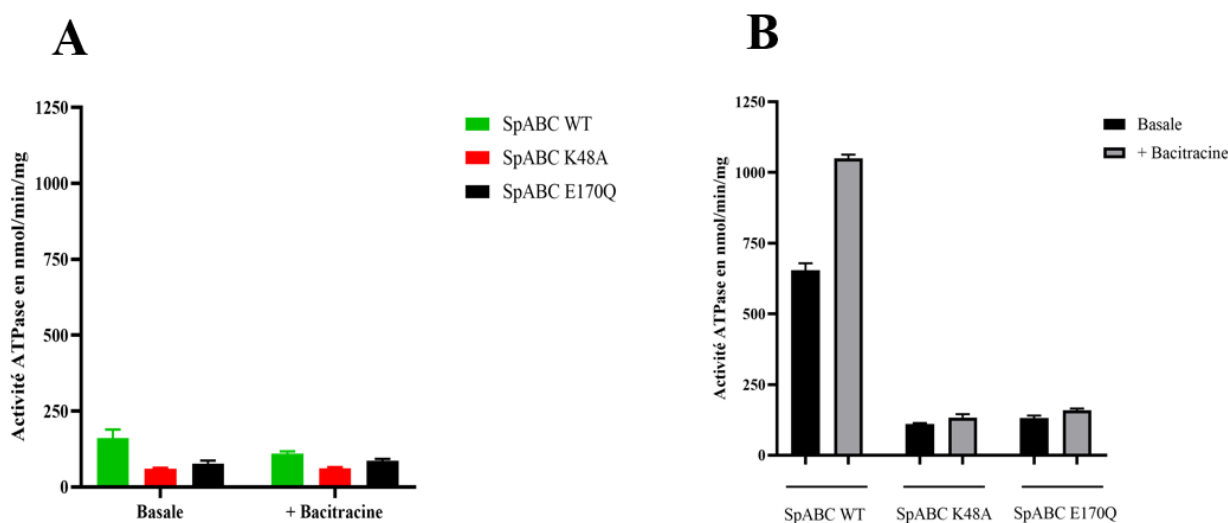
### 4.3. Caractérisation de la fonctionnalité du transporteur SpABC

#### 4.3.1. Activités ATPase et GTPase

Après avoir optimisé la purification du transporteur SpABC, il a fallu valider l'état fonctionnel de la protéine obtenue. Pour cela, des tests d'activité ATPases des transporteurs sauvage et mutés sont effectués en détergent LMNG et après reconstitution en protéoliposomes.

On observe que le transporteur SpABC WT en LMNG présente une activité ATPase faible et comparable celle des transporteurs SpABC K48A et SpABC E170Q qui sont de mutants inactifs (**Figure 80 A**). De plus, en présence de 300  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine, l'activité ATPase de SpABC WT n'est pas stimulée. Lorsque ces transporteurs sont reconstitués en protéoliposomes, SpABC WT présente une activité accrue avoisinant  $\sim 700$  nmol/min/mg qui est stimulée 1,5 fois en présence de bacitracine (1050 nmol/min/mg). Les transporteurs inactifs ne répondent pas à la présence de bacitracine dans le milieu réactionnel (**Figure 80 B**).

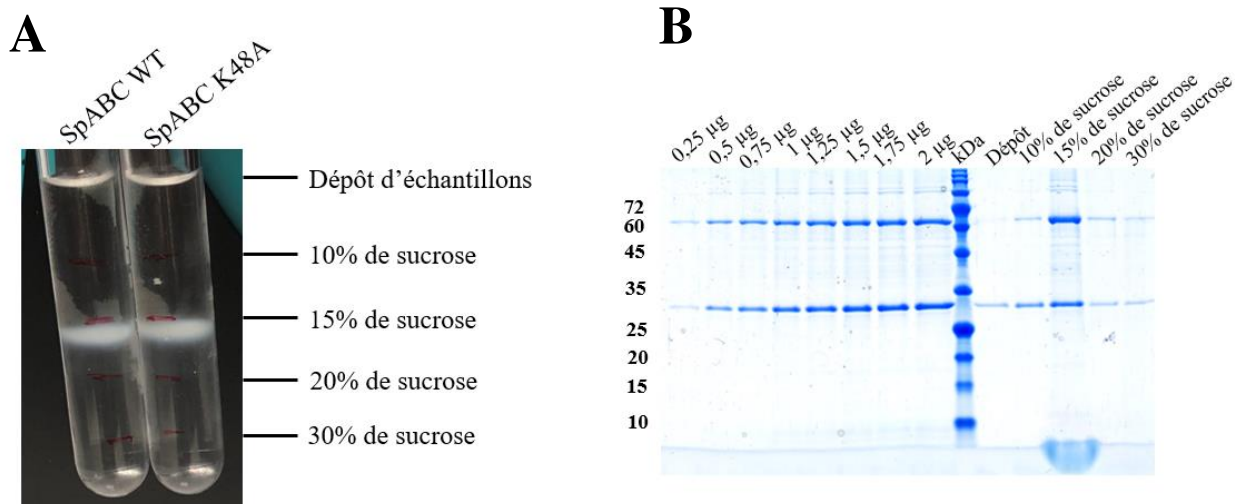
Ces résultats confirment les conclusions précédentes, à savoir que le transporteur SpABC ne présente pas une activité ATPase significative en détergents et qu'il a besoin d'un environnement lipidique pour hydrolyser l'ATP. Toutefois, l'optimisation de la purification du transporteur SpABC n'a pas eu d'incidence sur son activité ATPase.



**Figure 80 : Activité ATPase des transporteurs SpABC WT, K48A et E170 en LMNG et en protéoliposomes**

- A.** Activité ATPase des transporteurs en LMNG en absence et en présence de 300 µg/mL de bacitracine
- B.** Activité ATPase des transporteurs après reconstitution en protéoliposomes en absence et en présence de 300 µg/mL de bacitracine

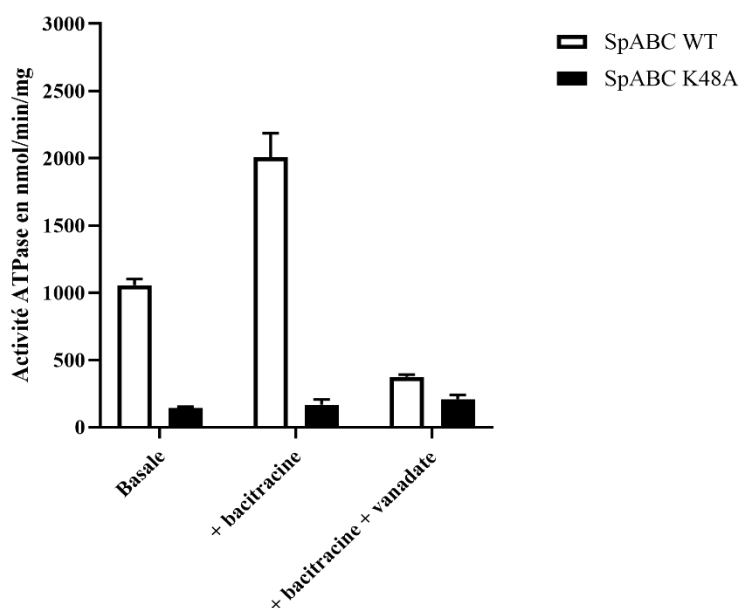
Les protéoliposomes ont été par la suite passés sur un gradient de sucrose pour séparer les liposomes vides de ceux ayant intégré le transporteur SpABC mais aussi enlever les protéines qui se seraient agrégées avant ou pendant le processus de reconstitution. Ce gradient comporte une succession de couches de sucrose allant de la plus concentrée (en bas) à la moins concentrée. Les protéoliposomes sont déposés délicatement à la surface de la couche de 10% de sucrose. Après une ultracentrifugation de 12 h à 200 000 x g, on observe une intense bande blanche située dans la couche à 15% de sucrose pour SpABC WT et SpABC K48A (**Figure 81 A**). Chaque couche est prélevée puis déposée sur un gel SDS-PAGE. On observe que la majorité des protéoliposomes contenant le transporteur SpABC se trouve dans la couche à 15% de sucrose (**Figure 81 B**). Cela confirme l'observation faite sur les photos de gradient de sucrose (**Figure 81 A**). Le gel SDS-PAGE pour le transporteur SpABC K48A est très similaire à celui de SpABC WT. En principe, plus le protéoliposome est dense, plus il migre vers des concentrations de sucrose plus élevées. De ce fait, les protéoliposomes SpABC WT et SpABC K48A présentent des densités similaires.



**Figure 81 : Purification des protéoliposomes par gradient de sucrose**

- A.** Photo du tube de centrifugation contenant le gradient de sucrose et localisation des protéoliposomes
- B.** Visualisation des couches du gradient de sucrose par SDS-PAGE

Après la purification par gradient de sucrose et la quantification protéique par ImageJ, les activités ATPases des protéoliposomes contenant SpABC WT et SpABC K48A sont mesurées dans différentes conditions (**Figure 82**).

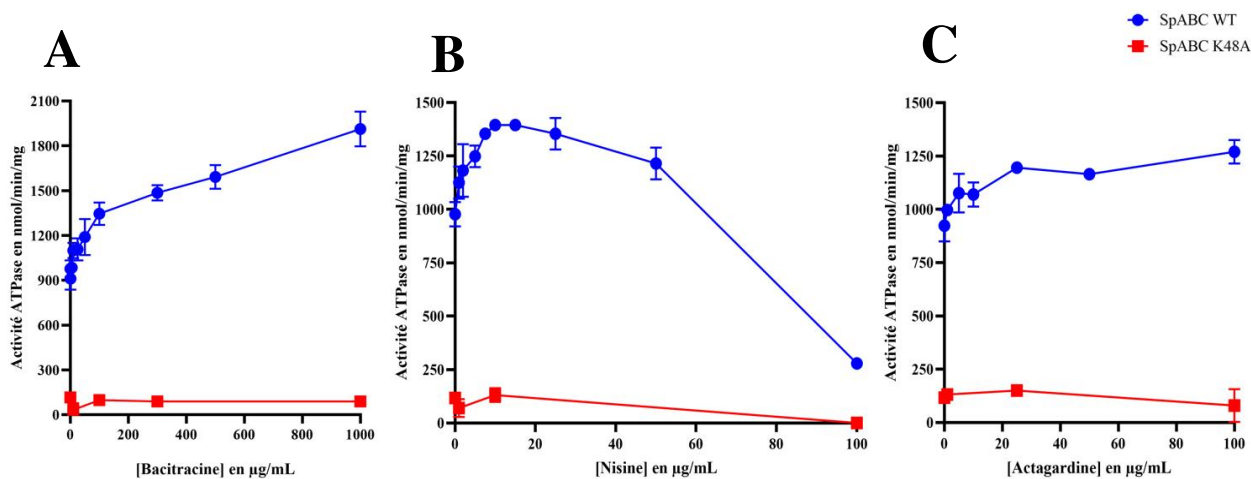


**Figure 82 : Activités ATPases des protéoliposomes SpABC WT et SpABC K48A après purification par gradient de sucrose**

Les activités ATPases basales, en présence de 300  $\mu\text{g/ml}$  de bacitracine et en présence de 100  $\mu\text{M}$  d'orthovanadate ont été mesurées.

On observe que l'activité basale des protéoliposomes de SpABC WT après purification par gradient de sucrose (1055 nmol/min/mg) est supérieure à celle obtenue avant le passage sur un gradient de sucrose (~ 700 à 800 nmol/min/mg). Cette amélioration de l'activité ATPase est vraisemblablement due à la suppression des protéines agrégées qui biaisaient la quantité de protéines actives dans la solution de protéoliposomes avant purification par gradient de sucrose. Lorsqu'ils sont mis en présence de 300  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine, l'activité du transporteur SpABC WT est stimulée d'environ 2 fois alors que celle du mutant inactif n'est pas impactée. L'activité ATPase de ces protéoliposomes a aussi été mesurée en présence de 100  $\mu\text{M}$  d'orthovanadate. Cette molécule prend la place du phosphate inorganique après l'hydrolyse de l'ATP, empêchant ainsi le relargage de l'ADP, ce qui bloque les domaines nucléotidiques du transporteur dans une position fermée, le transporteur ne pouvant plus poursuivre son cycle catalytique. On observe qu'en présence d'orthovanadate, l'activité de SpABC WT est inhibée jusqu'à une valeur de 375 nmol/min/mg alors que l'activité détectée pour SpABC K48A est sensiblement la même que celle mesurée pour les deux autres conditions. Cette expérience avec l'orthovanadate montre que l'activité d'hydrolyse de l'ATP détectée est bien celle de SpABC WT et que l'activité ATPase obtenue pour les protéoliposomes contenant SpABC K48A, le mutant inactif, est très probablement due à de contaminants. Cela apporte un poids supplémentaire aux conclusions faites dans la partie 4.1.4.

Les activités ATPases des protéoliposomes purifiées ont été mesurées en présence de concentrations croissantes de certains PAMs substrats du transporteur SpABC tels que la bacitracine, la nisine et l'actagardine (**Figure 83**), pour lesquels le transporteur SpABC confère une résistance (voir **Tableau 23**).



**Figure 83 : Activités ATPases des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A en présence de PAMs substrats**

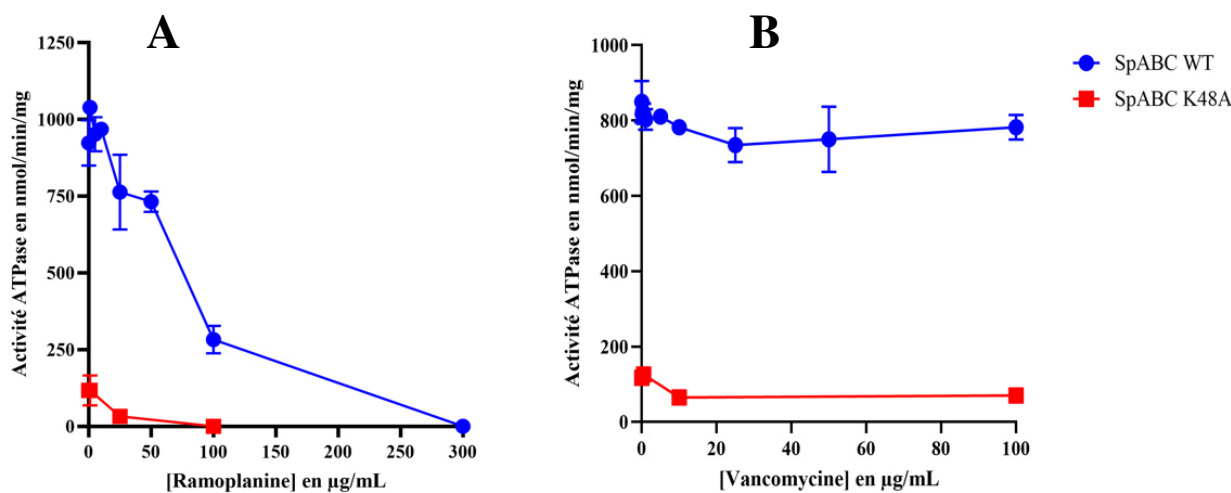
- A. Activité ATPase en présence de bacitracine
- B. Activité ATPase en présence de nisine
- C. Activité ATPase en présence d'actagardine

En présence de bacitracine, l'activité ATPase de SpABC WT est stimulée. Cette stimulation atteint 2 fois avec 1 mg/mL de bacitracine (**Figure 83 A**). L'activité ATPase de SpABC WT en présence de concentrations croissantes de nisine montre deux comportements. L'activité ATPase est stimulée avec des concentrations de nisine comprises en 0 et 15 µg/mL pour atteindre une stimulation de 1,4 fois puis cette activité ATPase est inhibée avec des concentrations de nisine supérieures pour atteindre 279 nmol/min/mg avec 100 µg/mL de nisine (**Figure 83 B**). Il existe certains substrats de transporteurs ABC qui stimulent l'activité ATPase jusqu'à une concentration seuil puis inhibe cette dernière. C'est le cas de la P-glycoprotéine qui présente une activité ATPase stimulée en présence de vérapamil jusqu'à une concentration autour de 20 µM puis cette activité ATPase est inhibée avec des concentrations supérieures du même substrat (Ledwitch et al. 2016). Enfin, l'activité ATPase de SpABC est stimulée de 1,4 en présence de 100 µg/mL d'actagardine (**Figure 83 C**).

Ces résultats montrent que les substrats de SpABC ont un effet stimulateur sur l'activité ATPase du transporteur. C'est en général le cas chez les transporteurs ABC (Linton et Higgins 2007). Cependant cette règle n'est pas unanime car il y a des substrats qui n'ont pas d'impact sur l'activité ATPase de leurs transporteurs ABC. C'est le cas du transporteur Pdr5 qui présente une activité

ATPase assez élevée qui n'est pas stimulée par la présence de ses substrats. De ce fait, il n'y a pas une corrélation entre l'activité de transport et l'hydrolyse de l'ATP. Ce transporteur hydrolyse constamment de l'ATP pour assurer le transport de ses substrats (Ernst et al. 2008). On retrouve la même chose chez le transporteur CDR1p de la levure *Candida albicans* indiquant un absence de couplage entre la fixation des substrats et l'hydrolyse de l'ATP (Prasad et al. 2015). Chez d'autres transporteurs, la stimulation de l'activité ATPase du transporteur en présence de ses substrats est faible. C'est le cas du transporteur BmrA de *B. subtilis* (Steinfels et al. 2004).

Après avoir déterminé l'activité ATPase de SpABC WT en présence de certains de ses substrats, des PAMs pour lesquels SpABC ne confèrent pas de résistance ont été utilisés pour mesurer leurs effets sur l'activité ATPase du transporteur.



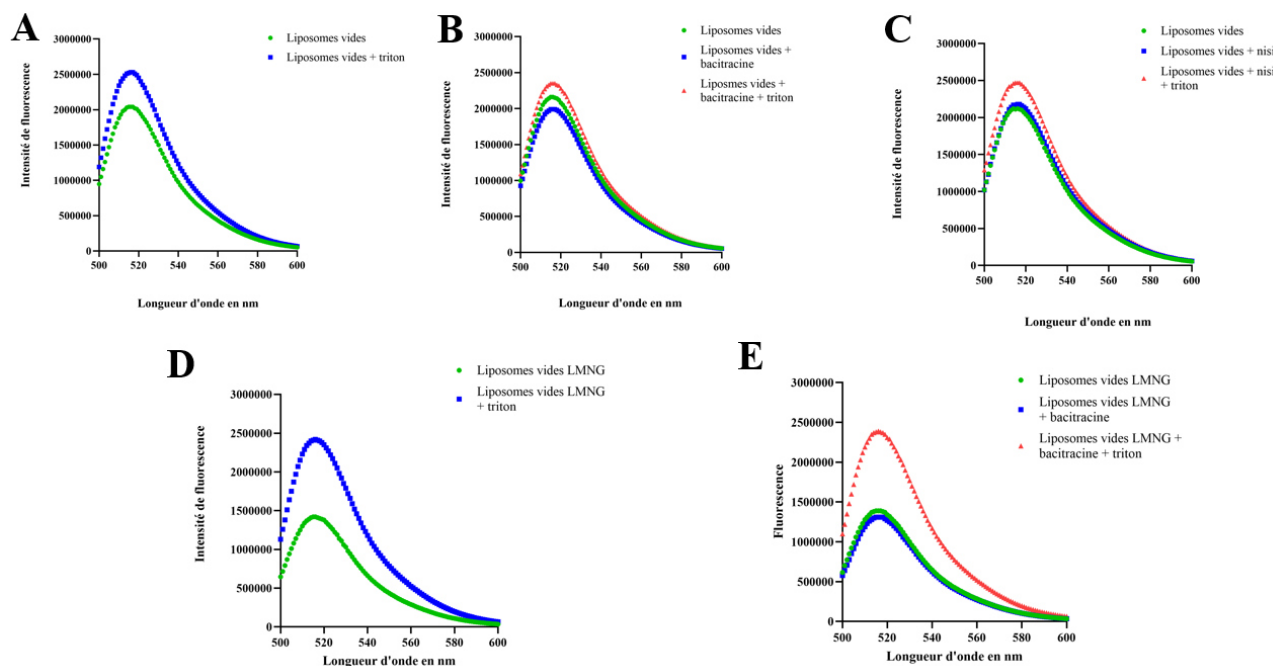
**Figure 84 : Activité ATPase des protéoliposomes de SpABC WT et SpABC K48A en présence de PAMs non transportés**

- A. Activité ATPase en présence de ramoplanine
- B. Activité ATPase en présence de vancomycine

On observe que la présence de la ramoplanine inhibe complètement l'activité ATPase de SpABC WT (**Figure 84 A**). En effet, avec 300 µg/ml de ramoplanine, l'activité ATPase chute à 0 nmol/min/mg. C'est un résultat assez surprenant car ce PAM n'est pas substrat de SpABC. Toutefois, le fait qu'il puisse inhiber l'activité ATPase du transporteur montre que la ramoplanine peut se fixer sur SpABC. En présence de concentrations croissantes de vancomycine, l'activité ATPase de SpABC WT n'est pas sensiblement impactée (**Figure 84 B**).

Comme nous l'avons vu, l'activité du transporteur SpABC est stimulée en présence de ses substrats. Pour être sûr que cette augmentation de l'activité ATPase observée est due à la présence des PAMs substrats et non à une perméabilisation des liposomes par les PAMs qui donne accès aux

NBDs situés à l'intérieur, des tests d'étanchéité des liposomes sont effectués. Pour cela, une molécule fluorescente appelée la 6-carboxyfluorescéine (6-CF) est encapsulée dans les liposomes vides en une grande quantité permettant l'auto-atténuation de la fluorescence à l'intérieur des liposomes (Chen et Knutson 1988). La fluorescence de la 6-CF est suivie dans différentes conditions. Lorsqu'il n'y a pas une perméabilisation des liposomes, la fluorescence n'est pas impactée alors qu'avec la perméabilisation des liposomes, une augmentation de la fluorescence est observée (Weinstein et al., 1986).



**Figure 85 : Test de perméabilité des liposomes par suivi de fluorescence**

- A.** Liposomes vides + 0,5% de triton X-100
- B.** Liposomes vides + 300 µg/mL de bacitracine
- C.** Liposomes vides + 7,5 µg/mL de nisine
- D.** Liposomes vides + LMNG + 0,5% de triton X-100
- E.** Liposomes vides + LMNG + 300 µg/mL de bacitracine

Lorsque les liposomes vides contenant la 6-CF sont mis en présence de 0,5% de triton X-100, on observe une augmentation de la fluorescence dans le milieu réactionnel comparé aux liposomes vides seuls qui traduit la sortie de la molécule fluorescente (**Figure 85 A**). Cela montre que la présence du triton X-100 a déstabilisé l'intégrité des liposomes permettant ainsi à la molécule encapsulée de s'échapper. L'ajout de 300 µg/ml de bacitracine ou de 7,5 µg/mL de nisine dans le milieu réactionnel des liposomes vides n'impacte pas l'intensité de la fluorescence (**Figure 85 B et C**).

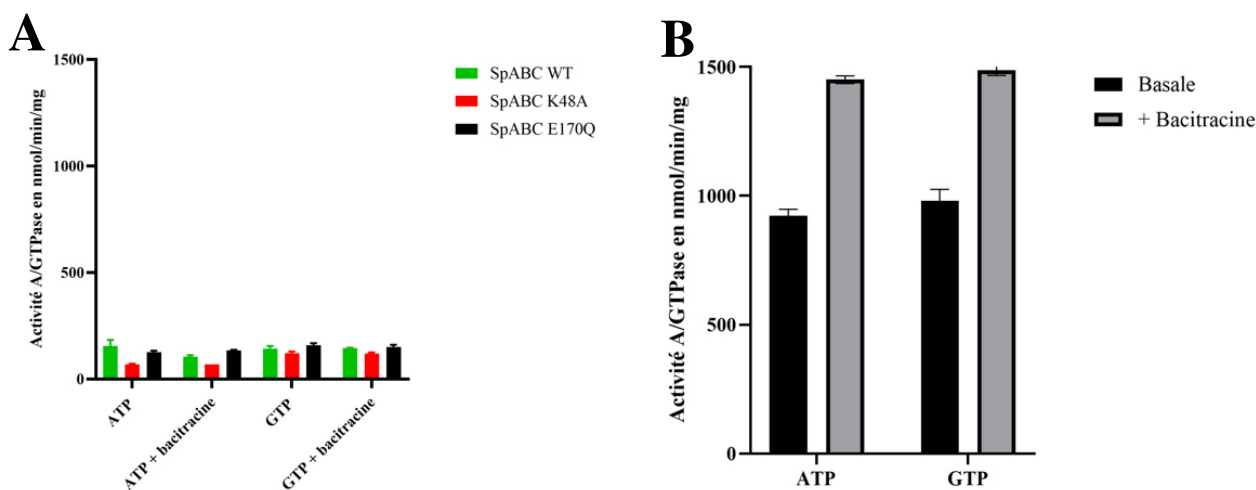
La fluorescence des liposomes vides ayant 0,005% de LMNG (il s'agit de la même quantité de LMNG qui est introduite lorsque l'on ajoute les protéines SpABC purifiées lors de la préparation

des protéoliposomes) est inférieure à celle des liposomes vides sans LMNG suggérant que la présence de ce détergent a déstabilisé les liposomes, conduisant à une perte de la quantité de molécules fluorescentes. Cependant, cette déstabilisation est partielle car l'ajout de 0,5% de triton X-100 induit une importante fuite de la 6-CF traduite par une augmentation de la fluorescence (**Figure 85 D**). La présence de 300  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine ne perméabilise pas les liposomes sachant que la fluorescence des liposomes vides avec LMNG est identique à celle des liposomes vides avec LMNG et bacitracine (**Figure 85 E**).

Ces résultats montrent que les liposomes générés ne sont pas complètement étanches dû à la présence du détergent LMNG. Toutefois, les PAMs utilisés aux concentrations mentionnées ne les perméabilisent pas plus. De ce fait, la stimulation de l'activité ATPase observée est bien due à la fixation des PAMs substrats sur le transporteur ABC.

Il existe chez la bactérie *S. pneumoniae* un transporteur ABC qui hydrolyse préférentiellement le GTP (Orelle et al. 2018). Il s'agit de PatA/PatB connu pour sa capacité à transporter les fluorquinolones, permettant ainsi au pneumocoque de résister à ces antibiotiques. Etant donné que le transporteur SpABC provient du pneumocoque, des questions se sont posées : SpABC hydrolyse-t-il aussi le GTP ? Ce transporteur présente-t-il une préférence au GTP ?

Pour répondre à ces interrogations, des tests d'activités ATPases et GTPases de SpABC en détergent LMNG et après reconstitution en protéoliposomes ont été réalisés en absence et en présence de bacitracine.





### Figure 86 : Activités ATPases et GTPases de SpABC en LMNG et en protéoliposomes

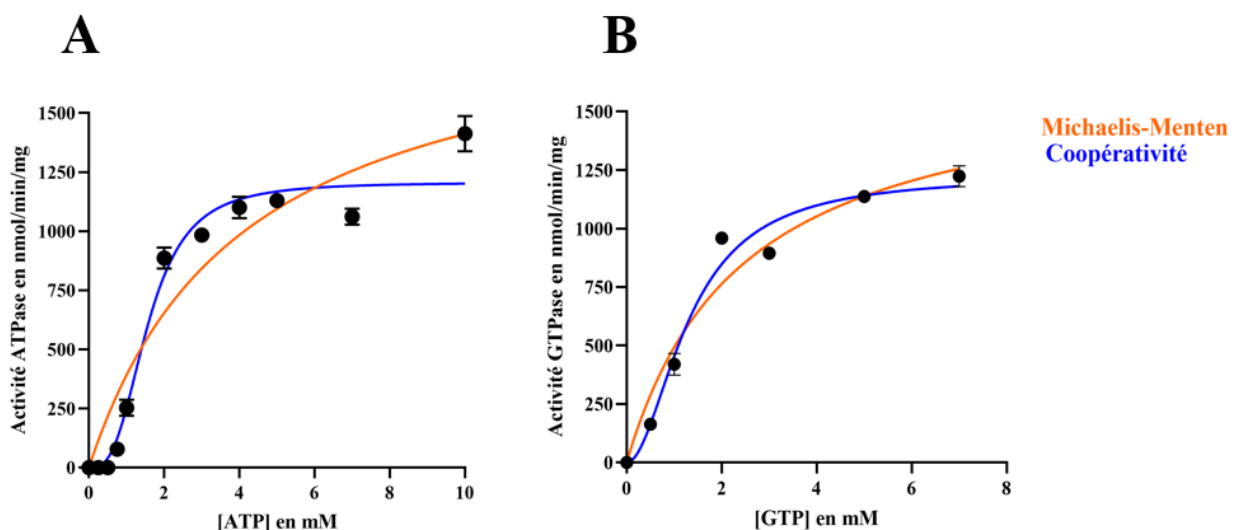
- A. Activités ATPases et GTPases de SpABC WT, K48A et E170Q en détergents, en absence et en présence de 300  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine.
- B. Activités ATPases et GTPases de SpABC WT, K48A et E170Q en protéoliposomes en absence et en présence de 300  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine.

5 mM d'ATP ou de GTP est utilisé pour chaque mesure d'activité. Un contrôle a été réalisé avec le milieu réactionnel et les nucléotides sans les protéines.

On observe que SpABC WT en LMNG présente une activité similaire à celle des mutants inactifs (SpABC K48A et SpABC E170Q) quelque soit le nucléotide utilisé (ATP ou GTP) (**Figure 86 A**). De ce fait, le transporteur SpABC ne présente pas une activité GTPase significative et elle n'est pas stimulée par la bacitracine. Toutefois, lorsque SpABC WT est reconstitué en protéoliposomes, on distingue une activité ATPase basale ( $922 \pm 26$  nmol/min/mg) et une activité GTPase basale ( $980 \pm 45$  nmol/min/mg) qui sont très similaires (**Figure 86 B**). De plus, en présence de 300  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine, les activités ATPase et GTPase de SpABC WT en protéoliposomes sont stimulées toutes les deux de 1,6 fois.

Ces résultats montrent que le transporteur SpABC hydrolyse aussi bien l'ATP que le GTP mais ne présente pas de préférence marquée pour l'un ou pour l'autre.

Pour étudier le comportement du transporteur SpABC en présence d'ATP ou de GTP, des tests d'activités ATPase (**Figure 87 A**) et GTPase (**Figure 87 B**) en fonction de la concentration de nucléotides sont réalisés sur les protéoliposomes.



### **Figure 87 : Mesure des activités ATPase et GTPase des protéoliposomes de SpABC WT suivant la concentration de nucléotides utilisée**

- A.** Activité ATPase en fonction de la concentration d'ATP
- B.** Activité GTPase en fonction de la concentration de GTP

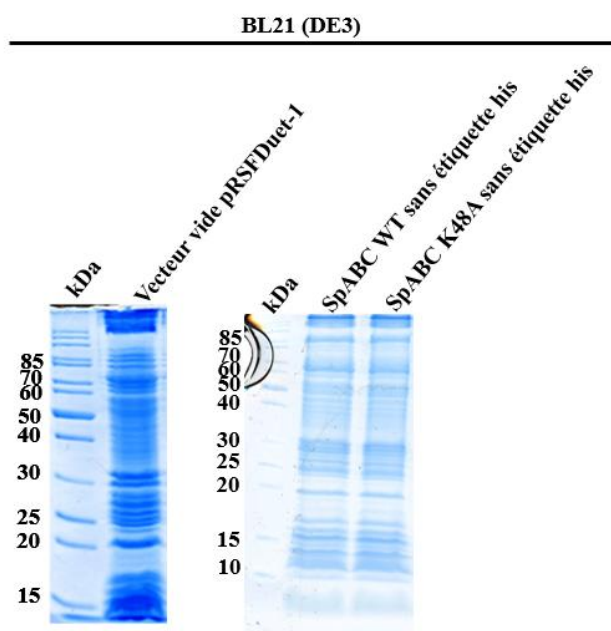
L'activité ATPase présente une vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de 1206 nmol/min/mg alors que l'activité GTPase affiche une  $V_{max}$  de 1229 nmol/min/mg. Ces deux vitesses maximales étant sensiblement similaires, cette donnée confirme le fait que le transporteur SpABC n'a pas de préférence entre l'ATP et le GTP quelque soit la concentration de nucléotides utilisée. Les  $K_m$  (constante de Michaelis) sont équivalents avec 1,6 mM pour l'activité ATPase et 1,7 mM pour l'activité GTPase. SpABC affiche la même affinité pour l'ATP et le GTP. On observe une coopérativité positive pour les deux nucléotides. Toutefois, celle de l'ATP avec une constante de Hill  $h = 2,9$  est plus marquée que celle du GTP avec  $h = 1,9$ . Cette coopérativité positive pourrait indiquer que la fixation du premier nucléotide facilite la fixation du deuxième.

#### 4.3.2. Activité de transport

Pour qu'un transporteur ABC soit jugé pleinement fonctionnel, il faudrait qu'il présente une activité de transport de substrats. Des expériences ont d'abord été effectuées pour déterminer l'activité de transport de SpABC. Pour cela, des vésicules de membranes inversées enrichies en SpABC WT et SpABC K48A munies de leurs étiquettes histidine sont utilisées. Ces vésicules de membranes inversées ont été obtenues en cassant les bactéries au Microfluidizer® où les forces de cisaillements dues à la différence de vitesse dans l'échantillon lysent les bactéries à une pression de 18000 psi. Grâce à cette haute pression, les membranes éclatées vont se recirculariser majoritairement en sens inverse. Dans ces vésicules, les NBDs situés à l'extérieur sont accessibles à l'ATP. L'activité du transport a été déterminée par la mesure de la fluorescence de molécules transportées comme la 7-AAD qui est un peptide fluorescent. Parce que les PAMs sont rarement fluorescents, la 7AAD a été utilisée. Il n'y avait pas de transport de la 7-AAD médiée par SpABC WT car le profil de la fluorescence du transport sauvage était identique à celui du transporteur inactif. De ces résultats, des hypothèses ont été émises :

- Le transporteur n'est pas fonctionnel pour le transport. Toutefois, il a une activité ATPase stimulable par ses substrats. De ce fait, cette absence de transport peut être due à la présence des étiquettes poly-histidine qui pourraient gêner la translocation de la molécule.
- Il n'y a pas une activité de transport détectable chez la protéine sauvage car la 7-AAD n'est pas un substrat donc il n'est pas transloqué.

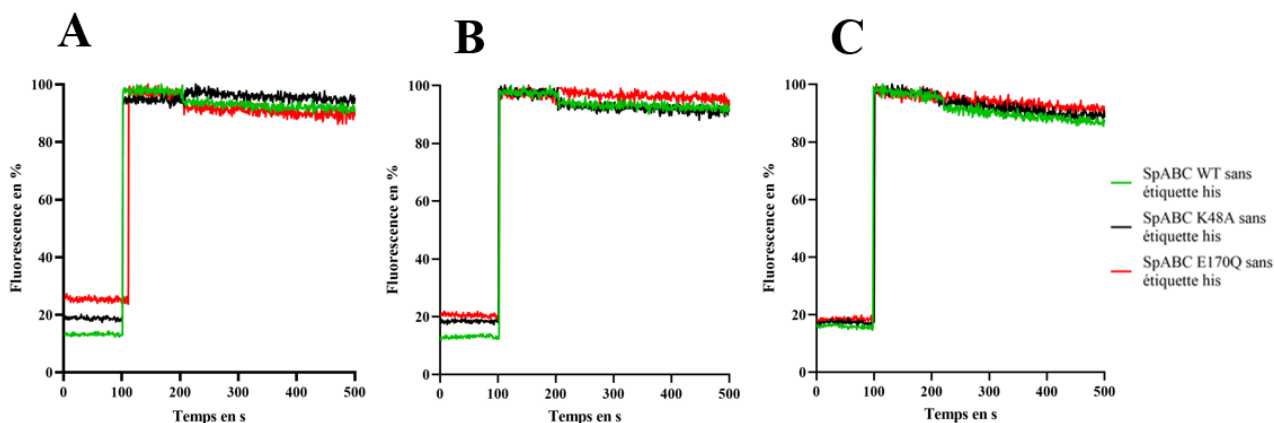
- Le transporteur ne transporte pas car c'est un mécanotransmetteur comme le transporteur MacB (Crow et al. 2017), et protège la cellule en dissociant les complexes AMPs/UPP ou lipide II (Kobras et al. 2020)



**Figure 88 : Expression de SpABC WT et SpABC K48A sans étiquette poly-histidine dans la souche BL21(DE3)**

Pour apporter une réponse à la 1<sup>ère</sup> hypothèse, les étiquettes poly-histidine ont été enlevées par biologie moléculaire des transporteurs SpABC WT et SpABC K48A. Puis, ces nouvelles constructions ont été transformées dans des bactéries BL21(DE3) pour surexprimer les protéines d'intérêt sans leurs étiquettes. Après isolation, les vésicules de membranes inversées ont été déposées sur un gel SDS-PAGE pour vérifier l'expression de SpABC WT et SpABC K48A. On observe sur la **Figure 88** que les protéines d'intérêt ne semblent pas être surexprimées.

Malgré ces résultats, les tests de transports ont été réalisés en présence de 7-AAD avec 3 températures différentes dans le but de voir si l'une d'elles favorise le transport (**Figure 89**).



**Figure 89 : Tests de transport de SpABC WT et SpABC K48A sans étiquette histidine réalisé avec différentes températures**

- A. Transport effectué à 25 °C
- B. Transport effectué à 30 °C
- C. Transport effectué à 37 °C

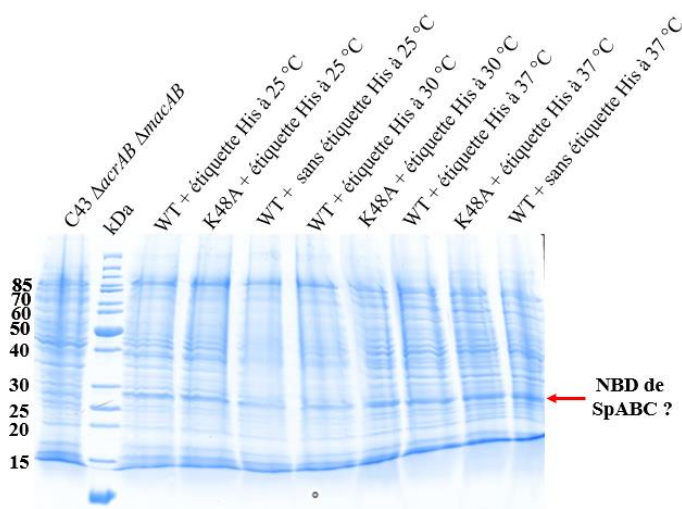
On observe pour les 3 températures testées que le transporteur sauvage ne présente pas de transport de 7-AAD car le profil de fluorescence est le même que celui du mutant inactif. Ce résultat suggère que les protéines d'intérêt ne sont pas suffisamment exprimées, rejoignant les observations faites sur la **Figure 88**.

Dans le but de détecter un transport médié par SpABC, une autre stratégie a été établie. La souche C43  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB*, une souche d'*E. coli*, a la particularité d'être sensible à la bacitracine alors qu'en principe *E. coli* ne fait pas partie du spectre d'action de ce PAM (Crow et al. 2017). La résistance de cette souche, transformée avec les transporteurs SpABC WT et K48A munies ou non d'étiquette poly-histidine à la bacitracine a été étudiée. Les tests de résistance ont été réalisés avec des températures d'incubation différentes (25, 30 et 37 °C). Après 15 h d'incubation, la CMI a pu être déterminée. On observe que toutes les souches utilisées dans cette expérience meurent à une concentration en bacitracine de 0,31 mg/mL (**Tableau 33**). Cette CMI est celle de la souche C43  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB* seule sans transformation. Ces résultats montrent que soit les protéines ne sont pas exprimées dans cette souche soit elles ne permettent pas de résistance dans ce système hôte.

CMI en mg/mL		25 °C	30 °C	37 °C
	C43 $\Delta$ <i>acrAB</i> $\Delta$ <i>macAB</i>	0,31		
	SpABC WT + étiquette histidine			
	SpABC K48A + étiquette histidine			
	SpABC WT + sans étiquette histidine			
	SpABC K48A + sans étiquette histidine			

**Tableau 33 : CMI de la bacitracine contre la souche C43(DE3)  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB***

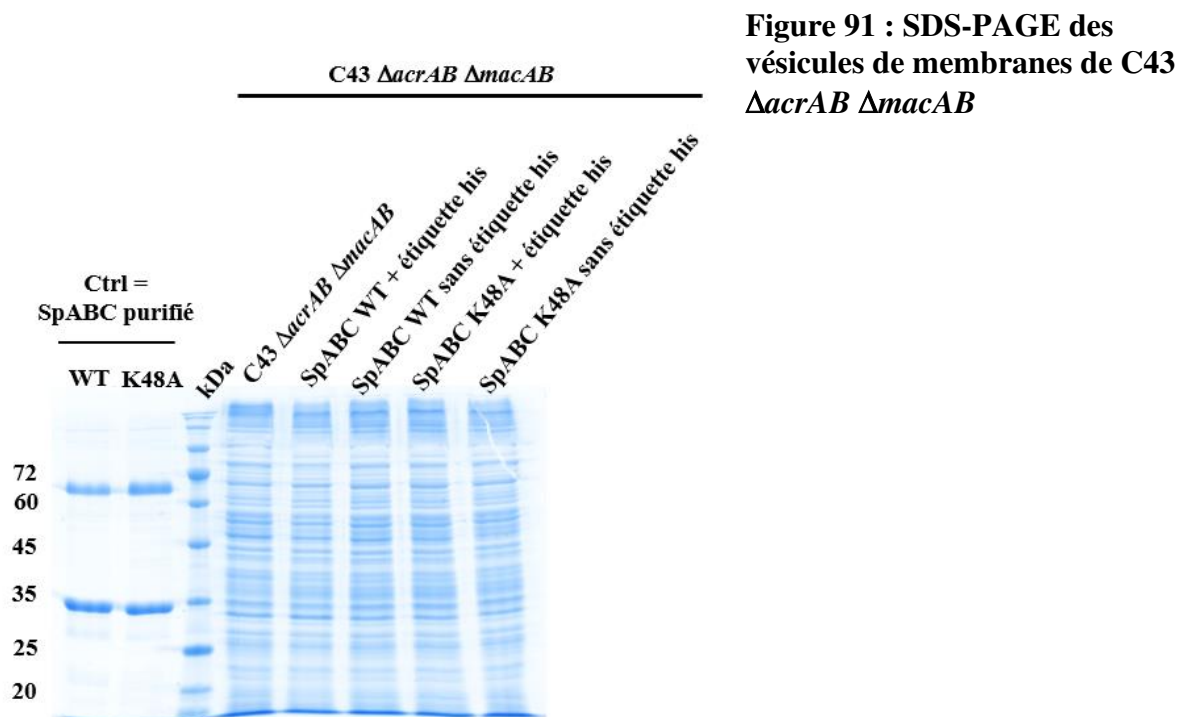
Pour éclaircir cette conclusion, les cellules sont récupérées après l'incubation puis chargées sur un gel SDS-PAGE (**Figure 90**). On observe dans toutes les souches C43  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB* transformées un profil de migration similaire. On remarque l'apparition d'une bande aux alentours de 30 kDa et est absente de la souche C43  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB* non transformée. Cette bande pourrait correspondre au NBD de SpABC montrant que le transporteur est bien exprimé mais ne permet pas de résistance.



**Figure 90 : SDS-PAGE des cellules entière de C43(DE3)  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB* après les tests de résistance à la bacitracine**

A la suite de cette expérience, la même souche est utilisée pour exprimer le transporteur SpABC avec et sans étiquette histidine. Lors de cette expression, l'induction à 25 °C durant toute la nuit a été utilisée. Après avoir isolé les vésicules de membranes, ces dernières sont déposées sur un gel SDS-PAGE. Des membranes de BL21 (DE3) surexprimant le transporteur SpABC sont utilisés

comme témoin positif. On observe sur la **Figure 91** que le transporteur SpABC avec et sans étiquette poly-histidine n'est pas surexprimée dans la membrane de la souche C43  $\Delta$ *acrAB*  $\Delta$ *macAB*.



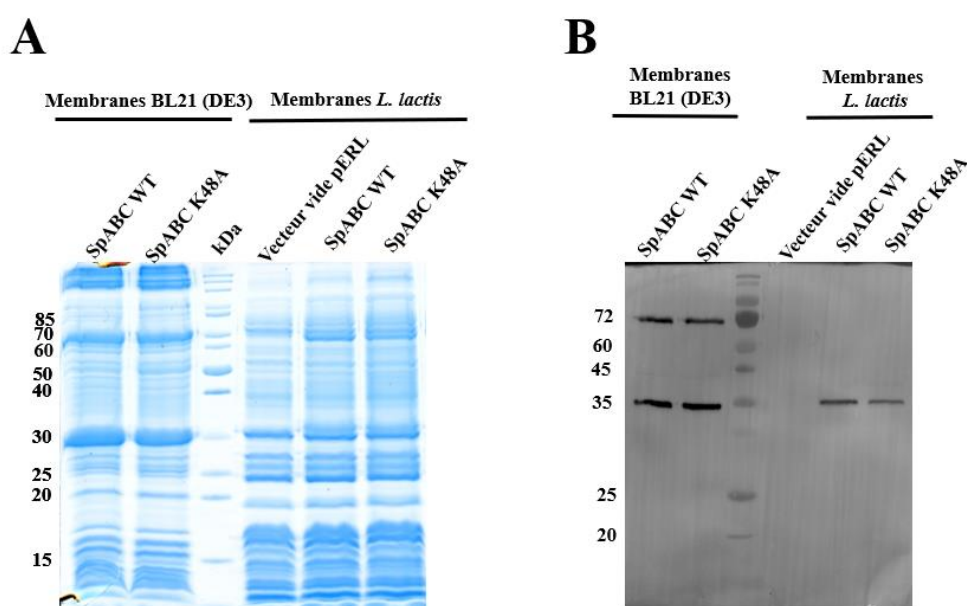
A ce jour, nous n'avons pas encore montré l'activité de transport de SpABC dans un système hétérologue. Toutefois, une étude récente a suggéré que les transporteurs de la sous-famille des BceAB dont fait partie SpABC pourraient ne pas fonctionner comme un transporteur « normal » en transloquant les substrats à travers une membrane mais comme un protecteur des cibles des PAMs (Kobras et al. 2020).

#### 4.4. Expression et Fonctionnalité de SpABC dans *L. lactis*

##### 4.4.1. Expression de SpABC dans *L. lactis*

SpABC provient de *S. pneumoniae* qui est une bactérie Gram positif. Toutefois, l'étude biochimique de ce transporteur a été réalisée dans des souches d'*E. coli* une bactérie à Gram négatif. Cependant la composition des membranes du pneumocoque est différente de celle d'*E. coli*. En effet *S. pneumoniae* se compose de 50% de phosphatidylglycérol et de 50% cardiolipine alors qu' *E. coli* se compose majoritairement de 80% de phosphatidyléthanolamine et de 15% de phosphatidylglycérol (Epanand et al., 2007). Cette différence peut jouer un rôle dans la fonctionnalité du transporteur car la composition en lipides de la membrane est un facteur clé.

Pour s'affranchir de cette différence, une souche de *L. lactis*, une bactérie à Gram positif comme le pneumocoque est utilisée pour surexprimer les transporteurs SpABC WT et SpABC K48A. On observe sur la **Figure 92 A** la présence des deux bandes ayant la même taille que le TMD et le NBD de SpABC dans les souches BL21(DE3) et *L. lactis*. Pour confirmer la présence des transporteurs SpABC WT et K48A dans la souche de *L. lactis*, un Western blot a été réalisé. Dans notre construction, seul le NBD possède une étiquette poly-histidine. La **Figure 92 B** montre la présence du NBD de SpABC dans la souche de *L. lactis* confirmant son expression. Une autre construction où l'étiquette poly-histidine était positionnée du côté C-terminal du TMD avait été générée. Toutefois, il n'y avait pas d'expression. De ce fait, elle a été mise à l'écart et les expériences ont continué avec la construction ayant l'étiquette poly-histidine du côté N-terminal du NBD.



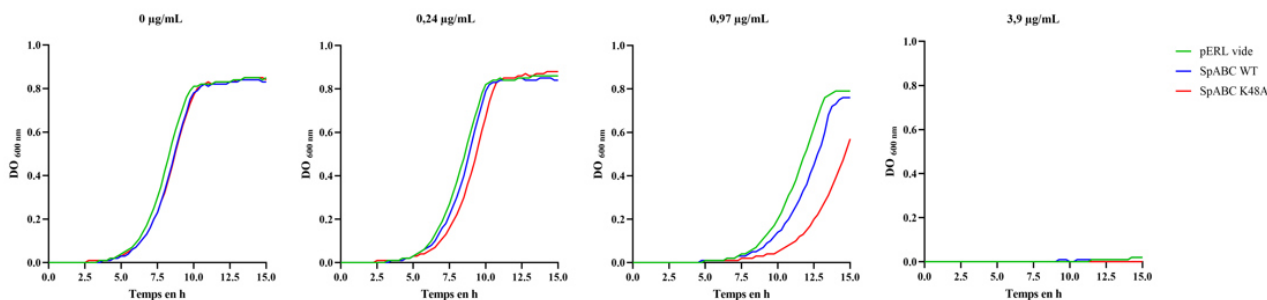
**Figure 92 : Expression de SpABC WT et SpABC K48A dans les membranes de *L. lactis***

**A.** SDS-PAGE des membranes de *L. lactis*

**B.** Analyse par Western blot des membranes de *L. lactis*

#### 4.4.2. Fonctionnalité de SpABC dans *L. lactis*

Après avoir exprimé les transporteurs SpABC WT et SpABC K48A dans *L. lactis*, la question de sa fonctionnalité dans cette souche se pose. Pour y répondre, la croissance des souches de *L. lactis* transformées avec le vecteur pERL vide, SpABC et SpABC K48A est suivie durant 15 h en présence de différentes concentrations de bacitracine. On observe qu'en absence de bacitracine, les différentes souches poussent de la même manière car les courbes de croissance se superposent. Toutes les souches testées meurent à la même concentration en bacitracine (3,9 µg/mL) (**Figure 93**). Il n'y a pas de différence de CMI entre les souches suggérant que le transporteur SpABC WT n'est pas fonctionnel.



**Figure 93 : Croissance des souches de *L. lactis* transformées avec SpABC WT et SpABC K48A**

La souche de *L. lactis* transformée avec le vecteur pERL vide sert de contrôle.

Avec un transporteur SpABC WT fonctionnel, une différence de CMI était attendue avec la souche comportant le transporteur sauvage qui serait plus résistante à la bacitracine que les souches de *L. lactis* avec le vecteur pERL vide ou SpABC K48A.

## 5. Discussion et Perspectives

Dans cette partie, nous avons commencé à caractériser biochimiquement le transporteur SpABC. L'expression dans un système hétérologue, la purification à l'aide de détergents, l'activité d'hydrolyse des nucléotides et la reconstitution en protéoliposomes ont été optimisées.

### 5.1. Production de SpABC fonctionnel : un long parcours semé d'embûches

#### 5.1.1. Expression hétérologue de SpABC

L'expression hétérologue des protéines membranaires est un grand challenge pour leurs études fonctionnelle et structurale. En effet, exprimer la protéine d'intérêt dans le système hétérologue n'est pas la finalité de l'expérience, il faut que cette protéine soit fonctionnelle.

Tout d'abord, il est important de déterminer dans quel système la protéine peut s'exprimer. Pour cela, plusieurs souches bactériennes ont été utilisées. Une des premières conditions pour étudier une protéine membranaire est son insertion dans la membrane. Cela suggère que la protéine est correctement repliée puisqu'elle ne s'est pas agrégée en corps d'inclusion, ce qui peut notamment arriver en cas de saturation du translocon SEC (Komar et al. 2016). L'expression du transporteur SpABC a été testée dans différentes souches d'*E. coli* ainsi qu'une souche de *L. lactis*. Les vésicules



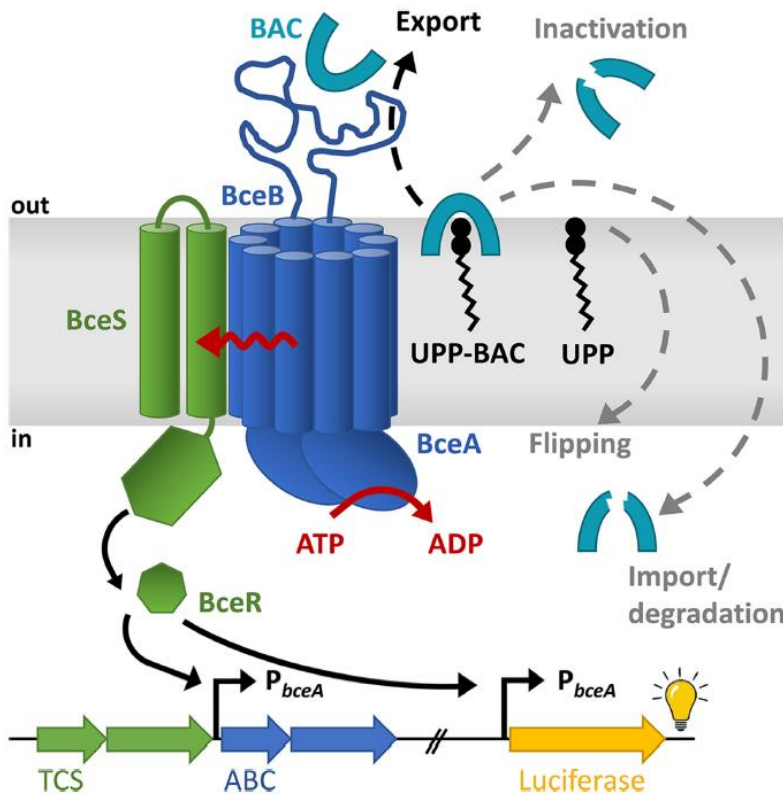
de membranes ont été isolées puis déposées sur un gel SDS-PAGE pour visualiser la présence des protéines d'intérêt. On observe l'expression du transporteur dans la souche de *L. lactis* et dans les souches BL21 (DE3) et C43  $\Delta$ acrAB  $\Delta$ ompF d'*E. coli*. Toutefois, SpABC est mieux exprimée chez *E. coli*. La fonctionnalité de transport de SpABC a été évaluée directement sur les vésicules de membranes mais aussi sur la capacité de la bactérie à résister aux PAMs substrats. On observe que SpABC ne présente pas d'activité de transport dans nos conditions. En effet, une protéine membranaire exprimée et bien adressée à la membrane peut ne pas être fonctionnelle (Mathieu et al. 2019). Cette absence de fonctionnalité peut être due à une conformation non optimale ou à la présence des étiquettes d'affinité qui peuvent découpler le transporteur. Suivant cette hypothèse, une construction de SpABC sans étiquette poly-histidine a été générée. Cependant, cette protéine non étiquetée n'a pas pu être exprimée dans les différentes souches d'*E. coli* testées. De ce fait, il a été impossible de conclure si l'absence de transport de SpABC était due à la présence de l'étiquette poly-histidine ou au fait que la protéine membranaire n'était pas bien repliée. Mais une troisième hypothèse, développée ci-dessous, permet d'expliquer l'absence de transport.

### 5.1.2. SpABC est-il un transporteur ABC qui ne transporte pas ?

Dans le contexte des transporteurs ABC de la sous-famille des BceAB, une autre explication peut être avancée. Dans cette étude publiée en 2020, Kobras et ses collaborateurs ont suggéré qu'au lieu de transporter des molécules à travers la membrane plasmique, les transporteurs de type BceAB protégeaient la cible (undécaprénylpyrophosphate et/ou lipide II) des PAMs en libérant ces derniers avant qu'ils ne puissent entamer leur action antimicrobienne (Kobras et al. 2020) (**Figure 94**). Cela expliquerait les résultats obtenus.

**Figure 94 : Schéma du système de résistance BceAB-BceRS**

(Kobras et al. 2020)

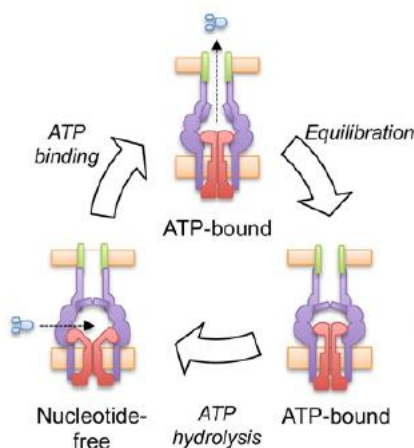


Les transporteurs de la sous-famille BceAB ne sont pas les seuls transporteurs ABC à ne pas transloquer leurs substrats à travers la membrane. On retrouve aussi le transporteur MacB qui fait partie d'un système tripartite d'efflux avec une protéine adaptatrice appelée MacA et une porine TolC située au niveau de la membrane externe de la bactérie *E. coli*. Le transporteur MacB expulse ses substrats par un processus appelé méchanotransmission ; de ce fait, les molécules ne passent pas par le domaine transmembranaire. En effet, le substrat entre au niveau du domaine périplasmique et grâce à un changement de conformation de MacB, le substrat est propulsé à travers le canal formé par MacA et TolC pour être expulsé hors de la bactérie (Crow et al. 2017; Greene et al. 2018) (**Figure 95**).

**Figure 95 : Schéma du mécanisme moléculaire permettant la sécrétion des substrats par la pompe à efflux MacAB-TolC**

(Crow et al. 2017)

MacB (en rouge), MacA (violet), (TolC (vert) et substrat (bleu).



## 5.2. Caractérisation fonctionnelle de SpABC

### 5.2.1. Purification et activité d'hydrolyse de SpABC

Pour étudier les protéines membranaires, il est important de les extraire de leur environnement membranaire. Pour cela, le choix du détergent à utiliser est très important pour l'étude fonctionnelle de la protéine mais aussi pour la résolution de sa structure tridimensionnelle (Chaptal et al. 2017). Tout d'abord, différents détergents doux ont été utilisés pour extraire le transporteur SpABC. Les capacités d'extraction du LMNG, du DDM et de l'UDM ont été comparées. On observe que ces trois détergents sont capables d'extraire une bonne partie du transporteur SpABC. Il a été montré sur d'autres protéines membranaires de la famille ABC que les détergents doux tels que le LMNG ou le DDM ont la capacité d'extraire la proportion active des transporteurs ABC alors que des détergents forts tels que la FC-12 extraient toutes les protéines quelque soit leurs fonctionnalités (Mathieu et al. 2019). Cependant, dans le cas du transporteur SpABC, l'extraction puis la purification avec les détergents LMNG, DDM et UDM ne conservent pas l'activité d'hydrolyse de la protéine d'intérêt. Le fait d'avoir utilisé parallèlement des transporteurs inactifs en hydrolyse a permis de conclure que la faible activité d'hydrolyse détectée était due à la présence des contaminants. Après avoir effectué la purification du transporteur par affinité sur une colonne de nickel puis enlevé l'imidazole via des dialyses, les activités ATPase et GTPase des protéines purifiées à l'aide de détergents ont été mesurées. On a observé que le transporteur SpABC ne présentait pas d'activité ATPase ou GTPase significative en détergents et, de plus, ces activités d'hydrolyse ne sont pas stimulées en présence des substrats. De ce fait, les détergents utilisés ne conservaient pas la fonctionnalité de SpABC. La présence de ces détergents déstabilisait peut-être la fixation des nucléotides au niveau des NBD ou le couplage NBD/TMD. Après avoir testé l'activité d'hydrolyse de la protéine SpABC en détergent, nous avons utilisé ce transporteur pour le reconstituer en protéoliposomes. Cette reconstitution permet de mimer l'environnement membranaire natif du transporteur. Les activités ATPase et GTPase des protéoliposomes ayant incorporé SpABC ont été mesurées. On a observé que l'activité d'hydrolyse du transporteur a été restaurée. Le fait que des transporteurs ABC ont leurs activités d'hydrolyse de l'ATP stimulées après reconstitution dans les protéoliposomes a été observé par exemple dans le cas de BmrA (Mathieu et al. 2019; Breyton et al. 2019) ou de celui de LmrA (Infed et al. 2011). De plus, cette activité d'hydrolyse de SpABC était stimulée en présence des substrats de SpABC. De ce fait, ces résultats montrent qu'un environnement lipidique est nécessaire à l'activité d'hydrolyse de SpABC. La stimulation de l'activité d'hydrolyse par les substrats montre une réelle communication entre le TMD incluant le domaine extracellulaire qui détecte les substrats et les NBDs qui hydrolysent les nucléotides. Il s'agit de la première fois qu'une activité d'hydrolyse a été mesurée pour un

transporteur BceAB. En 2014, Dintner et ses collaborateurs ont publié un article où ils ont effectué différentes expérimentations pour comprendre le mécanisme de fonctionnement du transporteur BceAB de *B. subtilis*. Ils ont purifié le transporteur en DDM puis ont mesuré l'activité ATPase des protéines purifiées obtenues. Le transporteur ne présente pas une activité d'hydrolyse significative en DDM ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus (Dintner et al. 2014). Cette absence d'activité d'hydrolyse peut être due à un mauvais repliement de la protéine ou une déstabilisation de la structure tridimensionnelle par la présence des molécules de détergents. Cependant, le transporteur en détergents est capable de fixer la bacitracine liée à son co-facteur zinc avec une forte affinité (60 nM) montrant que le domaine transmembranaire de BceAB est bien replié (Dintner et al. 2014).

Même si les protéines purifiées avec les détergents LMNG, DDM et UDM et reconstituées en protéoliposomes présentent une activité d'hydrolyse non négligeable, il existe une différence notable entre ces différentes protéines. En effet, les protéoliposomes ayant incorporé le transporteur SpABC purifié en LMNG ont une activité d'hydrolyse supérieure à celles des protéoliposomes ayant incorporé SpABC purifié en UDM ou en DDM. De plus, le profil de chromatographie d'exclusion stérique de SpABC purifié en LMNG est plus homogène. Ces résultats montrent que le LMNG semble mieux préserver l'activité d'hydrolyse de SpABC. En s'appuyant sur les données obtenus, la solubilisation ainsi que la purification de SpABC en LMNG ont été optimisées. Les rendements de purification de SpABC sont passés d'environ 1,5 mg à 6,5 mg de protéines purifiées par un litre de culture. L'activité d'hydrolyse de SpABC reconstitué en protéoliposomes a été améliorée grâce à la purification par gradient de sucrose. En effet, ce gradient permet de séparer les liposomes vides, les protéines agrégées et les liposomes ayant SpABC selon leurs densités. L'activité d'hydrolyse de nucléotides mesurée sera alors rapportée à la vraie quantité de protéines actives dans le milieu réactionnel. La méthode de préparation de protéoliposomes que nous avons utilisée ne nous permet pas de définir le sens d'insertion des transporteurs SpABC dans les liposomes. De ce fait, on peut se retrouver avec seulement 50% des NBDs disponibles à l'hydrolyse ce qui sous-estime l'activité d'hydrolyse de SpABC. Pour s'affranchir de ce biais, il est possible de préparer les protéoliposomes en utilisant des liposomes préformés. Ces liposomes préformés sont déstabilisés par un ajout de détergents permettant d'insérer les protéines purifiées. Ces dernières vont s'insérer entre les lipides via leur partie transmembranaire de ce fait la quasi-totalité des NBDs sera disponible pour hydrolyser les nucléotides. Il serait aussi possible de reconstituer le transporteur SpABC dans des nanodisques. Il s'agit d'un autre outil permettant de mimer l'environnement natif des protéines membranaires. L'avantage de cet outil par rapport aux liposomes est que tous les NBDs sont disponibles. Nous avons déjà pu reconstituer le transporteur SpABC dans des nanodisques et une activité ATPase significative

et stimuable par les substrats avait été détectée. Toutefois, l'activité ATPase obtenue était inférieure à celle mesurée avec les liposomes. On en a conclu que la méthode utilisée pour reconstituer SpABC en nanodisques n'était pas optimale et devait être retravaillée pour améliorer l'activité ATPase de SpABC.

Ainsi, l'étude *in vitro* d'une protéine membranaire est un chemin parsemé d'innombrables étapes qu'il faut à chaque fois franchir pour espérer aboutir à une protéine fonctionnelle.

### 5.2.2. ATP et/ou GTP : quelle énergie pour le fonctionnement de SpABC ?

Dans cette étude, nous avons montré que le transporteur SpABC était capable d'hydrolyser aussi bien l'ATP que le GTP. Qu'est-ce qui pourrait justifier le fait que le transporteur SpABC ne fait pas de distinction entre l'ATP et le GTP alors que les transporteurs ABC en général hydrolysent mieux l'ATP ? Tout d'abord, il faut savoir que l'ATP et le GTP sont très similaires structurellement et leur seule différence réside dans l'ajout d'un groupement cétone au niveau du GTP. Cette forte proximité structurale pourrait expliquer la capacité du transporteur SpABC à hydrolyser aussi bien l'ATP que le GTP. Cette particularité pourrait aussi être expliquée par les quantités d'ATP et de GTP disponibles dans la bactérie *S. pneumoniae*. En effet, le pneumocoque présente des concentrations intracellulaires d'ATP et de GTP similaires (~ 4 mM) (Orelle et al. 2018), ce qui est différent de la bactérie *E. coli* où la quantité d'ATP (~ 10 mM) est plus importante que la quantité de GTP (~ 5 mM) (Bennett et al. 2009). Le fait que le pneumocoque présente les mêmes quantités intracellulaires de GTP et d'ATP peut être expliqué par son incapacité à effectuer un métabolisme respiratoire (Hoskins et al. 2001; Orelle et al. 2018). Le pneumocoque, comme la plupart des streptocoques, obtient son énergie à travers la fermentation des glucides qui sont oxydés en pyruvate durant le cycle de glycolyse (Orelle et al. 2018; Poolman 1993). SpABC présente des vitesses maximales d'hydrolyse d'ATP et de GTP similaires (comprises entre 1200 et 1230 nmol/min/mg) ainsi qu'une affinité équivalente avec des valeurs de  $K_m$  d'environ 1,6 mM. Cependant une différence subsiste entre l'hydrolyse de ces deux nucléotides. L'activité ATPase présente une coopérativité plus marquée que l'activité GTPase avec une constante de hill supérieur ( $h_{ATP} = 2,9 > h_{GTP} = 1,9$ ).

Comprendre le fonctionnement du transporteur ABC est une étape importante pour déchiffrer le mécanisme de résistance aux PAMs. Il est tout aussi important de déchiffrer les interactions existant entre les composants de ce système de résistance. A ce jour, il n'existe pas beaucoup d'articles publiés sur l'étude mécanistique des interactions existant entre les transporteurs BceAB et leurs TCS partenaires dans la résistance. Il a été montré par nos résultats de protéomique chez *S. pneumoniae* ainsi que dans la littérature qu'une quantité suffisante de transporteur ABC fonctionnel permet la

résistance de la bactérie aux PAMs. En effet, lorsque le transporteur BceAB de *S. agalactiae* sauvage et inactif est surexprimé dans une souche de *L. lactis*, une différence de CMI de 16,7 fois est observée entre la souche surexprimant le transporteur sauvage et celle surexprimant le transporteur inactif (Reiners et al., 2017). Il a aussi été montré que l'activité d'hydrolyse du transporteur est une condition importante à la mise en place de la résistance aux PAMs. En effet, grâce à des mutants catalytiques du transporteur BceAB dans *B. subtilis* et des tests avec la  $\beta$ -galactosidase, les auteurs suggèrent fortement que la détection de la bacitracine ainsi que le transfert du signal se font durant l'hydrolyse de l'ATP par BceAB (Rietkötter et al. 2008). Le système de résistance aux PAMs implique aussi un TCS. Il serait très intéressant de purifier l'HK et de le co-reconstituer avec SpABC dans un même protéoliposome pour étudier l'influence du TCS sur l'activité d'hydrolyse de SpABC. Nous pourrions aussi étudier la phosphorylation de l'HK ainsi que l'influence de SpABC sur cette dernière en utilisant différentes méthodes : la détection de l'histidine phosphorylée par l'ATP $\gamma$ S grâce à un anticorps qui reconnaît spécifiquement le résidu thiophosphohistidine ou par l'utilisation du P<sup>32</sup> radioactif et de l'autoradiographie après la migration sur des gels SDS-PAGE. Ces différentes expériences nous permettront aussi de montrer *in vitro* l'interaction entre SpABC et l'HK de SpTCS. Toujours dans l'optique de comprendre les interactions régissant le complexe SpABC/SpTCS, nous pourrions analyser la stoechiométrie entre SpABC et l'HK en couplant la chromatographie d'exclusion stérique à la spectrométrie de masse native. Toutefois cette technique nécessite une forte interaction entre les deux protéines donc, si l'interaction visée s'avère faible, nous pourrions la consolider en effectuant des liaisons chimiques. De plus, la stoechiométrie des transporteurs de type BceAB n'étant pas encore été clairement établie, nous pourrions, avec cette même technique, déterminer la stoechiométrie de SpABC apportant ainsi une connaissance supplémentaire sur cette famille de transporteurs ABC : BceAB.

## 6. Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons clairement établi par diverses expériences que le transporteur SpABC et le système à deux composants SpTCS collaboraient pour résister à des PAMs bactériens ciblant le lipide II et/ou l'undécaprénylpyrophosphate. La mise en place de ce système de résistance est totalement dépendante de l'intégrité des composants du système notamment SpABC et SpTCS. L'étude biochimique du transporteur SpABC que nous avons réalisée a aussi permis d'obtenir pour la 1<sup>ère</sup> fois un transporteur de la famille BceAB capable d'hydrolyser des nucléotides. De plus, cette capacité d'hydrolyse est stimulée par la présence des PAMs substrats. De manière

intéressante, le transporteur SpABC hydrolyse aussi bien l'ATP et le GTP. Les travaux réalisés lors de cette thèse ont permis de faire quelques avancées dans la compréhension du système de résistance aux PAMs médié par un transporteur ABC couplé à un système de régulation à deux composants chez le pathogène humain *S. pneumoniae*. Cela est important car la caractérisation du mécanisme moléculaire des systèmes de résistance aux peptides antimicrobiens constituera une voie prometteuse pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de traiter le nombre croissant d'infections qui deviennent insensibles aux antibiotiques actuels.

# Partie IV :

# Annexes



**Annexe 1 : Séquences des systèmes BceAB-BceRS de *B. subtilis* et *S. pneumoniae***

**Couple YvcPQ – RS de *B. subtilis***

**NBD : YvcR. Code Uniprot : O06980**

MNVLQTTNLSKTYYSNKGITISYQALSAFDLSVSKGEFVVGIMGPSGSGKTTLLNLLATIDK  
PTQGEEMMINGIQPKTLKDQELALFRRRELGFVVFQDFNLLDTLTIRENILLPLALDKVKLR  
EMEARLDELADTLQIKHILDHRTYEVSGGQQRAACARAI IHNPALILADEPTGNLDSKS  
AKQVMNTLAQLNEEKEATILLVTHDATAASFCKRIVFIKDGRFFSEIHRGTNRQVYQSI  
LDTLSVLGGDFHEFENYRP

**TMD : YvcS. Code Uniprot : O06981**

MNLRTIARKNILGNLQRYVAYFLSCVFAVSVFFVFTSFI FHPDVNEDNIYGGSLVKTCLS  
AALVVIIVFCIFFITYSNSAFLQARKKEFGLLTLFGTSKQQLRKMIIYEQSLISLAAIAA  
GIGAGLLFSLKLFMIMTWMLSVKVPISFAIVPKAFVMTIAGFLILFQTLILSLGRIRKL  
EIIELIKSAKKPKSLPVYSKWLTVLSLLCLGSGYYLSATANAI DMMFRVFPILILVLIGT  
YFFFTQSSVAFFRMLYRKKHSFYKGTNIIVRSNMI FRLKDHARMLFLT SVITAVILTATG  
VIYMFYSDLQRQEEQSI PQSVSWVEKDASRFQVMKPETAENTLKKAHAVITYKVDATGIP  
VTFQSDLPYGNKKMEAEALLISEKVYNQVAKEKGFVVIHLQENEAFINVSFQMMVKDTFG  
EGETA AFHMKSGKTL SYVMKKQKNGI LMSVDGVSRLLVSEKSFDSLSQDVPLKEQMRM  
VGYELEHWQETVDVSEKLENMVPKEHTSDFQTRAPSYQIVKQGVALLMFLIGL FVSVLFFI  
VQGSMLYLRFMTEIEDTGVQVLALKRIGVTDKEIHSILGKQIGLFFI PFIAGTIHAGFA  
YAALSNMLNSNLFLEAVIVIFIYFVFQALYYIVTRHIYKRAVLQRM

**HK : YvcQ. Code Uniprot : O06979**

MLKTYLIDRLAII LFSLLGIGSAMLIA YLSIVESGAEPSKENMMYIWILPGTLLAAGFAA  
DYVRQFSFLTYVKKLAEQASSNDIGQSLKARKPRTGEQALWTKMINALGQQYESRLSQY  
INQQKQHYTF TNQVHHMKTPVSVISLMIQEGKNGTSSSFPTFLEELEDENERFRHGLDM  
MLQTARLEEFADFVKPQTFDLAEMVRSLINQEKRFIKRRLFP TLHVPPNAVQISSDQKW  
LSFVVEQILFNALKYSKQGVGDPITIRIETQGHETRLSVADEGIGIPPQDLPRIFDAFFT  
GENGRTMKEATGMGLYLAKQVCSRLGHKLYAESKEGAGTVMTIVFSSDTLVNVTAL

**RR : YvcP. Code Uniprot : O06978**

MYRILLVEDDERIASLLGGHLQKYGYEVKIAEQLN DIKLEFAEMKPDVLDDINLPFFDG  
FYWCRQIRTI SNAPIIFISARTDELNQVMAIENGGDDYITKPFHLEVVMAKIKSVLRRTY  
GEYSPSLPQESRIVELGGLTIYPDQNEAEWNSVRILFSQKEFQLLSIFVREHKKIVSRDE  
LLEALWDDVDFVDDNTLT VNVNRLRRKLENAGLTD CISTIRGQGYQFQVNRKDEAEC

**Couple YxdJK – LM de *B. subtilis***

**NBD : YxdL. Code Uniprot : P42423**

MANMLEVKHINKTYKGQVSYQALKQISFSIEEGEFTAVMGPSGSGKTTLLNIISTIDRPD  
SGDILINGENPHRLKRTKLAHFRKQLGFVVFQDFNLLDTLTIGENIMLPLTLEKEAPSVM  
EEKLHGIAAKLGIENLLNKRTFEVSGGQRQRAAIARAVIHKPSLILADEPTGNLDSKATK  
DVMETLQSLNRDDHVTALMVTHDPVSAS YCRRVIFIKDGELFNEIYRGENRQVFYEQILD  
VLSMLGGNANDLSSVRL

**TMD : YxdM. Code Uniprot : P42424**

MTFLQFAYKNVTRNKRAYLAFFLSSAFSVLIFFTFAMFLFHPALKEGYLNNIAKKGLTAA

EWMIFVFSFLFVLYSVNAFLKSRNKEFGILLMQGITPGQLRKLITAENMIIGVMSIAAGI  
IGGFIFSKTFFTVGAYILEMDALPLYMPWKALGITACGFLLLFFFLSQFTILFVRSNTVI  
KLIKGTGKVKPEPKPSVLLSLFGIACLCGGYGMVLKGNVHGAEPFIILLTIVIGTYFFFS  
QSSIWILRALKKWKTFFYLRGKNI IWVSDLVYRLKDNARLFFIVSII SAVAFTATGVLAMY  
KSTVGAEESAYEMEYLSYNNPKEQTHLKDIDHELKTHGFTYTKDKIDVSYVRYQEGETV  
PPVYMISES DAAKYFHVKNGLKEDEAVYFPGTYDRNFKNEAPDQLKLLNQKGLSDQKL  
SVKEVKKPLISLNAI IAVNDQTFDQLKSLGDKASLYGYSYDHWKDSLEISQSLQNEIYGN  
YIDVHSDFAKAGTYDQVLPSSLFGLFIAIVFFVAAASFLYFRLFTDLDEDRERYR  
SLAKIGLSEREMAQSVTIQLAILFFFPVIAVMHTLFALRTLAVEGYSDVAGPLSLTIGG  
FFIFQLLFFLAVRSSYLKMMNK

**HK : YxdK. Code Uniprot : P42422**

MKLF LRSHAVLILLFLLQGLFVFFYYWFAGLHFSHLYILGVQLLILAGYLAYRWYKDR  
GVYHWLSSGQEGTDI PYLGSSVFCSELYEQMELIRLQHQLHETEAKLDARV TYMNQWV  
HQVKTPLSVINLI IQEEDPVEFEQIKKEVRQIEFGLETLLYSSRLDLFERDFKIEAVSLS  
ELLQSVIQSYKRFFIQYRVYPKMNVCDHDIYTDKWLKFAIGQVV TNAVYKYSAGKSDRL  
ELNVFCDEDRTVLEVKDYGVGIP SQDIKRVPDPYTTGENGRRFQESTGIGLHLVKEITDK  
LNHTVDISSSPGEGTSVRFSFLTKM

**RR : YxdJ. Code Uniprot : P42421**

MNKIMIVEDSEDIRGLLQNYLEKYGYQTVVAADFTAVLDVFLREKPDVLLDINLPAYDG  
YYWCRQIRQHSTSPIIFISARSGEMDQVMAIENGGDDYIEKPF SYDIVLAKIKSQIRRAY  
GEYAAKQGEKVVEYAGVQLFVERFELRFQDEKSELSKKE SKLLEVLLERGEKVT SRDRLM  
EKTWDTDIFIDNTLNVIITRLRKKLRELNAPVSI EAVRGEQYQLRAQS

**Couple BceRS-AB de *B. subtilis***

**NBD : BceA. Code Uniprot : O34697**

MVILEANKIRKSYGNKLNKQEV LKGDIDHIEKGEFVSIMGASGSGKTTLLNVLSSIDQVS  
HGTIHINGNDMTAMKEKQLAEFRKQHLGFIFQDYNLLD TLTVKENILLPLSITKLSKKEA  
NRKFEEVAKELGIYELRDKY PNEISGGQKQRTSAGRAFIHDPSII FADEPTGALDSK SAS  
DLLNKLSQLNQKR NATIIMVTHDPVAAS YCGRVIFIKDGM YTQLNKGQDRQTFQDIM  
KTQGV LGGVQHEH

**TMD : BceB. Code Uniprot : O34741**

MNINQLILRNLKKNLRNYLYVFALIFSVALYFAFVTLQYDPAIN EVKASIKGAAAIKTA  
SILLVAVVAIFILYANTIFIKRRSKEIGLFQLIGMTKHKIFRILSAENVMLYFGSLAIGV  
AAGFSISKLVLMILFKIVDVKADAKLHFSEQALVQTVIVFCGIYLLIMIMNYTFIKKQSI  
LSLFKVTSSSTEDKVKKISFFQMLIGALGIVLILTGYYVSSSELFGGKFKTINELFVAM SFI  
LGSVIIGTFLFYKGSVTFISNIIRKSKGGYLNISEVLSLSSIMFRMKS NALLLTIITTVS  
ALAIGLLSLAYISYSSSEKTAEQNVAADF S FMNEKDAKL FENKLR SNISFVKKATPVLQ  
ANVDIANIMDGTPEKMQGDPGNMQLAVVSDKDVKGVDVAAGEAVFSGYTDLLQKIMVFKD  
SGVIKVKSKHETQPLKYKGLREEFLVSYTFTSGGMPAVIVDDSLFKQLDKDKDPRIQLAQ  
STFIGVNVKHDDQMEKANELFQQVNKNEHLSRLDTSAAQKSLFGMVMFIVGFLGLTFLI  
TSGCILYFKQMGES EDEKPSYTI LRKLGF TQGD LIKIRIKQMYNFGIPLVVGLFHSYFA  
VQSGWFLFGSEVWAPMIMVMVLYTALYSIFGFLSVLYYKVKV I KSSL

**HK : BceS. Code Uniprot : O35044**

MIKAFLIERRSWIAAFLFQQALMLFIAFVDPSISFGNVLYMVYLCILFFIIFLWFRYRKE  
TAFYKSLKTWENNL DVTAINEPETPFEAMVERS IAGQTEHLKQTAARHRLALENEKDELM  
AWIHEVKTPLTAMHLI IDRMEEKALKS QLSYEWLRIHLLLDQQLHQKRISFIENDLSVEF  
IQLQPLIFKEIKDLQSWCIQKGIGFDIQLEAKEVLSDAKWLA FII RQLLTNAVYKSEASE  
IEIKSFQKGEQTQLQVKDCGRGIDPKDVPRI FDKGFTSTTDHHDQASTGMGLYLAKKAAA  
PLLIHIDVESEFGAGTVFTLTFPIRNQFEHVIVS

**RR : BceR. Code Uniprot : O34951**

MFKLLLI EDD ELSFHEIKDRLTGWSYDVYGIQDFSQV LQEF AAVNPDCV I IDVQLPKFDG  
FHWCR LIRSRSNVPI LFLSSRDHPADMVMSQLGADDFIQKPFHFDVLI AKIQAMFRRVH

HYNTEPSTIKTWCGAAVDAEQNLVSNDKGSVELTKNEMFILKQLIEQKNKIVSREELIRS  
LWNDERFVSDNTLTVNVNRLRKKLDALQLGAYIETKVGQGYIAKEEDKFYD

**Couple SPD\_0804/SPD\_0805 – SPD\_1445/SPD\_1446 de *S. pneumoniae***

**NBD : SPD\_0804. Code Uniprot : A0A0H2ZN40**

MTLLDVKHVQKIYKTRFQGNQVEALKDIHFTVEKGDYVAIMGESGSGKSTLLNILAMLDK  
PSRGQVYLNQTDATIKNSQASSFRREKLGFFVQDFNLLDTLSVKDNILLPLVLSRRPIT  
EMMKLVVTAENLGINQLQEKYPYEISGGQQRVAVARAIITEPEILLADEPTGALDSKS  
SAALLDVFDEINERGQTIIMVTHSTAAASRAKRVLFIKDGILYNQIYRGEKTERQMFQEI  
SDTLTVMASEVN

**TMD : SPD\_0804. Code Uniprot : A0A0H2ZPF3**

MFRLTNKLAVSNLIKNRKLYPPFALAVLLAVTVTYLFYSLTFNPKIAEIRGGTTIQATLG  
FGMFFVTLASAIIVLYANSFVMKNRSKELGIYGLGLEKRHLISMTFKELVVFGILT VGA  
GIGIGALFDKLI FAFLLKLMKLVKVELVATFQTKVVITVLVVFGLIFLGLMFLNALRIARM  
NALQLSREKASGEKKGRFLPLQTIILGSIISLGIGYYLALT VKDPLTALTFFIAVLLVIFG  
TYLLFNAGITVFLQILKKNKYYYYQPNNLISVSNLIFRMKKNVGLATIAILSTMVLVMT  
SAATSIFNSSSEFKKVLNPHDFGVSGQNVKEDLDKLLSQFASDKGYKIKEKEVFRYTYF  
AVANQEGTKLTI FEKQNRVQPKTVFMVFDQKDYENMTGQKLSLSGNEVGLFAKNEGVE  
QKALTLNDHQFSVKEEFTKDFIVNHVPNQFNILTADYNYLVVLDLQAFLDQFPDSAIYNQ  
FYGGMNVNASEAEQLKVAEEYEKYLQKFNAQLNTEGNYVYGSTLADASAQMSALFGGVFF  
IGIFLSIIFMVGTVLVIYKQISEGYEDRERFIILQKVGLDQKQIKQTIKQVLT VFFLP  
LLFAFLHLAFAYHMLSLILKVIQVLDTTMMLIVTSLICAI FLIAYVLI FMITSRSYRKIV  
QM

**HK : SPD\_1445. Code Uniprot : A0A0H2ZQU9**

MLDWKQFFLAYLRSRSLFIYLLSLAFLVLLFQFLFASLGIYFLYFFFLLCCFVTILFFT  
DILVETQVYRQELLYGEREAKSPLI ALAEKLEAREMELYQQRSKAERKLTDLDDYYTLW  
VHQIKTPIAASQLLVAEVVDRQLKQQLEQEIFKIDSYTNLVLQYLRLESFHDDLVLKQVQ  
IEDLVKEIIRKYALFFIQKGLNVNLHDLDEIVTDKKWLLVVEQIISNSLKYTKEGGLE  
IYMDQELCIKDTGIGIKNSDVLRVFERGFSGYNGRLTQQSSGLGLYLSKKISEELGHQI  
RIESEVGKGTTVRIQFAQVNLVLE

**RR : SPD\_1446. Code Uniprot : A0A0H2ZP68**

MHKILLIEDDQVIRQQIGKMLSEWGFVVLVEDFMEVLSLFVQSEPHLVLMDIGLPLFNG  
YHWCQEIRKISKVPIMFLSSRDQAMDIVMAINMGADDFVTKPFDQVLLAKVQGLLRSY  
EFGRDESLEAYAGVILNTKSMDLHYQGQVNLNLTKNEFQILRVLFEHAGNIVARDDLMREL  
WNSDFFIDDNTLSVNVARLRKKLEEQGLVGF IETKKGIGYGLKHA

## Annexe 2 : Protocole de l'analyse protéomique des souches R6 wt et R6 $\Delta$ spTCS

### 1. Digestion des échantillons

Pour chaque échantillon, 35 à 50  $\mu$ g de protéines ont été précipitées avec de l'acide trichloroacétique (TCA, *Sigma Aldrich*) durant toute une nuit à 4 °C. Puis, les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm (rotations par minute) pendant 30 min à 4 °C. Les culots sont lavés deux fois avec 500  $\mu$ L d'acétone froid puis centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Les culots lavés sont par la suite dénaturés avec 50 mM de NaOH et 1% de Sodium Deoxycholate (SDC, *Sigma Aldrich*), 1 M d'HEPES à pH 8 et de l'eau MiliQ dans les proportions suivantes : 15/5/78 (v/v/v). Les échantillons sont réduits avec 5 mM de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, *Sigma Aldrich*) puis alkylés avec 10 mM d'iodoacétamide (*Sigma Aldrich*) durant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante et sous une agitation de 850 rpm. La double digestion a été réalisée avec de l'endoprotéinase LysC (*Wako*) à un ratio de 1/100 (enzyme/protéines) dans 100 mM de bromure de tétraéthylammonium (TEAB, *Sigma Aldrich*) durant 5 h suivie d'un traitement à la trypsine (*Promega*) pendant toute la nuit. La double digestion par LysC et la trypsine a été réalisée à 37 °C.

La concentration de peptides a été évaluée avant le marquage par le kit TMT (6 plex Tandem Mass Tag) de *Thermo Scientific*.

### 2. Marquage au TMT et fractionnement

Les réactifs du marquage au TMT sont reconstitués en suivant les instructions du fabricant. Les tubes contenant les différentes étiquettes (0,8 mg) sont re-suspendus dans 41  $\mu$ L d'acétonitrile (ACN, *Sigma Aldrich*) à température ambiante. Les réactifs sont dissous 5 min par des vortex occasionnels et les solutions sont recueillies par des centrifugations brèves. Les échantillons de peptides sont étiquetés en ajoutant 41  $\mu$ L d'étiquette isobarique TMT puis incubés 1 h à température ambiante. Pour arrêter la réaction, 5% d'hydruylamine ont été ajoutés suivi d'une incubation de 15 min à température ambiante. Dix  $\mu$ L de TFA (acide trifluoroacétique, *Sigma Aldrich*) 20% sont ajoutés dans chaque échantillon pour précipiter le SDC puis ce dernier est enlevé à la suite d'une centrifugation. Tous les échantillons sont finalement mixés pour avoir une quantité totale de 30  $\mu$ g de protéines étiquetées et l'échantillon mixte a été séché.

Pour la 1<sup>ère</sup> expérience, l'échantillon a été dissous dans 300  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O – TFA 0,1% et 30  $\mu$ g de protéines étiquetées sont fractionnées sur une spin-colonne de fractionnement en phase inverse à

pH élevé (*Thermo Scientific*) selon les instructions du fabricant. Les neuf fractions obtenues sont séchées avant d'être analysées au nanoLC-MS/MS puis diluées dans 20  $\mu$ L de HCOOH à 0,1%.

Pour la 2<sup>nd</sup>e expérience, les échantillons sont dissous dans 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O – TFA 0,1% et dessalés utilisant une colonne C18 (*Thermo Scientific*). Par la suite, les échantillons sont séchés et dilués dans 60  $\mu$ L de HCOOH à 0,1%.

### 3. Analyse LC-MS/MS

Les échantillons sont analysés en triplicat utilisant une HPLC Ultimate 3000 nano-RSLC (*Thermo Scientific*, San Jose California) couplée à un spectromètre de masse Q Exactive HF via une source d'ionisation nano-electrospray (*Thermo Scientific*, San Jose California).

Lors de la 1<sup>ère</sup> expérience, 1  $\mu$ L de chaque fraction est injecté sur une colonne C18 (*Thermo Scientific*) pendant 3 min à 20  $\mu$ L/min avec 2% d'ACN, 0,05% de TFA dans l'eau puis séparé sur une colonne nano colonne C18 (*Thermo Scientific*) avec 60 min d'un gradient linéaire entre 3,2% et 40% de tampon B (A : 0,1% d'acide formique (FA, *Sigma Aldrich*) in H<sub>2</sub>O. B : 0,1% de FA dans ACN).

### 4. Analyse des données

Les protéines sont identifiées par une recherche dans une banque de données utilisant SequestHT avec le logiciel de Proteome Discoverer 2.2 (*Thermo Scientific*) contre les protéines de *S. pneumoniae* contenues dans la base de données uniprot.

## Annexe 3 : Séquences des protéines exprimées

La séquence des protéines exprimées peut être différente de la séquence originale trouvée dans l'organisme natif. Les étiquettes histidine sont représentées en vert. Les lettres en rouge représentent les acides aminés ajoutés à la séquence initiale.

### 1. Protéines clonées dans le vecteur pRSFDuet-1

#### **NBD : SPD\_0804. Code Uniprot : A0A0H2ZN40**

MHHHHHHHTLLDVKHVQKIYKTRFQGNQVEALKDIHFTVEKGDYVAIMGESGSGKSTLLNILAMLDPKPSRGQVYLNQDTDTATIKNSQASSFRREKLG FVFQDFNLLD T LSVKDNILLPLVLSRRPITEMMKKLVVTAENLGINQLQEKYPYEISGGQKQRVAVARAIITEPEILLADEPTGALDSKSSAALLDVFDEINERGQTILMVTHSTAAASRAKRVLFIKDGI LYNQIYRGEKTERQMFQEISDTLTVMASEVN

#### **TMD : SPD\_0804. Code Uniprot : A0A0H2ZPF3**

MFRLTNKLAVSNLIKNRKLYYPFALAVLLAVTVTYLFYSLTFNPKIAEIRGGTTIQATLGFGMFVVTLASAIIVLYANSFVMKNRSKELGIYGLMGLLEKRHLISMTFKELVVFVGGILTVGAGIGIGALFDKLI FAFLLKLMKLVELVATFQTKVVITVLVVFGLIFLGLMFLNALRIARMNALQLSREKASGEKKGRFLPLQOTILGSIISLGIGYYLALTVKDPLTALTTFFIAVLLVIFGTYLLEFNAGITVFLQILKKNKKYYYQPNNLISVSNLIFRMKKNVGLATIAILSTMVLTMSAATSI FNSSESFKKVLNPHDFGVSGQNVKEDLDKLLSQFASDKGYKIKEKEVFRYTYFAVANQEGTKLTI FEKGQNRVQPKTVFMVFDQKDYENMTGQKLSLSGNEVGLFAKNEGVKEQKALTLNDHQFSVKEEFTKDFIVNHVFNQFNILTADYNYLVVDPDLQAFLDQFPDSAIYNQFYGGMNVNASEAEQLKVAEEYEKYLQKFNAQLNTEGNYVYGSTLADASAQMSALFGGVFFIGIFLSIIFMVGTVLVIYYKQISEGYEDRERFIILQKVGLDQKQIKQTINKQVLT VFFLPLFAFLHLAFAYHMLSLILKVIQVLDTTMMLIVTLSICAI FLIAYVLIFMITSRSYRKIVQMHHHHHHHH

### 2. Protéines clonées dans le vecteur pERL

#### **NBD : SPD\_0804. Code Uniprot : A0A0H2ZN40**

MHHHHHHHHHHLEVLFGPSTLLDVKHVQKIYKTRFQGNQVEALKDIHFTVEKGDYVAIMGESGSGKSTLLNILAMLDPKPSRGQVYLNQDTDTATIKNSQASSFRREKLG FVFQDFNLLD T LSVKDNILLPLVLSRRPITEMMKKLVVTAENLGINQLQEKYPYEISGGQKQRVAVARAIITEPEILLADEPTGALDSKSSAALLDVFDEINERGQTILMVTHSTAAASRAKRVLFIKDGI LYNQIYRGEKTERQMFQEISDTLTVMASEVN

Annexe 4 : Tableau des protéines significativement surexprimées ou sous-exprimées dans le protéome des souches R6 *wt* et R6  $\Delta$ *spTCS* traitées à la bacitracine

1. Expérience 1

Protéines surexprimées dans les différentes conditions de l'expérience 1					
(R6 <i>wt</i> - Bacitracin) / (R6 $\Delta$ <i>spTCS</i> - Bacitracin)					
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	Abundance Ratio P- Value: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	
Q8DQ76	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1	4,726	2,24	1E-17	<b>TMD</b>
Q8DQ77	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	3,743	1,9	1E-17	<b>NBD</b>
Q8DNX6	Response regulator OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rr01 PE=4 SV=1	3,649	1,87	1E-17	<b>RR</b>
Q8CZ01	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0643 PE=4 SV=1	2,791	1,48	9,5257E-13	
A0A0H2ZQ95	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0959 PE=4 SV=1	2,105	1,07	1,1386E-07	
(R6 <i>wt</i> ) / (R6 $\Delta$ <i>spTCS</i> )					
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio P- Value: (R6 WT) / (R6 DTCS)	
Q8DNX6	Response regulator OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rr01 PE=4 SV=1	3,52	1,82	1E-17	<b>RR</b>
(R6 $\Delta$ <i>spTCS</i> - Bacitracin) / (R6 $\Delta$ <i>spTCS</i> )					

Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 DTCS-Bacitracin) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio (log2): (R6 DTCS-Bacitracin) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio P-Value: (R6 DTCS-Bacitracin) / (R6 DTCS)		
A0A0H2ZQK8	ABC transporter, substrate-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0090 PE=4 SV=1	3,682	1,88	1,1546E-14		
Q8DR87	Phosphotransferase system sugar-specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	3,267	1,71	2,7425E-12		
A0A0H2ZND3	Choline binding protein F OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=cbpF PE=4 SV=1	2,866	1,52	6,0729E-10		
A0A0H2ZND4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0466 PE=4 SV=1	2,726	1,45	4,0543E-09		
A0A0H2ZQR9	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0350 PE=4 SV=1	2,67	1,42	8,6546E-09		
Q8DN20	Phosphotransferase system sugar-specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	2,642	1,4	1,2678E-08		
Q8DR05	Acetolactate synthase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ilvB PE=3 SV=1	2,587	1,37	2,6528E-08		
Q8DR86	Transcription antiterminator BglG family OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bglG PE=4 SV=1	2,557	1,35	4,0146E-08		
Q8DR89	6-phospho-beta-glucosidase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bglA PE=3 SV=1	2,544	1,35	4,8028E-08		
A0A0H2ZQJ5	Ribosome hibernation promoting factor OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 /	2,487	1,31	1,0308E-07		



	NCTC 7466) OX=373153 GN=yfiA PE=3 SV=1				
A0A0H2ZP T8	Sugar ABC transporter, sugar- binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=rafE PE=4 SV=1	2,437	1,28	2,0363E-07	
Q8CZC1	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0085 PE=4 SV=1	2,37	1,24	5,0017E-07	
Q8DPP0	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacB PE=3 SV=1	2,312	1,21	1,0844E-06	
Q8DR85	Phosphotransferase system sugar- specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	2,308	1,21	1,1508E-06	
Q8DNC6	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1810 PE=4 SV=1	2,287	1,19	1,5244E-06	
A0A0H2Z M15	Sensor histidine kinase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0351 PE=4 SV=1	2,193	1,13	5,3111E-06	
Q04KG8	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=glgB PE=3 SV=1	2,166	1,11	7,6252E-06	
Q8DQP5	Phosphotransferase system sugar- specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	2,113	1,08	1,5314E-05	
P63743	Glycerol kinase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=glpK PE=3 SV=1	2,086	1,06	2,1865E-05	
A0A0H2ZP I9	Acetoin utilization protein AcuB, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0657 PE=4 SV=1	2,086	1,06	2,1695E-05	
Q8DQY4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae	2,073	1,05	2,5971E-05	

	(strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1				
A0A0H2Z N45	PTS system, IIB component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0560 PE=4 SV=1	2,033	1,02	4,3399E-05	
A0A0H2Z R39	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0803 PE=4 SV=1	2,026	1,02	4,7722E-05	
<b>(R6 wt - Bacitracin) / (R6 wt)</b>					
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 WT)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT- Bacitracin) / (R6 WT)	Abundance Ratio P- Value: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 WT)	
Q8DQ76	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1	4,485	2,17	1,3767E-14	<b>TMD</b>
Q8DQ77	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	4,433	2,15	2,1538E-14	<b>NBD</b>
Q8DR89	6-phospho-beta-glucosidase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bglA PE=3 SV=1	3,857	1,95	1,0036E-13	
Q8DR87	Phosphotransferase system sugar- specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	3,446	1,78	1,1282E-10	
A0A0H2Z QK8	ABC transporter, substrate-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0090 PE=4 SV=1	3,404	1,77	2,7716E-10	
A0A0H2ZP Q3	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1769 PE=3 SV=1	3,187	1,67	5,6208E-10	
A0A0H2Z NK5	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0040 PE=3 SV=1	2,947	1,56	4,7346E-09	

Q8DN20	Phosphotransferase system sugar-specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	2,935	1,55	7,1283E-09		
Q8DNY0	Confers low level cadmium resistance in Staphylococcus aureus OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=cadD PE=4 SV=1	2,773	1,47	1,5056E-06		
Q8CWP4	Sucrose phosphorylase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=gtfA PE=3 SV=1	2,595	1,38	5,2085E-07		
G6J9R6	Preprotein translocase, SecG subunit OS=Streptococcus pneumoniae GA47502 OX=760839 GN=secG PE=4 SV=1	2,574	1,36	2,2654E-06		
Q8DNK8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase 2 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=galT2 PE=3 SV=1	2,545	1,35	8,4585E-07		
P63743	Glycerol kinase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=glpK PE=3 SV=1	2,524	1,34	1,0473E-06		
Q8DR85	Phosphotransferase system sugar-specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	2,495	1,32	7,8014E-07		
Q8CZC1	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0085 PE=4 SV=1	2,441	1,29	1,182E-06		
Q8DPN9	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacA PE=3 SV=1	2,437	1,29	2,0439E-06		
A0A0H2ZND4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0466 PE=4 SV=1	2,418	1,27	1,9852E-05		
A0A0H2ZPT8	Sugar ABC transporter, sugar-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=rafE PE=4 SV=1	2,372	1,25	4,6627E-06		

Q8DNC6	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1810 PE=4 SV=1	2,313	1,21	2,1231E-06		
A0A0H2Z N45	PTS system, IIB component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0560 PE=4 SV=1	2,31	1,21	8,6165E-06		
A0A0H2ZP 97	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1360 PE=3 SV=1	2,268	1,18	1,311E-05		
A0A0H2ZP 20	Preprotein translocase, YajC subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=yajC-2 PE=4 SV=1	2,23	1,16	5,2781E-06		
Q8DPP1	Tagatose-6-phosphate kinase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacC PE=3 SV=1	2,221	1,15	1,1533E-05		
Q8DQP4	Beta-galactosidase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bgaA PE=1 SV=1	2,166	1,11	3,583E-05		
Q8DPP0	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacB PE=3 SV=1	2,151	1,1	1,7795E-05		
Q8DR86	Transcription antiterminator BglG family OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bglG PE=4 SV=1	2,138	1,1	8,3224E-05		
A0A0H2Z MX6	Pneumococcal surface protein A OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pspA PE=4 SV=1	2,113	1,08	5,9969E-05		
A0A0H2ZP 11	PTS system IIA component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0559 PE=4 SV=1	2,097	1,07	3,1567E-05		
Q8DNK7	Galactokinase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=galK PE=3 SV=1	2,082	1,06	8,126E-05		
B5LBK3	Adapter protein MecA OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=mecA PE=3 SV=1	2,019	1,01	0,00135816		

<b>Protéines sous-exprimées dans les différentes conditions de l'expérience 1</b>				
<b>(R6 wt - Bacitracin) / (R6 <math>\Delta</math>spTCS - Bacitracin)</b>				
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	Abundance Ratio P-Value: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)
A0A0H2ZQ R9	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0350 PE=4 SV=1	0,467	-1,1	5,6999E-06
<b>(R6 wt / R6 <math>\Delta</math>spTCS)</b>				
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio P-Value: (R6 WT) / (R6 DTCS)
P66525	30S ribosomal protein S21 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rpsU PE=3 SV=1	0,352	-1,51	1E-17
A0A0H2ZL0 2	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1943 PE=4 SV=1	0,47	-1,09	1E-17
A0A0H2ZP2 0	Preprotein translocase, YajC subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=yajC-2 PE=4 SV=1	0,485	-1,04	1E-17
Q8DNY0	Confers low level cadmium resistance in Staphylococcus aureus OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=cadD PE=4 SV=1	0,485	-1,05	1E-17
<b>(R6 <math>\Delta</math>spTCS - Bacitracin) / (R6 <math>\Delta</math>spTCS)</b>				
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 DTCS- Bacitracin) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio (log2): (R6 DTCS- Bacitracin) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio P-Value: (R6 DTCS- Bacitracin) / (R6 DTCS)
Q8CZ01	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0643 PE=4 SV=1	0,247	-2,02	1E-17
Q04IQ7	Regulatory protein RecX OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=recX PE=3 SV=1	0,436	-1,2	9,7028E-08
A0A0H2ZQ9 5	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466)	0,488	-1,04	3,4967E-06

	OX=373153 GN=SPD_0959 PE=4 SV=1			
<b>(R6 wt - Bacitracin) / (R6 wt)</b>				
No protein significantly underrepresented				

## 2. Expérience 2

<b>Protéines surexprimées dans les différentes conditions de l'expérience 2</b>					
<b>(R6 wt) / (R6 <math>\Delta</math>spTCS)</b>					
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio P-Value: (R6 WT) / (R6 DTCS)	
Q8DQX5	Type I restriction enzyme OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=hsdS PE=4 SV=1	2,465	1,3	1E-17	
<b>(R6 WT-Bacitracin) / (R6 DTCS-Bacitracin)</b>					
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT-Bacitracin) / (R6 DTCS-Bacitracin)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT - Bacitracin) / (R6 DTCS-Bacitracin)	Abundance Ratio P-Value: (R6 WT-Bacitracin) / (R6 DTCS-Bacitracin)	
Q8DQ77	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	9,97	3,32	1E-17	<b>NBD</b>
Q8DQ76	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1	9,794	3,29	1E-17	<b>TM D</b>
Q8DNA6	Phosphotransferase system system, cellobiose-specific IIA component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ptcA PE=4 SV=1	2,989	1,58	4,188E-07	
Q8DQX5	Type I restriction enzyme OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=hsdS PE=4 SV=1	2,77	1,47	3,6924E-07	
A0A0H2ZNC0	1,4-beta-N-acetylmuramidase, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=lytC PE=4 SV=1	2,164	1,11	0,00103056	
A0A0H2ZNY8	Pneumococcal surface protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 /	2,144	1,1	0,00034203	

	NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0579 PE=4 SV=1				
<b>(R6 wt - Bacitracin) / (R6 wt)</b>					
Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT Bacitracine) / (R6 WT)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT Bacitracine) / (R6 WT)	Abundance Ratio P-Value: (R6 WT Bacitracine) / (R6 WT)	
Q8DQ77	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	10,361	3,37	1E-17	<b>NBD</b>
Q8DQ76	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1	8,964	3,16	1E-17	<b>TM D</b>
A0A0H2ZR72	PTS system, IIA component OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1833 PE=4 SV=1	5,097	2,35	1E-17	
Q8DQ38	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), electron transfer subunit OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrK PE=3 SV=2	4,666	2,22	1E-17	
Q8DQ37	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), catalytic subunit OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrDB PE=3 SV=2	3,078	1,62	1E-17	
Q8DQL5	Orotate phosphoribosyltransferase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrE PE=3 SV=1	2,674	1,42	1E-17	
P63734	Carbamoyl-phosphate synthase small chain OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=carA PE=3 SV=1	2,659	1,41	1E-17	
Q04K48	Carbamoyl-phosphate synthase large chain OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=carB PE=3 SV=1	2,463	1,3	1E-17	
Q04LJ3	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pyrF PE=3 SV=1	2,252	1,17	1E-17	
<b>(R6 ΔspTCS - Bacitracin) / (R6 ΔspTCS)</b>					

Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 DTCS-Bacitracin) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio (log2): (R6 DTCS-Bacitracin) / (R6 DTCS)	Abundance Ratio P-Value: (R6 DTCS-Bacitracin) / (R6 DTCS)	
A0A0H2ZP20	Preprotein translocase, YajC subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=yajC-2 PE=4 SV=1	3,597	1,85	4,7001E-08	
Q8DQ38	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), electron transfer subunit OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrK PE=3 SV=2	3,533	1,82	1,5805E-07	
A0A0H2ZLY7	Acyl carrier protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=acpP PE=3 SV=1	3,442	1,78	2,8003E-07	
Q8DQL5	Orotate phosphoribosyltransferase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrE PE=3 SV=1	3,213	1,68	6,1878E-07	
Q8CYE2	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1611 PE=4 SV=1	2,787	1,48	2,4621E-05	
A0A0H2ZLS3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1566 PE=4 SV=1	2,584	1,37	9,2344E-05	
A0A0H2ZP97	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1360 PE=3 SV=1	2,422	1,28	0,0001427	
Q04MU7	UPF0356 protein SPD_0131 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0131 PE=3 SV=1	2,38	1,25	0,00019938	
A0A0H2ZR39	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0803 PE=4 SV=1	2,363	1,24	2,6073E-05	
A0A0H2ZRE4	Flavodoxin OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=fld PE=4 SV=1	2,359	1,24	0,00023194	



Q8DQ37	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), catalytic subunit OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrDB PE=3 SV=2	2,347	1,23	0,00025292	
B5E3R6	D-alanyl carrier protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 19F (strain G54) OX=512566 GN=dltC PE=3 SV=1	2,347	1,23	0,00023697	
Q8CYD7	UPF0337 protein spr1626 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1626 PE=3 SV=1	2,225	1,15	0,00059309	
Q8CZ93	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0155 PE=4 SV=1	2,201	1,14	0,00023678	
Q8DNT3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	2,198	1,14	0,00071577	
A0A0H2ZMB4	UPF0109 protein SPD_0675 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0675 PE=3 SV=1	2,187	1,13	0,00012298	
A0A0H2ZMN3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0718 PE=4 SV=1	2,157	1,11	0,00012262	
Q8DMZ3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr2007 PE=4 SV=1	2,134	1,09	0,00160594	
Q8DNC6	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1810 PE=4 SV=1	2,08	1,06	0,00163051	
Q04KI6	Nucleoid-associated protein SPD_0987 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0987 PE=3 SV=1	2,035	1,02	0,0018629	
A0A0H2ZP80	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0462 PE=4 SV=1	2,017	1,01	0,00252886	

Q04LJ3	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pyrF PE=3 SV=1	2,014	1,01	0,00365386
--------	--	-------	------	------------

**Protéines sous-exprimées dans les différentes conditions de l'expérience 2**

**(R6 wt) / (R6  $\Delta$ spTCS)**

No protein significantly underrepresented

**(R6 wt - Bacitracin) / (R6  $\Delta$ spTCS - Bacitracin)**

Accession	Description	Abundance Ratio: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	Abundance Ratio (log2): (R6 WT - Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)	Abundance Ratio P-Value: (R6 WT- Bacitracin) / (R6 DTCS- Bacitracin)
A0A0H2ZP20	Preprotein translocase, YajC subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=yajC-2 PE=4 SV=1	0,19	-2,39	3,5483E-13
A0A0H2ZLY7	Acyl carrier protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=acpP PE=3 SV=1	0,25	-2	1,2939E-09
B5E3R6	D-alanyl carrier protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 19F (strain G54) OX=512566 GN=dltC PE=3 SV=1	0,299	-1,74	2,9738E-08
A0A0H2ZP97	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1360 PE=3 SV=1	0,3	-1,74	1,2178E-07
A0A0H2ZMW6	Ribosomal silencing factor RsfS OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=rsfS PE=3 SV=1	0,305	-1,71	1,7536E-07
Q8DPA4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1268 PE=4 SV=1	0,308	-1,7	1,4847E-07
Q04MU7	UPF0356 protein SPD_0131 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0131 PE=3 SV=1	0,308	-1,7	2,2208E-07
A0A0H2ZMN3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC	0,321	-1,64	3,1725E-08

	7466) OX=373153 GN=SPD_0718 PE=4 SV=1			
A0A0H2ZRE4	Flavodoxin OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=fld PE=4 SV=1	0,331	-1,59	1,155E-06
Q8CYE2	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1611 PE=4 SV=1	0,335	-1,58	1,5867E-06
Q8CWN9	10 kDa chaperonin OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=groS PE=3 SV=1	0,35	-1,51	3,7467E-06
Q8CYW6	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0810 PE=4 SV=1	0,365	-1,46	5,0348E-07
A0A0H2ZLS3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1566 PE=4 SV=1	0,366	-1,45	8,0215E-06
P0A472	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rplL PE=3 SV=2	0,382	-1,39	2,1463E-05
Q8DPT7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1013 PE=4 SV=1	0,436	-1,2	4,5213E-05
A0A0H2ZPN8	Acyl carrier protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=acpP PE=3 SV=1	0,454	-1,14	0,00046818
Q8CYD7	UPF0337 protein spr1626 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1626 PE=3 SV=1	0,454	-1,14	0,00047869
A0A0H2ZMB4	UPF0109 protein SPD_0675 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0675 PE=3 SV=1	0,474	-1,08	0,00029242
Q8DMZ3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr2007 PE=4 SV=1	0,479	-1,06	0,00104506

Q8CZ15	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0586 PE=4 SV=1	0,497	-1,01	0,00191044
<b>(R6 wt - Bacitracin) / (R6 wt)</b>				
No protein significantly underrepresented				
<b>(R6 ΔspTCS - Bacitracin) / (R6 ΔspTCS)</b>				
No protein significantly underrepresented				

Annexe 5 : Tableau des protéines significativement surexprimées ou sous-exprimées dans le protéome des souches R800 *wt* et R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* traitées à la bacitracine

Comparaison entre la souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* et la souche R800 *wt* toutes deux traitées avec 1  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine

Protéines sous exprimées dans 1 $\Delta hk$ PcomX <i>hk</i>						
Accession	Description	Abundance Ratio: (1, DHK PcomX HK) / (1, WT)	Abundance Ratio (log2): (1, DHK PcomX HK) / (1, WT)	Abundance Ratio P-Value: (1, DHK PcomX HK) / (1, WT)	Abundance Ratio Adj. P-Value: (1, DHK PcomX HK) / (1, WT)	
A0A0H2ZMU9	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0995 PE=4 SV=1	0,23	-2,13	6,45E-07	3,36E-05	
Q8DNC3	Catabolite control protein A OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ccpA PE=4 SV=1	0,23	-2,11	7,86E-07	3,97E-05	
Q04KU2	Bifunctional protein GlnU OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=glnU PE=3 SV=1	0,25	-1,99	3,44E-06	1,64E-04	
A0A0H2ZQH7	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=mtnN PE=3 SV=1	0,26	-1,93	6,74E-06	3,12E-04	
Q8CYU3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0933 PE=4 SV=1	0,30	-1,75	4,63E-05	1,98E-03	
Q8DR07	Alkaline shock protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC	0,31	-1,71	6,85E-05	2,72E-03	

	BAA-255 / R6) OX=171101 GN=asp23 PE=4 SV=1					
Q04KI6	Nucleoid-associated protein SPD_0987 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0987 PE=3 SV=1	0,31	-1,68	8,96E-05	3,40E-03	
Q04J60	Transcriptional repressor NrdR OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=nrdR PE=3 SV=1	0,36	-1,46	7,38E-04	2,39E-02	
A0A0H2ZN00	CBS domain protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1658 PE=4 SV=1	0,37	-1,46	7,44E-04	2,39E-02	
<b>Q8DQ76</b>	<b>Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC- MSD PE=4 SV=1</b>	<b>0,38</b>	<b>-1,41</b>	<b>1,05E-03</b>	<b>3,17E-02</b>	<b>TM D</b>
A0A0T8S7R6	Dihydrofolate reductase OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=dhfR PE=3 SV=1	0,38	-1,41	1,12E-03	3,26E-02	
A0A0H2ZQM6	Phosphate ABC transporter, phosphate-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pstS PE=4 SV=1	0,38	-1,41	1,13E-03	3,26E-02	
A0A0H2ZLA9	PTS system, IIB component OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0233 PE=4 SV=1	0,39	-1,37	1,47E-03	4,09E-02	
A0A0H2ZQB4	Alpha-acetolactate decarboxylase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=budA PE=3 SV=1	0,39	-1,36	1,60E-03	4,36E-02	

Q8DQP5	Phosphotransferase system sugar-specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	0,40	-1,34	1,92E-03	5,00E-02	
Q8DPD7	LicD1 paralog OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=licD1 PE=4 SV=1	0,40	-1,34	1,95E-03	5,02E-02	
Q8DPN9	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacA PE=3 SV=1	0,40	-1,32	2,23E-03	5,58E-02	
A0A0H2ZNK7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1144 PE=4 SV=1	0,40	-1,32	2,34E-03	5,75E-02	
Q8DQE6	Phosphoglycolate phosphatase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=gph PE=4 SV=1	0,40	-1,31	2,43E-03	5,78E-02	
Q8DQK5	Hydroxyethylthiazole kinase 1 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=thiM1 PE=3 SV=2	0,41	-1,28	3,01E-03	6,92E-02	
Q04IS6	UPF0154 protein SPD_1662 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1662 PE=3 SV=1	0,41	-1,28	3,05E-03	6,92E-02	
A0A0H2ZND4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153	0,41	-1,28	3,09E-03	6,92E-02	

	GN=SPD_0466 PE=4 SV=1					
Q8CYK8	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1319 PE=4 SV=1	0,41	-1,28	3,15E-03	6,92E-02	
Q8DPQ4	Uracil-DNA glycosylase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ung PE=3 SV=2	0,42	-1,27	3,46E-03	7,30E-02	
Q8CYJ8	Endolytic murein transglycosylase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=mltG PE=3 SV=1	0,42	-1,26	3,61E-03	7,43E-02	
Q8DPP0	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacB PE=3 SV=1	0,42	-1,26	3,72E-03	7,57E-02	
Q8DQ39	Lactoylglutathione lyase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lguL PE=4 SV=1	0,44	-1,19	6,24E-03	1,18E-01	
A0A0H2ZMK 8	Hydrolase, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0925 PE=4 SV=1	0,44	-1,19	6,32E-03	1,19E-01	
A0A0H2ZQA 5	UPF0237 protein SPD_0220 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0220 PE=3 SV=1	0,45	-1,16	7,49E-03	1,30E-01	
Q8DNF7	Transcriptional activator OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=plcR PE=4 SV=1	0,45	-1,16	7,70E-03	1,32E-01	



Q04JI4	Probable cell division protein WhiA OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=whiA PE=3 SV=1	0,46	-1,13	9,33E-03	1,56E-01	
P0A4H8	Transcriptional regulatory protein CiaR OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ciaR PE=3 SV=1	0,46	-1,12	1,01E-02	1,65E-01	
A0A0H2ZM15	Sensor histidine kinase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0351 PE=4 SV=1	0,46	-1,12	1,02E-02	1,65E-01	
<b>Q8DQ77</b>	<b>Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1</b>	<b>0,47</b>	<b>-1,09</b>	<b>1,19E-02</b>	<b>1,86E-01</b>	<b>NBD</b>
A0A0H2ZQT8	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0585 PE=4 SV=1	0,47	-1,08	1,33E-02	2,05E-01	
Q8DNU1	Xylan esterase 1 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=axe1 PE=4 SV=1	0,48	-1,07	1,43E-02	2,17E-01	
A0A0H2ZPD2	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1034 PE=4 SV=1	0,48	-1,06	1,53E-02	2,29E-01	
Q8CWN9	10 kDa chaperonin OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=groS PE=3 SV=1	0,48	-1,05	1,63E-02	2,41E-01	

A0A0H2ZM85	HIT family protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0548 PE=4 SV=1	0,49	-1,03	1,84E-02	2,63E-01
A0A0H2ZNT6	ABC transporter, substrate binding lipoprotein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1463 PE=3 SV=1	0,49	-1,02	1,92E-02	2,69E-01
P66360	30S ribosomal protein S11 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rpsK PE=3 SV=1	0,49	-1,02	1,94E-02	2,70E-01

<b>Protéines surexprimées dans 1 <math>\Delta hk</math> PcomX <i>hk</i></b>					
<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b>Abundance Ratio: (1, DHK Pcomx HK) / (1, WT)</b>	<b>Abundance Ratio (log2): (1, DHK Pcomx HK) / (1, WT)</b>	<b>Abundance Ratio P-Value: (1, DHK Pcomx HK) / (1, WT)</b>	<b>Abundance Ratio Adj. P-Value: (1, DHK Pcomx HK) / (1, WT)</b>
Q8DR94	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0264 PE=4 SV=1	17,26	4,11	1,00E-17	1,85E-15
A0A0H2ZR U6	NADPH-dependent FMN reductase, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1375 PE=4 SV=1	13,49	3,75	1,00E-17	1,85E-15
A0A0U0K9 R6	Serine--tRNA ligase OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=serS PE=3 SV=1	11,65	3,54	1,00E-17	1,85E-15
Q8CY64	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1954 PE=4 SV=1	6,57	2,72	6,20E-11	5,74E-09
Q8DQX5	Type I restriction enzyme OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=hsdS PE=4 SV=1	3,54	1,83	9,70E-06	4,37E-04

Q8DN41	Putative transketolase n-terminal section OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=tktN PE=4 SV=1	2,92	1,55	1,71E-04	6,19E-03
A0A0H2ZN67	Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0109 PE=1 SV=1	2,90	1,53	1,91E-04	6,63E-03
Q8DN42	Putative transketolase c-terminal section OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=tktC PE=4 SV=1	2,60	1,38	7,88E-04	2,48E-02
A0A0H2ZPM1	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0681 PE=4 SV=1	2,54	1,34	1,05E-03	3,17E-02
Q8DQT9	6-phospho-beta-glucosidase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bgIH PE=3 SV=1	2,50	1,32	1,28E-03	3,61E-02
Q04M21	DNA polymerase IV OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=dinB PE=3 SV=1	2,44	1,29	1,65E-03	4,45E-02
A0A0H2ZPK8	Transcription antiterminator Lict OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=licT PE=4 SV=1	2,30	1,20	3,31E-03	7,16E-02
A0A0H2ZP18	PTS system, IIB component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1960 PE=4 SV=1	2,26	1,18	3,99E-03	8,01E-02
Q8CZD2	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0008 PE=4 SV=1	2,23	1,16	4,63E-03	9,20E-02
Q8DQU0	Phosphotransferase system sugar-specific EII component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EII PE=4 SV=1	2,14	1,10	6,90E-03	1,22E-01
Q8DMZ8	ABC transporter ATP-binding protein-anion transport	2,06	1,04	1,04E-02	1,66E-01

	OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1				
--	--	--	--	--	--

Comparaison entre la souche R800 Dhk PcomX hk traitées avec deux concentrations de bacitracine : 32 µg/ml et 1 µg/ml

<b>Protéines sous exprimées dans 32 <math>\Delta</math>hk PcomX hk</b>					
<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b>Abundance Ratio: (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)</b>	<b>Abundance Ratio (log2): (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)</b>	<b>Abundance Ratio P-Value: (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)</b>	<b>Abundance Ratio Adj. P-Value: (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)</b>
A0A0U0K9R6	Serine--tRNA ligase OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=serS PE=3 SV=1	0,11	-3,17	4,52E-06	5,80E-04
A0A0H2ZRU6	NADPH-dependent FMN reductase, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1375 PE=4 SV=1	0,16	-2,68	1,68E-05	1,55E-03
Q8DR94	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0264 PE=4 SV=1	0,26	-1,96	8,29E-05	5,23E-03
A0A0H2ZQK8	ABC transporter, substrate-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0090 PE=4 SV=1	0,28	-1,85	8,18E-06	9,10E-04
Q8CY64	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1954 PE=4 SV=1	0,29	-1,79	2,91E-03	7,43E-02
A0A0D6J6R6	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=trpF PE=3 SV=1	0,31	-1,71	3,38E-03	8,18E-02
Q8DN41	Putative transketolase n-terminal section OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=tktN PE=4 SV=1	0,34	-1,54	1,78E-04	9,91E-03
A0A0H2ZN67	Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0109 PE=1 SV=1	0,39	-1,36	5,43E-03	1,09E-01
Q8DN42	Putative transketolase c-terminal section OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=tktC PE=4 SV=1	0,40	-1,34	9,64E-04	3,83E-02
Q8DPP1	Tagatose-6-phosphate kinase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacC PE=3 SV=1	0,40	-1,33	1,51E-03	5,58E-02

A0A0H2Z P18	PTS system, IIB component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1960 PE=4 SV=1	0,40	-1,33	2,24E- 02	2,76E- 01
Q8DQT9	6-phospho-beta-glucosidase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=bgIH PE=3 SV=1	0,40	-1,33	8,95E- 04	3,64E- 02
Q04M21	DNA polymerase IV OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=dinB PE=3 SV=1	0,40	-1,32	1,49E- 02	2,24E- 01
Q8DNJ2	ABC transporter substrate-binding protein-ferric iron transport OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=fatB PE=4 SV=1	0,42	-1,27	2,26E- 03	7,00E- 02
Q8DPP6	6-phospho-beta-galactosidase 2 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacG2 PE=3 SV=1	0,42	-1,26	2,67E- 03	7,43E- 02
Q8DPP2	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA- 255 / R6) OX=171101 GN=lacD PE=3 SV=1	0,43	-1,23	2,46E- 03	7,43E- 02
Q8DPH9	Aspartate carbamoyltransferase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrB PE=3 SV=1	0,46	-1,12	5,56E- 03	1,11E- 01
A0A0H2Z PK8	Transcription antiterminator Lict OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=licT PE=4 SV=1	0,49	-1,04	3,19E- 02	3,12E- 01
Q8DPS4	Required for glycogen biosynthesis OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA- 255 / R6) OX=171101 GN=glgD PE=4 SV=1	0,49	-1,04	9,51E- 03	1,67E- 01
A0A0H2Z Q51	Sugar ABC transporter, permease protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=rafF PE=3 SV=1	0,49	-1,02	4,16E- 02	3,41E- 01

Protéines surexprimées dans 32 $\Delta hk$ PcomX <i>hk</i>					
Accession	Description	Abundance Ratio: (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)	Abundance Ratio (log2): (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)	Abundance Ratio P-Value: (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)	Abundance Ratio Adj. P-Value: (32, DHK Pcomx HK) / (1, DHK Pcomx HK)
Q8DQ76	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1	11,45	3,52	3,33E-15	5,56E-12
Q8DQ77	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	7,25	2,86	1,97E-10	1,10E-07

A0A0H2Z MU9	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0995 PE=4 SV=1	5,63	2,49	1,12E-04	6,58E-03
A0A0H2Z QM6	Phosphate ABC transporter, phosphate-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pstS PE=4 SV=1	5,35	2,42	2,48E-05	2,18E-03
G6J9R6	Preprotein translocase, SecG subunit OS=Streptococcus pneumoniae GA47502 OX=760839 GN=secG PE=4 SV=1	4,81	2,27	5,82E-05	4,04E-03
Q8DR07	Alkaline shock protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=asp23 PE=4 SV=1	4,64	2,21	1,47E-06	2,45E-04
Q8CWN9	10 kDa chaperonin OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=groS PE=3 SV=1	3,98	1,99	1,20E-05	1,18E-03
Q04KU2	Bifunctional protein GlmU OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=glmU PE=3 SV=1	3,87	1,95	1,64E-03	5,93E-02
Q8DQW6	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSP PE=4 SV=1	3,72	1,90	4,53E-04	2,16E-02
Q8CYJ8	Endolytic murein transglycosylase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=mltG PE=3 SV=1	3,64	1,86	4,39E-05	3,49E-03
Q04IS6	UPF0154 protein SPD_1662 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1662 PE=3 SV=1	3,63	1,86	4,67E-05	3,54E-03
A0A0H2Z NY8	Pneumococcal surface protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0579 PE=4 SV=1	3,62	1,86	3,51E-05	2,93E-03
A0A0H2Z MX6	Pneumococcal surface protein A OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pspA PE=4 SV=1	3,60	1,85	5,25E-05	3,81E-03
Q8CY72	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1927 PE=4 SV=1	3,56	1,83	3,98E-03	9,11E-02
A0A0H2Z NK5	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0040 PE=3 SV=1	3,40	1,76	2,72E-03	7,43E-02
Q8DMX7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr2028 PE=4 SV=1	3,22	1,69	2,43E-04	1,27E-02
A0A0H2Z NC1	Maltodextrase utilization protein MalA OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=malA PE=4 SV=1	3,20	1,68	2,99E-03	7,44E-02
Q8CYU3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0933 PE=4 SV=1	3,14	1,65	8,07E-03	1,48E-01
A0A0H2Z MI6	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1198 PE=4 SV=1	3,10	1,63	1,40E-02	2,12E-01

Q8CYI0	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1457 PE=4 SV=1	3,05	1,61	3,89E-03	9,11E-02
A0A0H2Z N00	CBS domain protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1658 PE=4 SV=1	3,02	1,60	1,45E-03	5,51E-02
A0A0H2Z LT7	Efflux transporter, RND family protein, MFP subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0686 PE=3 SV=1	3,00	1,58	5,93E-04	2,67E-02
A0A0T8M 5R6	O-Antigen Polymerase family OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=ERS022199_01662 PE=4 SV=1	2,98	1,57	1,06E-02	1,80E-01
Q8CYK8	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1319 PE=4 SV=1	2,93	1,55	2,59E-03	7,43E-02
A0A0H2Z NT6	ABC transporter, substrate binding lipoprotein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1463 PE=3 SV=1	2,90	1,53	8,90E-04	3,64E-02
A0A0H2Z MJ8	Aquaporin OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1569 PE=3 SV=1	2,87	1,52	2,55E-02	2,93E-01
A0A0H2Z QH7	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=mtnN PE=3 SV=1	2,86	1,52	2,01E-02	2,56E-01
A0A0H2Z LZ7	Biotin transporter OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0684 PE=3 SV=1	2,79	1,48	1,19E-02	1,99E-01
Q04J60	Transcriptional repressor NrdR OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=nrdR PE=3 SV=1	2,72	1,44	8,50E-03	1,52E-01
A0A0H2Z LA1	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1948 PE=4 SV=1	2,71	1,44	3,68E-02	3,23E-01
A0A0H2Z Q19	Thioredoxin family protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1714 PE=4 SV=1	2,71	1,44	1,31E-02	2,02E-01
Q8DR68	ATP-dependent protease ATP-binding subunit OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=clpL PE=4 SV=1	2,68	1,42	2,14E-03	6,87E-02
Q8CZB8	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0088 PE=4 SV=1	2,67	1,42	1,24E-02	1,99E-01
Q04KI6	Nucleoid-associated protein SPD_0987 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0987 PE=3 SV=1	2,66	1,41	1,95E-03	6,78E-02
Q8DQM7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0595 PE=4 SV=1	2,64	1,40	2,55E-03	7,43E-02
A0A0H2Z NX4	Alpha-amylase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=amy PE=3 SV=1	2,61	1,38	4,45E-03	1,00E-01

A0A0H2Z RM7	Maltodextrin ABC transporter, permease protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=malD PE=3 SV=1	2,58	1,37	2,81E- 03	7,43E- 02
Q8DPB3	Phosphate transport system permease protein PstA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA- 255 / R6) OX=171101 GN=pstA PE=3 SV=1	2,55	1,35	5,23E- 03	1,09E- 01
P0A4D8	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA- 255 / R6) OX=171101 GN=cshA PE=3 SV=1	2,53	1,34	3,99E- 03	9,11E- 02
Q8DMY0	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA2 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ecfA2 PE=3 SV=1	2,50	1,32	4,84E- 03	1,06E- 01
Q8DQF8	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=1 SV=1	2,47	1,31	4,54E- 03	1,01E- 01
Q8DNI6	Phosphotransferase system, trehalose-specific IIBC component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=treP PE=4 SV=1	2,47	1,30	5,28E- 03	1,09E- 01
Q8DQ98	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0777 PE=4 SV=1	2,46	1,30	3,10E- 02	3,12E- 01
P0A472	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rplL PE=3 SV=2	2,44	1,29	5,83E- 03	1,14E- 01
O30874	Choline binding protein A (Fragment) OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=cbpA PE=4 SV=1	2,39	1,26	7,22E- 03	1,35E- 01
Q8DP25	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1400 PE=4 SV=1	2,37	1,24	3,97E- 02	3,36E- 01
Q8DP77	ABC transporter ATP-binding protein- aspartate/glutamate transport OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NDB PE=4 SV=1	2,34	1,22	9,09E- 03	1,61E- 01
A0A0H2Z MC6	Maltodextrin ABC transporter, permease protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=malC PE=3 SV=1	2,33	1,22	1,90E- 02	2,47E- 01
P0A4N0	Oligopeptide transport system permease protein AmiD OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=amiD PE=3 SV=1	2,32	1,21	7,63E- 03	1,41E- 01
Q8DPB1	Phosphate-binding protein PstS 1 OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pstS1 PE=1 SV=1	2,31	1,21	1,01E- 02	1,76E- 01
A0A0T8S 7R6	Dihydrofolate reductase OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=dhfR PE=3 SV=1	2,30	1,20	3,24E- 02	3,12E- 01
Q8DPE7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NDB PE=4 SV=1	2,26	1,17	2,14E- 02	2,67E- 01
A0A0H2Z PN0	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0174 PE=4 SV=1	2,26	1,17	2,11E- 02	2,66E- 01



Q8DPD7	LicD1 paralog OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=licD1 PE=4 SV=1	2,25	1,17	3,43E-02	3,12E-01
Q8DQG5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ppiA PE=3 SV=1	2,25	1,17	1,30E-02	2,02E-01
Q8DQF7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0695 PE=1 SV=1	2,25	1,17	1,23E-02	1,99E-01
Q8DQY8	Trk transporter NAD+ binding protein-K+ transport OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=trkA PE=4 SV=1	2,23	1,16	1,20E-02	1,99E-01
Q8CYN1	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1221 PE=4 SV=1	2,21	1,14	1,56E-02	2,28E-01
Q8DNW8	ABC transporter ATP-binding protein-manganese transport OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=psaB PE=4 SV=1	2,20	1,14	1,61E-02	2,29E-01
A0A0H2Z N94	PTS system, fructose specific IIABC components OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0773 PE=4 SV=1	2,20	1,13	1,62E-02	2,29E-01
Q8DNY2	P-type ATPase-metal cation transport OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ctpE PE=4 SV=1	2,19	1,13	1,66E-02	2,31E-01
A0A0H2Z MH0	Zinc metalloprotease OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=eep PE=3 SV=1	2,19	1,13	1,69E-02	2,33E-01
Q8DPY8	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0931 PE=4 SV=1	2,17	1,11	1,84E-02	2,47E-01
Q7ZAK4	Autolysin (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lytA PE=4 SV=1	2,11	1,07	2,34E-02	2,76E-01
A0A0H2Z Q22	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1717 PE=4 SV=1	2,09	1,06	2,29E-02	2,76E-01
Q8DNB6	Penicillin-binding protein 2a OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pbp2a PE=4 SV=1	2,08	1,06	2,58E-02	2,95E-01
A0A0H2Z NB0	Histidine triad protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1037 PE=4 SV=1	2,07	1,05	2,67E-02	2,98E-01
Q8DQH2	PTS glucose-specific enzyme IIABC component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ptsG PE=4 SV=1	2,06	1,04	2,84E-02	3,04E-01
Q8DNT3	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1	2,03	1,02	3,24E-02	3,12E-01
P0A2Z5	ATP synthase subunit delta OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=atpH PE=1 SV=1	2,02	1,02	3,28E-02	3,12E-01

Q8DMW2	Serine protease OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=sphtra PE=4 SV=1	2,02	1,01	3,39E-02	3,12E-01
P0A3M6	Penicillin-binding protein 2B OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=penA PE=1 SV=1	2,01	1,01	3,42E-02	3,12E-01
A0A0H2ZPF4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0754 PE=4 SV=1	2,01	1,01	3,43E-02	3,12E-01
A0A0H2ZPN9	Amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein/permease protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1098 PE=3 SV=1	2,01	1,01	3,44E-02	3,12E-01
P60935	Undecaprenyl-diphosphatase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=uppP PE=3 SV=1	2,01	1,01	3,09E-02	3,12E-01
Q04HT8	ATP synthase gamma chain OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=atpG PE=3 SV=1	2,01	1,01	3,51E-02	3,17E-01

Comparaison entre la souche R800  $\Delta hk$  PcomX *hk* traitée avec 32  $\mu\text{g/mL}$  de bacitracine et la souche R800 *wt* traitée avec 1  $\mu\text{g/mL}$

Protéines sous-exprimées dans 32 $\Delta hk$ PcomX <i>hk</i>					
Accession	Description	Abundance Ratio: (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)	Abundance Ratio (log2): (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)	Abundance Ratio P-Value: (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)	Abundance Ratio Adj. P-Value: (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)
A0A0H2ZQK8	ABC transporter, substrate-binding protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0090 PE=4 SV=1	0,21	-2,25	1,02E-09	2,85E-07
Q8DPP0	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacB PE=3 SV=1	0,24	-2,05	2,81E-08	3,91E-06
Q8DPP1	Tagatose-6-phosphate kinase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacC PE=3 SV=1	0,28	-1,85	5,53E-07	6,15E-05
Q8DPP2	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacD PE=3 SV=1	0,28	-1,84	6,40E-07	6,68E-05
Q8DPN9	Galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=lacA PE=3 SV=1	0,28	-1,82	9,09E-07	8,92E-05
Q8DNJ2	ABC transporter substrate-binding protein-ferric iron transport OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=fatB PE=4 SV=1	0,36	-1,48	6,67E-05	3,01E-03

A0A0H2Z N45	PTS system, IIB component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0560 PE=4 SV=1	0,36	-1,47	7,68E- 05	3,28E- 03
Q8DRL3	Phosphotransferase system sugar-specific EIIB component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=PTS-EIIB PE=4 SV=1	0,41	-1,27	6,30E- 04	1,74E- 02
Q8DQL5	Orotate phosphoribosyltransferase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA- 255 / R6) OX=171101 GN=pyrE PE=3 SV=1	0,43	-1,21	1,14E- 03	2,89E- 02
A0A0H2Z P11	PTS system IIA component, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0559 PE=4 SV=1	0,43	-1,20	1,25E- 03	3,07E- 02
Q04MY5	UPF0176 protein SPD_0091 OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0091 PE=3 SV=1	0,44	-1,20	1,29E- 03	3,11E- 02
Q8DQ37	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), catalytic subunit OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pyrDB PE=3 SV=2	0,44	-1,18	1,64E- 03	3,71E- 02
Q8CWP4	Sucrose phosphorylase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=gtfA PE=3 SV=1	0,45	-1,16	1,95E- 03	4,17E- 02
Q8DPS4	Required for glycogen biosynthesis OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA- 255 / R6) OX=171101 GN=glgD PE=4 SV=1	0,45	-1,15	2,14E- 03	4,52E- 02
Q04LJ3	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pyrF PE=3 SV=1	0,48	-1,06	4,66E- 03	7,77E- 02

<b>Protéines surexprimées dans 32 <math>\Delta hk</math> PcomX <i>hk</i></b>						
<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b>Abundance Ratio: (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)</b>	<b>Abundance Ratio (log2): (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)</b>	<b>Abundance Ratio P- Value: (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)</b>	<b>Abundance Ratio Adj. P- Value: (32, DHK PcomX HK) / (1, WT)</b>	
G6J9R6	Preprotein translocase, SecG subunit OS=Streptococcus pneumoniae GA47502 OX=760839 GN=secG PE=4 SV=1	8,96	3,16	1,00E- 17	8,34E- 15	
A0A0H2Z MX6	Pneumococcal surface protein A OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=pspA PE=4 SV=1	5,73	2,52	2,11E- 12	8,82E- 10	
Q8DR94	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0264 PE=4 SV=1	4,24	2,08	5,42E- 09	1,13E- 06	

<b>Q8DQ76</b>	<b>Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSD PE=4 SV=1</b>	<b>4,14</b>	<b>2,05</b>	<b>9,63E-09</b>	<b>1,79E-06</b>	<b>TM D</b>
O30874	Choline binding protein A (Fragment) OS=Streptococcus pneumoniae OX=1313 GN=cbpA PE=4 SV=1	4,08	2,03	1,40E-08	2,12E-06	
P60935	Undecaprenyl-diphosphatase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=uppP PE=3 SV=1	3,51	1,81	3,75E-07	4,47E-05	
<b>Q8DQ77</b>	<b>Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-NBD PE=4 SV=1</b>	<b>3,26</b>	<b>1,70</b>	<b>1,74E-06</b>	<b>1,53E-04</b>	<b>NB D</b>
A0A0H2ZNY7	Amino acid ABC transporter, permease protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1330 PE=3 SV=1	3,12	1,64	3,98E-06	3,02E-04	
Q8DPA4	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1268 PE=4 SV=1	2,88	1,53	1,71E-05	1,10E-03	
A0A0H2ZMJ8	Aquaporin OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1569 PE=3 SV=1	2,87	1,52	1,84E-05	1,13E-03	
Q8DQX5	Type I restriction enzyme OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=hsdS PE=4 SV=1	2,85	1,51	2,12E-05	1,22E-03	
A0A0H2ZPQ3	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1769 PE=3 SV=1	2,80	1,48	2,96E-05	1,59E-03	
Q8CZ93	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0155 PE=4 SV=1	2,74	1,46	4,09E-05	2,01E-03	
A0A0H2ZP20	Preprotein translocase, YajC subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=yajC-2 PE=4 SV=1	2,74	1,45	4,33E-05	2,06E-03	
Q8DMX8	Phosphatidylglycerophosphate synthase OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pgsA PE=3 SV=1	2,73	1,45	4,47E-05	2,07E-03	
A0A0H2ZNB1	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1426 PE=4 SV=1	2,59	1,37	1,11E-04	4,20E-03	
A0A0H2ZNY3	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) family protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_2018 PE=4 SV=1	2,59	1,37	1,11E-04	4,20E-03	
Q8CY72	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr1927 PE=4 SV=1	2,50	1,32	1,94E-04	6,36E-03	
A0A0H2ZNK5	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0040 PE=3 SV=1	2,47	1,30	2,32E-04	7,45E-03	
Q8DQ98	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr0777 PE=4 SV=1	2,42	1,27	3,17E-04	9,80E-03	

A0A0H2Z PB8	Sugar ABC transporter, permease protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0742 PE=3 SV=1	2,40	1,26	3,59E- 04	1,09E- 02
Q8DQW6	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ABC-MSP PE=4 SV=1	2,36	1,24	4,71E- 04	1,38E- 02
A0A0H2Z NY8	Pneumococcal surface protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0579 PE=4 SV=1	2,35	1,23	5,02E- 04	1,44E- 02
Q8DNA8	Permease IIC component OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=ptcC PE=4 SV=1	2,34	1,23	5,17E- 04	1,46E- 02
A0A0H2Z PB0	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0751 PE=4 SV=1	2,31	1,21	6,46E- 04	1,74E- 02
A0A0H2Z QB0	Amino acid ABC transporter, permease protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0719 PE=3 SV=1	2,28	1,19	7,66E- 04	2,00E- 02
Q8DPB3	Phosphate transport system permease protein PstA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=pstA PE=3 SV=1	2,20	1,13	1,31E- 03	3,11E- 02
A0A0H2Z LT7	Efflux transporter, RND family protein, MFP subunit OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0686 PE=3 SV=1	2,16	1,11	1,58E- 03	3,60E- 02
Q8DQP7	Cell wall-associated serine proteinase PrtA OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=prtA PE=4 SV=1	2,15	1,10	1,78E- 03	3,96E- 02
A0A0H2Z MI6	Membrane protein, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1198 PE=4 SV=1	2,14	1,10	1,81E- 03	3,97E- 02
A0A0H2Z RU6	NADPH-dependent FMN reductase, putative OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1375 PE=4 SV=1	2,10	1,07	2,36E- 03	4,91E- 02
Q8DPQ6	Probable multidrug resistance protein NorM OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=norM PE=3 SV=1	2,09	1,06	2,53E- 03	5,20E- 02
<b>Q8DNX6</b>	<b>Response regulator OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=rr01 PE=4 SV=1</b>	<b>2,05</b>	<b>1,04</b>	<b>3,20E- 03</b>	<b>6,32E- 02</b>
Q8DMX7	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101 GN=spr2028 PE=4 SV=1	2,03	1,02	3,75E- 03	7,10E- 02
A0A0H2Z R39	Uncharacterized protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_0803 PE=4 SV=1	2,01	1,01	4,05E- 03	7,47E- 02
A0A0H2Z PN9	Amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein/permease protein OS=Streptococcus	2,01	1,01	4,07E- 03	7,47E- 02

	pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1098 PE=3 SV=1					
A0A0H2Z NB0	Histidine triad protein OS=Streptococcus pneumoniae serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) OX=373153 GN=SPD_1037 PE=4 SV=1	2,01	1,01	4,23E-03	7,58E-02	

# Partie V : Références

- Abeyta, Melanie, Gail G. Hardy, et Janet Yother. 2003. « Genetic Alteration of Capsule Type but Not PspA Type Affects Accessibility of Surface-Bound Complement and Surface Antigens of *Streptococcus pneumoniae* ». *Infection and Immunity* 71 (1): 218-25. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.218-225.2003>.
- Abraham, E. P., et E. Chain. 1940. « An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin ». *Reviews of Infectious Diseases* 10 (4): 677-78.
- Ahmad, Ashfaq, Sidra Majaz, et Faisal Nouroz. 2020. « Two-Component Systems Regulate ABC Transporters in Antimicrobial Peptide Production, Immunity and Resistance ». *Microbiology* 166 (1): 4-20. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000823>.
- Ahuja, Shivani, Lionel Rougé, Danielle L. Swem, Jawahar Sudhamsu, Ping Wu, Stephen J. Russell, Mary Kate Alexander, et al. 2015. « Structural Analysis of Bacterial ABC Transporter Inhibition by an Antibody Fragment ». *Structure (London, England: 1993)* 23 (4): 713-23. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.01.020>.
- Almén, Markus, Karl JV Nordström, Robert Fredriksson, et Helgi B Schiöth. 2009. « Mapping the Human Membrane Proteome: A Majority of the Human Membrane Proteins Can Be Classified According to Function and Evolutionary Origin ». *BMC Biology* 7 (1): 50. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-50>.
- Ambudkar, S. V., I. H. Lelong, J. Zhang, et C. Cardarelli. 1998. « Purification and Reconstitution of Human P-Glycoprotein ». *Methods in Enzymology* 292: 492-504. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(98\)92038-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(98)92038-9).
- Ambudkar, Suresh V., In-Wha Kim, Di Xia, et Zuben E. Sauna. 2006. « The A-Loop, a Novel Conserved Aromatic Acid Subdomain Upstream of the Walker A Motif in ABC Transporters, Is Critical for ATP Binding ». *FEBS Letters* 580 (4): 1049-55. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.051>.
- Amerikova, Meri, Ivanka Pencheva El-Tibi, Vania Maslarska, Stanislav Bozhanov, et Konstantin Tachkov. 2019. « Antimicrobial Activity, Mechanism of Action, and Methods for Stabilisation of Defensins as New Therapeutic Agents ». *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 33 (1): 671-82. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1611385>.
- Andreassen, Patrick Rosendahl, Claudia Trappetti, Vikrant Minhas, Flemming Damgaard Nielsen, Kevin Pakula, James C. Paton, et Mikkel Girke Jørgensen. 2020. « Host-glycan metabolism is regulated by a species-conserved two-component system in *Streptococcus pneumoniae* ». *PLoS Pathogens* 16 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008332>.
- Angius, Federica, Oana Iliaoaia, Amira Amrani, Annabelle Suisse, Lindsay Rosset, Amélie Legrand, Abbas Abou-Hamdan, Marc Uzan, Francesca Zito, et Bruno Miroux. 2018. « A Novel Regulation Mechanism of the T7 RNA Polymerase Based Expression System Improves Overproduction and Folding of Membrane Proteins ». *Scientific Reports* 8 (1): 8572. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26668-y>.
- Appelbaum, Peter C. 2002. « Resistance among *Streptococcus Pneumoniae*: Implications for Drug Selection ». *Clinical Infectious Diseases* 34 (12): 1613-20. <https://doi.org/10.1086/340400>.
- Aprianto, Rieza, Jelle Slager, Siger Holsappel, et Jan-Willem Veening. 2018. « High-Resolution Analysis of the Pneumococcal Transcriptome under a Wide Range of Infection-Relevant Conditions ». *Nucleic Acids Research*, août. <https://doi.org/10.1093/nar/gky750>.
- Artem Stetsenko et Albert Guskov. 2017. « An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization ». *Crystals* 7 (7): 197. <https://doi.org/10.3390/cryst7070197>.
- Aslam, Bilal, Wei Wang, Muhammad Imran Arshad, Mohsin Khurshid, Saima Muzammil, Muhammad Hidayat Rasool, Muhammad Atif Nisar, et al. 2018. « Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis ». *Infection and Drug Resistance* 11 (octobre): 1645-58. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- Avitabile, Concetta, Luca Domenico D'Andrea, et Alessandra Romanelli. 2015. « Circular Dichroism Studies on the Interactions of Antimicrobial Peptides with Bacterial Cells ». *Scientific Reports* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/srep04293>.
- Bahar, Ali, et Dacheng Ren. 2013a. « Antimicrobial Peptides ». *Pharmaceuticals* 6 (12): 1543-75. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>.



- . 2013b. « Antimicrobial Peptides ». *Pharmaceuticals* 6 (12): 1543-75. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>.
- Bailey, Marne, Tobin Chettiath, et Alexander S. Mankin. 2008. « Induction of erm(C) Expression by Noninducing Antibiotics ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (3): 866-74. <https://doi.org/10.1128/AAC.01266-07>.
- Bakari, Sana, François André, Daphné Seigneurin-Berny, Marcel Delaforge, Norbert Rolland, et Annie Frelet-Barrand. 2014. « Lactococcus Lactis: Recent Developments in Functional Expression of Membrane Proteins ». In *Membrane Proteins Production for Structural Analysis*, édité par Isabelle Mus-Veteau, 107-32. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0662-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0662-8_5).
- Bangham, A. D., M. M. Standish, et J. C. Watkins. 1965. « Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids ». *Journal of Molecular Biology* 13 (1): 238-IN27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- Barnoy, Shoshana, Hanan Gancz, Yuewei Zhu, Cary L. Honnold, Daniel V. Zurawski, et Malabi M. Venkatesan. 2017. « The Galleria mellonella larvae as an in vivo model for evaluation of Shigella virulence ». *Gut Microbes* 8 (4): 335-50. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1293225>.
- Bartual, Sergio G., Daniel Straume, Gro Anita Stamsås, Inés G. Muñoz, Carlos Alfonso, Martín Martínez-Ripoll, Leiv Sigve Håvarstein, et Juan A. Hermoso. 2014. « Structural Basis of PcsB-Mediated Cell Separation in Streptococcus Pneumoniae ». *Nature Communications* 5 (mai): 3842. <https://doi.org/10.1038/ncomms4842>.
- Baumgarten, Thomas, Susan Schlegel, Samuel Wagner, Mirjam Löw, Jonas Eriksson, Ida Bonde, Markus J. Herrgård, et al. 2017. « Isolation and Characterization of the E. Coli Membrane Protein Production Strain Mutant56(DE3) ». *Scientific Reports* 7 (1): 45089. <https://doi.org/10.1038/srep45089>.
- Bayburt, Timothy H., et Stephen G. Sligar. 2010. « Membrane Protein Assembly into Nanodiscs ». *FEBS letters* 584 (9): 1721-27. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.024>.
- Becker, P., R. Hakenbeck, et B. Henrich. 2009a. « An ABC Transporter of Streptococcus Pneumoniae Involved in Susceptibility to Vancomycin and Bacitracin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (5): 2034-41. <https://doi.org/10.1128/AAC.01485-08>.
- . 2009b. « An ABC Transporter of Streptococcus Pneumoniae Involved in Susceptibility to Vancomycin and Bacitracin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (5): 2034-41. <https://doi.org/10.1128/AAC.01485-08>.
- Beek, Josy ter, Albert Guskov, et Dirk Jan Slotboom. 2014. « Structural Diversity of ABC Transporters ». *The Journal of General Physiology* 143 (4): 419-35. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>.
- Been, Mark de, Marieke J. Bart, Tjakko Abee, Roland J. Siezen, et Christof Francke. 2008. « The Identification of Response Regulator-Specific Binding Sites Reveals New Roles of Two-Component Systems in Bacillus Cereus and Closely Related Low-GC Gram-Positives ». *Environmental Microbiology* 10 (10): 2796-2809. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01700.x>.
- Beiter, Katharina, Florian Wartha, Robert Hurwitz, Staffan Normark, Arturo Zychlinsky, et Birgitta Henriques-Normark. 2008. « The Capsule Sensitizes Streptococcus pneumoniae to  $\alpha$ -Defensin Human Neutrophil Proteins 1 to 3 ». *Infection and Immunity* 76 (8): 3710-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01748-07>.
- Bennett, Bryson D, Elizabeth H Kimball, Melissa Gao, Robin Osterhout, Stephen J Van Dien, et Joshua D Rabinowitz. 2009. « Absolute Metabolite Concentrations and Implied Enzyme Active Site Occupancy in Escherichia coli ». *Nature chemical biology* 5 (8): 593-99. <https://doi.org/10.1038/nchembio.186>.
- Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal, et S. Hammerschmidt. 2001. « Alpha-Enolase of Streptococcus Pneumoniae Is a Plasmin(Ogen)-Binding Protein Displayed on the Bacterial Cell Surface ». *Molecular Microbiology* 40 (6): 1273-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02448.x>.
- Bergmann, Simone, et Sven Hammerschmidt. 2006. « Versatility of Pneumococcal Surface Proteins ». *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 2): 295-303. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28610-0>.
- Bernard, R., A. Guiseppe, M. Chippaux, M. Foglino, et F. Denizot. 2007a. « Resistance to Bacitracin in Bacillus Subtilis: Unexpected Requirement of the BceAB ABC Transporter in the Control of Expression of Its

- Own Structural Genes ». *Journal of Bacteriology* 189 (23): 8636-42. <https://doi.org/10.1128/JB.01132-07>.
- . 2007b. « Resistance to Bacitracin in *Bacillus Subtilis*: Unexpected Requirement of the BceAB ABC Transporter in the Control of Expression of Its Own Structural Genes ». *Journal of Bacteriology* 189 (23): 8636-42. <https://doi.org/10.1128/JB.01132-07>.
- Bhate, Manasi P., Kathleen S. Molnar, Mark Goulian, et William F. DeGrado. 2015. « Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures ». *Structure* 23 (6): 981-94. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>.
- Biemans-Oldehinkel, Esther, Mark K. Doeven, et Bert Poolman. 2006. « ABC Transporter Architecture and Regulatory Roles of Accessory Domains ». *FEBS Letters* 580 (4): 1023-35. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.079>.
- Birkenmeyer, R. D., et F. Kagan. 1970. « Lincomycin. XI. Synthesis and Structure of Clindamycin. A Potent Antibacterial Agent ». *Journal of Medicinal Chemistry* 13 (4): 616-19. <https://doi.org/10.1021/jm00298a007>.
- Boekhorst, Jos, Mark W. H. J. de Been, Michiel Kleerebezem, et Roland J. Siezen. 2005. « Genome-Wide Detection and Analysis of Cell Wall-Bound Proteins with LPxTG-Like Sorting Motifs ». *Journal of Bacteriology* 187 (14): 4928-34. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4928-4934.2005>.
- Bogaert, D., R. De Groot, et P. W. M. Hermans. 2004. « *Streptococcus Pneumoniae* Colonisation: The Key to Pneumococcal Disease ». *The Lancet. Infectious Diseases* 4 (3): 144-54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7).
- Booth, Paula J., Sabine L. Flitsch, Lawrence J. Stern, Duncan A. Greenhalgh, Peter S. Kim, et H. Gobind Khorana. 1995. « Intermediates in the Folding of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin ». *Nature Structural Biology* 2 (2): 139-43. <https://doi.org/10.1038/nsb0295-139>.
- Borsa, Noemi, Marta Di Pasquale, et Marcos I. Restrepo. 2019. « Animal Models of Pneumococcal pneumonia ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174220>.
- Borst, P., et R. Oude Elferink. 2002. « Mammalian ABC Transporters in Health and Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 71 (1): 537-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>.
- Boyer, Laurent, Nicholas Paquette, Neal Silverman, et Lynda M. Stuart. 2012. « Bacterial Effectors: Learning on the Fly ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 710: 29-36. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5638-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5638-5_4).
- Bozdogan, Bülent, Sébastien Galopin, et Roland Leclercq. 2004. « Characterization of a New erm-Related Macrolide Resistance Gene Present in Probiotic Strains of *Bacillus clausii* ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1): 280-84. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.280-284.2004>.
- Bradford, M. M. 1976. « A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding ». *Analytical Biochemistry* 72 (mai): 248-54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Breukink, Eefjan, et Ben de Kruijff. 2006. « Lipid II as a Target for Antibiotics ». *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (4): 321-23. <https://doi.org/10.1038/nrd2004>.
- Breyton, Cécile, Waqas Javed, Annelise Vermot, Charles-Adrien Arnaud, Christine Hajjar, Jérôme Dupuy, Isabelle Petit-Hartlein, et al. 2019. « Assemblies of Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG) and LMNG-Solubilized Membrane Proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1861 (5): 939-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.02.003>.
- Bridy-Pappas, Angela E., Marya B. Margolis, Kimberly J. Center, et Daniel J. Isaacman. 2005. « *Streptococcus Pneumoniae*: Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention ». *Pharmacotherapy* 25 (9): 1193-1212. <https://doi.org/10.1592/phco.2005.25.9.1193>.
- Brogden, K A, M Ackermann, et K M Huttner. 1997. « Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (7): 1615-17.
- Brogden, Kim A. 2005. « Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? ». *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238-50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.

- Brötz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds, et H. G. Sahl. 1998. « The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (1): 154-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.154>.
- Brumfitt, W. 2002. « Nisin, Alone and Combined with Peptidoglycan-Modulating Antibiotics: Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50 (5): 731-34. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf190>.
- Burchall, J. J. 1973. « Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole. II ». *The Journal of Infectious Diseases* 128 (novembre): Suppl: 437-441. [https://doi.org/10.1093/infdis/128.supplement\\_3.s437](https://doi.org/10.1093/infdis/128.supplement_3.s437).
- Butler, J. C., J. Hofmann, M. S. Cetron, J. A. Elliott, R. R. Facklam, et R. F. Breiman. 1996. « The Continued Emergence of Drug-Resistant *Streptococcus Pneumoniae* in the United States: An Update from the Centers for Disease Control and Prevention's Pneumococcal Sentinel Surveillance System ». *The Journal of Infectious Diseases* 174 (5): 986-93. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.5.986>.
- Byeon, In-Ja L., Zhengtao Shi, et Ming-Daw Tsai. 1995. « Mechanism of adenylate kinase. The essential lysine helps to orient the phosphates and the active site residues to proper conformations ». *Biochemistry* 34 (10): 3172-82. <https://doi.org/10.1021/bi00010a006>.
- Campos, Miguel A., Miguel A. Vargas, Verónica Regueiro, Catalina M. Llompert, Sebastián Albertí, et José A. Bengoechea. 2004. « Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides ». *Infection and Immunity* 72 (12): 7107-14. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004>.
- Caspari, Oliver D., et Ingrid Lafontaine. 2021. « The Role of Antimicrobial Peptides in the Evolution of Endosymbiotic Protein Import ». Édité par John M. Leong. *PLOS Pathogens* 17 (4): e1009466. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009466>.
- Cassone, Marco, Alyssa L. Gagne, Lynn A. Spruce, Steven H. Seeholzer, et Michael E. Sebert. 2012. « The HtrA Protease from *Streptococcus Pneumoniae* Digests Both Denatured Proteins and the Competence-Stimulating Peptide ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (46): 38449-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391482>.
- Castle, Madalyn, Arpi Nazarian, San San Yi, et Paul Tempst. 1999. « Lethal Effects of Apidaecin on *Escherichia Coli* Involve Sequential Molecular Interactions with Diverse Targets ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (46): 32555-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32555>.
- CDC. 2019. « Pneumococcal Disease | Home | CDC ». 5 décembre 2019. <https://www.cdc.gov/pneumococcal/index.html>.
- Chae, Pil Seok, Søren G. F. Rasmussen, Rohini Rana, Kamil Gotfryd, Richa Chandra, Michael A. Goren, Andrew C. Kruse, et al. 2010. « Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins ». *Nature methods* 7 (12): 1003-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1526>.
- Chambers, Moria C., Karla L. Lightfield, et David S. Schneider. 2012. « How the Fly Balances Its Ability to Combat Different Pathogens ». Édité par Kenneth D. Vernick. *PLoS Pathogens* 8 (12): e1002970. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002970>.
- Chang, Bin, Masatomo Morita, Ken-ichi Lee, et Makoto Ohnishi. 2018. « Whole-Genome Sequence Analysis of *Streptococcus Pneumoniae* Strains That Cause Hospital-Acquired Pneumonia Infections ». Édité par Betty A. Forbes. *Journal of Clinical Microbiology* 56 (5): e01822-17, /jcm/56/5/e01822-17.atom. <https://doi.org/10.1128/JCM.01822-17>.
- Chaptal, Vincent, Frédéric Delolme, Arnaud Kilburg, Sandrine Magnard, Cédric Montigny, Martin Picard, Charlene Prier, et al. 2017. « Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins ». *Scientific Reports* 7 (février): 41751. <https://doi.org/10.1038/srep41751>.
- Chen, Jue, Gang Lu, Jeffrey Lin, Amy L. Davidson, et Florante A. Quioco. 2003. « A Tweezers-like Motion of the ATP-Binding Cassette Dimer in an ABC Transport Cycle ». *Molecular Cell* 12 (3): 651-61. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.004>.
- Chen, Raymond F., et Jay R. Knutson. 1988. « Mechanism of Fluorescence Concentration Quenching of Carboxyfluorescein in Liposomes: Energy Transfer to Nonfluorescent Dimers ». *Analytical Biochemistry* 172 (1): 61-77. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90412-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90412-5).

- Chen, Tingting, Yong Wang, Yang Yang, Kaikai Yu, Xiangliao Cao, Fang Su, Huanbai Xu, et al. 2019. « Gramicidin inhibits human gastric cancer cell proliferation, cell cycle and induced apoptosis ». *Biological Research* 52 (novembre). <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0264-1>.
- Cheung, Jonah, et Wayne A. Hendrickson. 2010. « Sensor Domains of Two-Component Regulatory Systems ». *Current opinion in microbiology* 13 (2): 116-23. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.016>.
- Cheung-Lee, Wai Ling, Madison E. Parry, Alexis Jaramillo Cartagena, Seth A. Darst, et A. James Link. 2019. « Discovery and Structure of the Antimicrobial Lasso Peptide Citrocin ». *Journal of Biological Chemistry*, mars, jbc.RA118.006494. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006494>.
- Chiavolini, D., G. Pozzi, et S. Ricci. 2008. « Animal Models of Streptococcus Pneumoniae Disease ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (4): 666-85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-08>.
- Chipot, Christophe, François Dehez, Jason R. Schnell, Nicole Zitzmann, Eva Pebay-Peyroula, Laurent J. Catoire, Bruno Miroux, et al. 2018. « Perturbations of Native Membrane Protein Structure in Alkyl Phosphocholine Detergents: A Critical Assessment of NMR and Biophysical Studies ». *Chemical Reviews* 118 (7): 3559-3607. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00570>.
- Chitnis, S. N., K. S. Prasad, et P. M. Bhargava. 1987. « Bacteriolytic Activity of Seminalplasmin ». *Journal of General Microbiology* 133 (5): 1265-71. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-5-1265>.
- Cho, Ju Hyun, Bong Hyun Sung, et Sun Chang Kim. 2009. « Buforins: Histone H2A-Derived Antimicrobial Peptides from Toad Stomach ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1788 (8): 1564-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.025>.
- Chopra, Ian, et Marilyn Roberts. 2001. « Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2): 232-60. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>.
- Choudhury, H. G., Z. Tong, I. Mathavan, Y. Li, S. Iwata, S. Zirah, S. Rebuffat, H. W. van Veen, et K. Beis. 2014. « Structure of an Antibacterial Peptide ATP-Binding Cassette Transporter in a Novel Outward Occluded State ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (25): 9145-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320506111>.
- Chufan, Eduardo E., Khyati Kapoor, Hong-May Sim, Satyakam Singh, Tanaji T. Talele, Stewart R. Durell, et Suresh V. Ambudkar. 2013. « Multiple Transport-Active Binding Sites Are Available for a Single Substrate on Human P-Glycoprotein (ABCB1) ». *PLOS ONE* 8 (12): e82463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082463>.
- Clausen, Valerie A., Weonhye Bae, John Throup, Martin K. R. Burnham, Martin Rosenberg, et Nicola G. Wallis. 2003. « Biochemical Characterization of the First Essential Two-Component Signal Transduction System from Staphylococcus Aureus and Streptococcus Pneumoniae ». *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 5 (4): 252-60. <https://doi.org/10.1159/000071077>.
- Clemens, Rebecca, Julia Zschke-Kriesche, Sakshi Khosa, et Sander H. J. Smits. 2018. « Insight into Two ABC Transporter Families Involved in Lantibiotic Resistance ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 4 (janvier): 91. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00091>.
- Cockran, Riana, Jenny A. Herbert, Timothy J. Mitchell, Thérèse Dix-Peek, Caroline Dickens, Ronald Anderson, et Charles Feldman. 2014. « Exposure of a 23F Serotype Strain of Streptococcus pneumoniae to Cigarette Smoke Condensate Is Associated with Selective Upregulation of Genes Encoding the Two-Component Regulatory System 11 (TCS11) ». *BioMed Research International* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/976347>.
- Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon, et G. Deléage. 2000. « NPS@: Network Protein Sequence Analysis ». *Trends in Biochemical Sciences* 25 (3): 147-50. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01540-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01540-6).
- Cools, Freya, Eveline Torfs, Juliana Aizawa, Bieke Vanhoutte, Louis Maes, Guy Caljon, Peter Delputte, Davie Cappoen, et Paul Cos. 2019. « Optimization and Characterization of a Galleria Mellonella Larval Infection Model for Virulence Studies and the Evaluation of Therapeutics Against Streptococcus Pneumoniae ». *Frontiers in Microbiology* 10 (février): 311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00311>.
- Cornaglia, G., A. Mazzariol, R. Fontana, et G. Satta. 1996. « Diffusion of Carbapenems through the Outer Membrane of Enterobacteriaceae and Correlation of Their Activities with Their Periplasmic

- Concentrations ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 2 (2): 273-76.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.273>.
- Cornick, J. E., et S. D. Bentley. 2012. « Streptococcus Pneumoniae: The Evolution of Antimicrobial Resistance to Beta-Lactams, Fluoroquinolones and Macrolides ». *Microbes and Infection* 14 (7-8): 573-83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.01.012>.
- Cotter, Paul D., Colin Hill, et R. Paul Ross. 2005. « Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food ». *Nature Reviews Microbiology* 3 (10): 777-88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>.
- Crow, Allister, Nicholas P. Greene, Elise Kaplan, et Vassilis Koronakis. 2017. « Structure and Mechanotransmission Mechanism of the MacB ABC Transporter Superfamily ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (47): 12572-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712153114>.
- Cruz-Chamorro, Lidia, María A. Puertollano, Elena Puertollano, Gerardo Alvarez de Cienfuegos, et Manuel A. de Pablo. 2006. « In Vitro Biological Activities of Magainin Alone or in Combination with Nisin ». *Peptides* 27 (6): 1201-9. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.11.008>.
- Cudic, P., J. K. Kranz, D. C. Behenna, R. G. Kruger, H. Tadesse, A. J. Wand, Y. I. Veklich, J. W. Weisel, et D. G. McCafferty. 2002. « Complexation of Peptidoglycan Intermediates by the Lipoglycopeptide Antibiotic Ramoplanin: Minimal Structural Requirements for Intermolecular Complexation and Fibril Formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11): 7384-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.102192099>.
- Dang-Van, A., G. Tiraby, J. F. Acar, W. V. Shaw, et D. H. Bouanchaud. 1978. « Chloramphenicol Resistance in Streptococcus Pneumoniae: Enzymatic Acetylation and Possible Plasmid Linkage ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 13 (4): 577-83. <https://doi.org/10.1128/aac.13.4.577>.
- Dassa, E., et P. Bouige. 2001. « The ABC of ABCS: A Phylogenetic and Functional Classification of ABC Systems in Living Organisms ». *Research in Microbiology* 152 (3-4): 211-29. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01194-9).
- Davis, C. C., M. A. Mellencamp, et L. C. Preheim. 1991. « A Model of Pneumococcal Pneumonia in Chronically Intoxicated Rats ». *The Journal of Infectious Diseases* 163 (4): 799-805. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.4.799>.
- Dawid, Suzanne, Aoife M. Roche, et Jeffrey N. Weiser. 2007. « The Blp Bacteriocins of Streptococcus Pneumoniae Mediate Intraspecies Competition Both In Vitro and In Vivo ». *Infection and Immunity* 75 (1): 443-51. <https://doi.org/10.1128/IAI.01775-05>.
- Dawson, Roger J. P., et Kaspar P. Locher. 2007. « Structure of the Multidrug ABC Transporter Sav1866 from Staphylococcus Aureus in Complex with AMP-PNP ». *FEBS Letters* 581 (5): 935-38. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.073>.
- Dean, R. E., L. M. O'Brien, J. E. Thwaite, M. A. Fox, H. Atkins, et D. O. Ulaeto. 2010. « A Carpet-Based Mechanism for Direct Antimicrobial Peptide Activity against Vaccinia Virus Membranes ». *Peptides* 31 (11): 1966-72. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.07.028>.
- Del Grosso, Maria, John G. E. Northwood, David J. Farrell, et Annalisa Pantosti. 2007. « The Macrolide Resistance Genes erm(B) and mef(E) Are Carried by Tn2010 in Dual-Gene Streptococcus pneumoniae Isolates Belonging to Clonal Complex CC271 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (11): 4184-86. <https://doi.org/10.1128/AAC.00598-07>.
- Denisov, Iliia G, et Stephen G Sligar. 2016. « Nanodiscs for Structural and Functional Studies of Membrane Proteins ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (6): 481-86. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3195>.
- Diamond, Gill, Nicholas Beckloff, Aaron Weinberg, et Kevin O. Kisich. 2009. « The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense ». *Current Pharmaceutical Design* 15 (21): 2377-92. <https://doi.org/10.2174/138161209788682325>.
- Dintner, S., A. Staron, E. Berchtold, T. Petri, T. Mascher, et S. Gebhard. 2011. « Coevolution of ABC Transporters and Two-Component Regulatory Systems as Resistance Modules against Antimicrobial Peptides in Firmicutes Bacteria ». *Journal of Bacteriology* 193 (15): 3851-62. <https://doi.org/10.1128/JB.05175-11>.
- Dintner, Sebastian, Ralf Heermann, Chong Fang, Kirsten Jung, et Susanne Gebhard. 2014. « A Sensory Complex Consisting of an ATP-Binding Cassette Transporter and a Two-Component Regulatory

- System Controls Bacitracin Resistance in *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (40): 27899-910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.596221>.
- Dintner, Sebastian, Anna Staroń, Evi Berchtold, Tobias Petri, Thorsten Mascher, et Susanne Gebhard. 2011. « Coevolution of ABC Transporters and Two-Component Regulatory Systems as Resistance Modules against Antimicrobial Peptides in Firmicutes Bacteria ▽ ». *Journal of Bacteriology* 193 (15): 3851-62. <https://doi.org/10.1128/JB.05175-11>.
- Dintner, Sébastien, Ralf Heermann, Chong Fang, Kirsten Jung, et Susanne Gebhard. 2014. « A Sensory Complex Consisting of an ATP-Binding Cassette Transporter and a Two-Component Regulatory System Controls Bacitracin Resistance in *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (40): 27899-910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.596221>.
- Dönhöfer, Alexandra, Sibylle Franckenberg, Stephan Wickles, Otto Berninghausen, Roland Beckmann, et Daniel N. Wilson. 2012. « Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (42): 16900-905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>.
- Dopazo, J., A. Mendoza, J. Herrero, F. Caldara, Y. Humbert, L. Friedli, M. Guerrier, et al. 2001. « Annotated Draft Genomic Sequence from a Streptococcus Pneumoniae Type 19F Clinical Isolate ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 7 (2): 99-125. <https://doi.org/10.1089/10766290152044995>.
- Dörr, Jonas M., Stefan Scheidelaar, Martijn C. Koorengel, Juan J. Dominguez, Marre Schäfer, Cornelis A. van Walree, et J. Antoinette Killian. 2016. « The Styrene-Maleic Acid Copolymer: A Versatile Tool in Membrane Research ». *European Biophysics Journal: EBJ* 45 (1): 3-21. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1093-y>.
- Drew, David, Linda Fröderberg, Louise Baars, et Jan-Willem L. de Gier. 2003. « Assembly and Overexpression of Membrane Proteins in Escherichia Coli ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1610 (1): 3-10. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00707-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00707-1).
- Du, Dijun, Xuan Wang-Kan, Arthur Neuberger, Hendrik W. van Veen, Klaas M. Pos, Laura J. V. Piddock, et Ben F. Luisi. 2018. « Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function and Regulation ». *Nature Reviews Microbiology* 16 (9): 523-39. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>.
- Dubois, Jean-Yves F., Thijs R. H. M. Kouwen, Anna K. C. Schurich, Carlos R. Reis, Hendrik T. Ensing, Erik N. Trip, Jessica C. Zweers, et Jan Maarten van Dijl. 2009. « Immunity to the Bacteriocin Sublancin 168 Is Determined by the SunI (YofF) Protein of Bacillus Subtilis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2): 651-61. <https://doi.org/10.1128/AAC.01189-08>.
- Dubos, René J. 1939. « STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS ». *The Journal of Experimental Medicine* 70 (1): 11-17.
- Dumon-Seignovert, Laurence, Guillaume Cariot, et Laurent Vuillard. 2004. « The Toxicity of Recombinant Proteins in Escherichia Coli: A Comparison of Overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3) ». *Protein Expression and Purification* 37 (1): 203-6. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>.
- Dutta, Sulagna, et Pallav Sengupta. 2016. « Men and Mice: Relating Their Ages ». *Life Sciences* 152 (mai): 244-48. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>.
- Echenique, José R., et Marie-Claude Trombe. 2001. « Competence Repression under Oxygen Limitation through the Two-Component MicAB Signal-Transducing System in Streptococcus pneumoniae and Involvement of the PAS Domain of MicB ». *Journal of Bacteriology* 183 (15): 4599-4608. <https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4599-4608.2001>.
- Economou, Nicoleta J., Simon Cocklin, et Patrick J. Loll. 2013. « High-Resolution Crystal Structure Reveals Molecular Details of Target Recognition by Bacitracin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (35): 14207-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308268110>.
- Ehrenstein, G., et H. Lecar. 1977. « Electrically Gated Ionic Channels in Lipid Bilayers ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 10 (1): 1-34. <https://doi.org/10.1017/s0033583500000123>.
- Eldholm, Vegard, Beatrice Gutt, Ola Johnsborg, Reinhold Brückner, Patrick Maurer, Regine Hakenbeck, Thorsten Mascher, et Leiv Sigve Håvarstein. 2010. « The Pneumococcal Cell Envelope Stress-Sensing

- System LiaFSR Is Activated by Murein Hydrolases and Lipid II-Interacting Antibiotics ». *Journal of Bacteriology* 192 (7): 1761-73. <https://doi.org/10.1128/JB.01489-09>.
- Epand, Raquel F., Paul B. Savage, et Richard M. Epand. 2007. « Bacterial Lipid Composition and the Antimicrobial Efficacy of Cationic Steroid Compounds (Ceragenins) ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768 (10): 2500-2509. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.023>.
- Epand, Richard M., et Hans J. Vogel. 1999. « Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462 (1-2): 11-28. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00198-4).
- Ernst, Robert, Petra Kueppers, Cornelia M. Klein, Tobias Schwarzmüller, Karl Kuchler, et Lutz Schmitt. 2008. « A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13): 5069-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800191105>.
- Erspamer, G. F., et J. M. Cei. 1970. « Biogenic Amines and Active Polypeptides in the Skin of *Leptodactylus Vilarsi Melin* ». *Biochemical Pharmacology* 19 (2): 321-25. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(70\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(70)90189-9).
- Evans, B. A., et D. E. Rozen. 2012a. « A *Streptococcus Pneumoniae* Infection Model in Larvae of the Wax Moth *Galleria Mellonella* ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31 (10): 2653-60. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1609-7>.
- . 2012b. « A *Streptococcus Pneumoniae* Infection Model in Larvae of the Wax Moth *Galleria Mellonella* ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31 (10): 2653-60. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1609-7>.
- Falord, Mélanie, Gouzel Karimova, Aurélie Hiron, et Tarek Msadek. 2012. « GraXSR Proteins Interact with the VraFG ABC Transporter To Form a Five-Component System Required for Cationic Antimicrobial Peptide Sensing and Resistance in *Staphylococcus Aureus* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (2): 1047-58. <https://doi.org/10.1128/AAC.05054-11>.
- Fang, Xiao, Kittichoat Tiyanont, Yi Zhang, Jutta Wanner, Dale Boger, et Suzanne Walker. 2006. « The Mechanism of Action of Ramoplanin and Enduracidin ». *Mol. Biosyst.* 2 (1): 69-76. <https://doi.org/10.1039/B515328J>.
- Fischer, W. 2000. « Phosphocholine of Pneumococcal Teichoic Acids: Role in Bacterial Physiology and Pneumococcal Infection ». *Research in Microbiology* 151 (6): 421-27. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00174-1).
- Fleming, A. 1929. « On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. Influenzae*. 1929 ». *Bulletin of the World Health Organization* 79 (8): 780-90.
- Florin, Tanja, Cristina Maracci, Michael Graf, Prajwal Karki, Dorota Klepacki, Otto Berninghausen, Roland Beckmann, et al. 2017. « An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome ». *Nature structural & molecular biology* 24 (9): 752-57. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3439>.
- Folkesson, Anders, Janus A. J. Haagensen, Claudia Zampaloni, Claus Sternberg, et Søren Molin. 2008. « Biofilm Induced Tolerance towards Antimicrobial Peptides ». *PLoS ONE* 3 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001891>.
- Foster, W., et A. Raoult. 1974. « Early Descriptions of Antibiosis ». *The Journal of the Royal College of General Practitioners* 24 (149): 889-94.
- Francez-Charlot, Anne, Julia Frunzke, Christian Reichen, Judith Zingg Ebnetter, Benjamin Gourion, et Julia A. Vorholt. 2009. « Sigma Factor Mimicry Involved in Regulation of General Stress Response ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9): 3467-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810291106>.
- Fyfe, Corey, Trudy H. Grossman, Kathy Kerstein, et Joyce Sutcliffe. 2016. « Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025395>.
- Gagnon, Matthieu G., Raktim N. Roy, Ivan B. Lomakin, Tanja Florin, Alexander S. Mankin, et Thomas A. Steitz. 2016. « Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common

- mechanism of protein synthesis inhibition ». *Nucleic Acids Research* 44 (5): 2439-50.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw018>.
- Galperin, Michael Y. 2010. « Diversity of Structure and Function of Response Regulator Output Domains ». *Current opinion in microbiology* 13 (2): 150-59. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>.
- Ganzinger, U., et A. Haslberger. 1985. « Pharmacokinetics of Cephalosporins in Normal and Septicemic Rabbits ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28 (4): 473-77.  
<https://doi.org/10.1128/aac.28.4.473>.
- Gao, Rong, Timothy R. Mack, et Ann M. Stock. 2007. « Bacterial Response Regulators: Versatile Regulatory Strategies from Common Domains ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (5): 225-34.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.002>.
- Gao, Rong, et Ann M. Stock. 2009. « Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins ». *Annual review of microbiology* 63: 133-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>.
- Garavito, R. M., et S. Ferguson-Miller. 2001. « Detergents as Tools in Membrane Biochemistry ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 32403-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100031200>.
- Garsin, Danielle A., Costi D. Sifri, Eleftherios Mylonakis, Xiang Qin, Kavindra V. Singh, Barbara E. Murray, Stephen B. Calderwood, et Frederick M. Ausubel. 2001. « A Simple Model Host for Identifying Gram-Positive Virulence Factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (19): 10892-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.191378698>.
- Gaspar, Diana, A. Salomé Veiga, et Miguel A. R. B. Castanho. 2013. « From antimicrobial to anticancer peptides. A review ». *Frontiers in Microbiology* 4 (octobre).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>.
- Gauntlett, Jonathan C., Susanne Gebhard, Stefanie Keis, Janet M. Manson, Klaas M. Pos, et Gregory M. Cook. 2008. « Molecular Analysis of BcrR, a Membrane-Bound Bacitracin Sensor and DNA-Binding Protein from *Enterococcus Faecalis* ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (13): 8591-8600.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M709503200>.
- Gaustad, Peter, et Donald A. Morrison. 1998. « Induction of Transformation in Streptococci by Synthetic Competence Stimulating Peptides ». *Methods in Cell Science* 20 (1): 65-70.  
<https://doi.org/10.1023/A:1009882608636>.
- Gaynes, Robert. 2017. « The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use ». *Emerging Infectious Diseases* 23 (5): 849-53. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>.
- Gebhard, Susanne. 2012a. « ABC Transporters of Antimicrobial Peptides in Firmicutes Bacteria - Phylogeny, Function and Regulation: Antimicrobial Peptide Transport in Firmicutes ». *Molecular Microbiology* 86 (6): 1295-1317. <https://doi.org/10.1111/mmi.12078>.
- . 2012b. « ABC Transporters of Antimicrobial Peptides in Firmicutes Bacteria - Phylogeny, Function and Regulation: Antimicrobial Peptide Transport in Firmicutes ». *Molecular Microbiology* 86 (6): 1295-1317. <https://doi.org/10.1111/mmi.12078>.
- Gebhard, Susanne, Chong Fang, Aishath Shaaly, David J. Leslie, Marion R. Weimar, Falk Kalamorz, Alan Carne, et Gregory M. Cook. 2014. « Identification and Characterization of a Bacitracin Resistance Network in *Enterococcus Faecalis* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (3): 1425-33.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02111-13>.
- Geertsma, Eric R, N A B Nik Mahmood, Gea K Schuurman-Wolters, et Bert Poolman. 2008. « Membrane Reconstitution of ABC Transporters and Assays of Translocator Function ». *Nature Protocols* 3 (2): 256-66. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.519>.
- Geno, K. Aaron, Gwendolyn L. Gilbert, Joon Young Song, Ian C. Skovsted, Keith P. Klugman, Christopher Jones, Helle B. Konradsen, et Moon H. Nahm. 2015. « Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future ». *Clinical Microbiology Reviews* 28 (3): 871-99.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15>.
- Geourjon, Christophe, Cédric Orelle, Emmanuelle Steinfelds, Christophe Blanchet, Gilbert Deléage, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2001. « A Common Mechanism for ATP Hydrolysis in ABC Transporter and Helicase Superfamilies ». *Trends in Biochemical Sciences* 26 (9): 539-44.  
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01907-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01907-7).



- Giebink, G. S. 1999. « Otitis Media: The Chinchilla Model ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 5 (1): 57-72. <https://doi.org/10.1089/mdr.1999.5.57>.
- Gill, M J, S Simjee, K Al-Hattawi, B D Robertson, C S F Easmon, et C A Ison. 1998. « Gonococcal Resistance to  $\beta$ -Lactams and Tetracycline Involves Mutation in Loop 3 of the Porin Encoded at the PenB Locus ». *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 42: 5.
- Gómez-Mejía, Alejandro, Gustavo Gámez, et Sven Hammerschmidt. 2018. « Streptococcus Pneumoniae Two-Component Regulatory Systems: The Interplay of the Pneumococcus with Its Environment ». *International Journal of Medical Microbiology* 308 (6): 722-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.012>.
- Gómez-Mejía, Alejandro, Gustavo Gámez, Stephanie Hirschmann, Viktor Kluger, Hermann Rath, Sebastian Böhm, Franziska Voss, et al. 2018. « Pneumococcal Metabolic Adaptation and Colonization Are Regulated by the Two-Component Regulatory System 08 ». Édité par Paul D. Fey. *MSphere* 3 (3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00165-18>.
- Gosink, K. K., E. R. Mann, C. Guglielmo, E. I. Tuomanen, et H. R. Masure. 2000. « Role of Novel Choline Binding Proteins in Virulence of Streptococcus Pneumoniae ». *Infection and Immunity* 68 (10): 5690-95. <https://doi.org/10.1128/iai.68.10.5690-5695.2000>.
- Gottesman, Michael M, et Suresh V Ambudkar. 2001. « Overview: ABC Transporters and Human Disease ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 6.
- Greene, Nicholas P., Elise Kaplan, Allister Crow, et Vassilis Koronakis. 2018. « Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mai): 950. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00950>.
- Grein, Fabian, Tanja Schneider, et Hans-Georg Sahl. 2019. « Docking on Lipid II—A Widespread Mechanism for Potent Bactericidal Activities of Antibiotic Peptides ». *Journal of Molecular Biology* 431 (18): 3520-30. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.014>.
- Griffith, Fred. 1928. « The Significance of Pneumococcal Types ». *The Journal of Hygiene* 27 (2): 113-59.
- Grimm, D., J. Bauer, J. Pietsch, M. Infanger, J. Eucker, C. Eilles, et J. Schoenberger. 2011. « Diagnostic and Therapeutic Use of Membrane Proteins in Cancer Cells ». *Current Medicinal Chemistry* 18 (2): 176-90. <https://doi.org/10.2174/092986711794088344>.
- Groisman, Eduardo A. 2016. « Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems ». *Annual Review of Microbiology* 70 (1): 103-24. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095331>.
- Guilhelmelli, Fernanda, Nathália Vilela, Patrícia Albuquerque, Lorena da S. Derengowski, Ildinete Silva-Pereira, et Cynthia M. Kyaw. 2013a. « Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance ». *Frontiers in Microbiology* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>.
- . 2013b. « Antibiotic Development Challenges: The Various Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and of Bacterial Resistance ». *Frontiers in Microbiology* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>.
- Guiral, Sébastien, Tim J. Mitchell, Bernard Martin, et Jean-Pierre Claverys. 2005. « Competence-Programmed Predation of Noncompetent Cells in the Human Pathogen Streptococcus Pneumoniae: Genetic Requirements ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (24): 8710-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500879102>.
- Gupta, Radha, Jun Yang, Yimin Dong, Edwin Swiatlo, Jing-Ren Zhang, Dennis W. Metzger, et Guangchun Bai. 2013. « Deletion of *ArcD* in Streptococcus Pneumoniae D39 Impairs Its Capsule and Attenuates Virulence ». Édité par A. Camilli. *Infection and Immunity* 81 (10): 3903-11. <https://doi.org/10.1128/IAI.00778-13>.
- Gupta, Shiva, Gouri Bhatia, Anamika Sharma, et Sameer Saxena. 2018. « Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world ». *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 22 (2): 239-44. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_113\\_16](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_113_16).
- Haas, Wolfgang, Deepak Kaushal, Jack Sublett, Caroline Obert, et Elaine I. Tuomanen. 2005. « Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of Streptococcus Pneumoniae ». *Journal of Bacteriology* 187 (23): 8205-10. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8205-8210.2005>.

- Haas, Wolfgang, Jack Sublett, Deepak Kaushal, et Elaine I. Tuomanen. 2004. « Revising the Role of the Pneumococcal *vncRS* Locus in Vancomycin Tolerance ». *Journal of Bacteriology* 186 (24): 8463-71. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8463-8471.2004>.
- Hackel, M., C. Lascols, S. Bouchillon, B. Hilton, D. Morgenstern, et J. Purdy. 2013. « Serotype Prevalence and Antibiotic Resistance in *Streptococcus Pneumoniae* Clinical Isolates among Global Populations ». *Vaccine* 31 (42): 4881-87. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.054>.
- Hal, Sebastiaan J. van, et Vance G. Fowler. 2013. « Is It Time to Replace Vancomycin in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections? » *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 56 (12): 1779-88. <https://doi.org/10.1093/cid/cit178>.
- Hancock, Robert E. W., Kelly L. Brown, et Neeloffer Mookherjee. 2006. « Host Defence Peptides from Invertebrates--Emerging Antimicrobial Strategies ». *Immunobiology* 211 (4): 315-22. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.017>.
- Hassan, Karl A., Qi Liu, Liam D.H. Elbourne, Irshad Ahmad, David Sharples, Varsha Naidu, Chak Lam Chan, et al. 2018. « Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens ». *Research in Microbiology* 169 (7-8): 450-54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001>.
- Hassan, M., M. Kjos, I. F. Nes, D. B. Diep, et F. Lotfipour. 2012. « Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance ». *Journal of Applied Microbiology* 113 (4): 723-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>.
- Hava, David L., et Andrew Camilli. 2002. « Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors ». *Molecular microbiology* 45 (5): 1389-1406.
- Håvarstein, L. S., D. B. Diep, et I. F. Nes. 1995. « A Family of Bacteriocin ABC Transporters Carry out Proteolytic Processing of Their Substrates Concomitant with Export ». *Molecular Microbiology* 16 (2): 229-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02295.x>.
- Hazlett, Linda, et Minhao Wu. 2011. « Defensins in Innate Immunity ». *Cell and Tissue Research* 343 (1): 175-88. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1022-4>.
- Heide, Tiemen van der, et Bert Poolman. 2002. « ABC Transporters: One, Two or Four Extracytoplasmic Substrate-Binding Sites? » *EMBO Reports* 3 (10): 938-43. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf201>.
- Henderson, G. B., E. M. Zevely, et F. M. Huennekens. 1979. « Mechanism of Folate Transport in *Lactobacillus Casei*: Evidence for a Component Shared with the Thiamine and Biotin Transport Systems ». *Journal of Bacteriology* 137 (3): 1308-14.
- Henry, Jonathan T., et Sean Crosson. 2011. « Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context ». *Annual Review of Microbiology* 65: 261-86. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151631>.
- Hesketh, Sophie J., David P. Klebl, Anna J. Higgins, Maren Thomsen, Isabelle B. Pickles, Frank Sobott, Asipu Sivaprasadarao, Vincent L.G. Postis, et Stephen P. Muench. 2020. « Styrene Maleic-Acid Lipid Particles (SMALPs) into Detergent or Amphipols: An Exchange Protocol for Membrane Protein Characterisation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862 (5): 183192. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183192>.
- Higgins, C. F. 1992. « ABC Transporters: From Microorganisms to Man ». *Annual Review of Cell Biology* 8: 67-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>.
- Higgins, Christopher F, et Kenneth J Linton. 2004. « The ATP Switch Model for ABC Transporters ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10): 918-26. <https://doi.org/10.1038/nsmb836>.
- Hiron, Aurélie, Mélanie Falord, Jaione Valle, Michel Débarbouillé, et Tarek Msadek. 2011a. « Bacitracin and Nisin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: A Novel Pathway Involving the BraS/BraR Two-Component System (SA2417/SA2418) and Both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC Transporters: Multi-Component Bacitracin Resistance Pathway in *Staphylococcus Aureus* ». *Molecular Microbiology* 81 (3): 602-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07735.x>.
- . 2011b. « Bacitracin and Nisin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: A Novel Pathway Involving the BraS/BraR Two-Component System (SA2417/SA2418) and Both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC

- Transporters: Multi-Component Bacitracin Resistance Pathway in Staphylococcus Aureus ». *Molecular Microbiology* 81 (3): 602-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07735.x>.
- Hirsch, J. G. 1956. « Phagocytin: A Bactericidal Substance from Polymorphonuclear Leucocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 103 (5): 589-611. <https://doi.org/10.1084/jem.103.5.589>.
- Hobbs, Errett C., Xuefeng Yin, Brian J. Paul, Jillian L. Astarita, et Gisela Storz. 2012. « Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41): 16696-701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210093109>.
- Hockney, R. C. 1994. « Recent Developments in Heterologous Protein Production in Escherichia Coli ». *Trends in Biotechnology* 12 (11): 456-63. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90021-3).
- Hoerauf, Achim, Kerstin Nissen-Pähle, Christel Schmetz, Kim Henkle-Dührsen, Mark L. Blaxter, Dietrich W. Büttner, Michaela Y. Gallin, Khaled M. Al-Qaoud, Richard Lucius, et Bernhard Fleischer. 1999. « Tetracycline Therapy Targets Intracellular Bacteria in the Filarial Nematode Litomosoides Sigmodontis and Results in Filarial Infertility ». *Journal of Clinical Investigation* 103 (1): 11-18. <https://doi.org/10.1172/JCI4768>.
- Hofmann, J., M. S. Cetron, M. M. Farley, W. S. Baughman, R. R. Facklam, J. A. Elliott, K. A. Deaver, et R. F. Breiman. 1995. « The Prevalence of Drug-Resistant Streptococcus Pneumoniae in Atlanta ». *The New England Journal of Medicine* 333 (8): 481-86. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508243330803>.
- Hohl, Michael, Christophe Briand, Markus G. Grütter, et Markus A. Seeger. 2012. « Crystal Structure of a Heterodimeric ABC Transporter in Its Inward-Facing Conformation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (4): 395-402. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2267>.
- Holmes, A. R., R. McNab, K. W. Millsap, M. Rohde, S. Hammerschmidt, J. L. Mawdsley, et H. F. Jenkinson. 2001. « The PavA Gene of Streptococcus Pneumoniae Encodes a Fibronectin-Binding Protein That Is Essential for Virulence ». *Molecular Microbiology* 41 (6): 1395-1408. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02610.x>.
- Holtmark, I., D. Mantzilas, V. G. H. Eijsink, et M. B. Brurberg. 2006. « Purification, Characterization, and Gene Sequence of Michiganin A, an Actagardine-Like Lantibiotic Produced by the Tomato Pathogen Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9): 5814-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00639-06>.
- Hoskins, J., W. E. Alborn, J. Arnold, L. C. Blaszczak, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, et al. 2001. « Genome of the Bacterium Streptococcus Pneumoniae Strain R6 ». *Journal of Bacteriology* 183 (19): 5709-17. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001>.
- Hotomi, Muneki, Jun Yuasa, David E. Briles, et Noboru Yamanaka. 2016. « Pneumolysin Plays a Key Role at the Initial Step of Establishing Pneumococcal Nasal Colonization ». *Folia Microbiologica* 61 (5): 375-83. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0445-z>.
- Howard, L. V., et H. Gooder. 1974. « Specificity of the Autolysin of Streptococcus (Diplococcus) Pneumoniae ». *Journal of Bacteriology* 117 (2): 796-804.
- Hsu, Shang-Te D., Eefjan Breukink, Eugene Tischenko, Mandy A. G. Lutters, Ben de Kruijff, Robert Kaptein, Alexandre M. J. J. Bonvin, et Nico A. J. van Nuland. 2004. « The Nisin-Lipid II Complex Reveals a Pyrophosphate Cage That Provides a Blueprint for Novel Antibiotics ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10): 963-67. <https://doi.org/10.1038/nsmb830>.
- Hu, Yanan, Jeremiah S Helm, Lan Chen, Xiang-Yang Ye, et Suzanne Walker. 2003. « Ramoplanin Inhibits Bacterial Transglycosylases by Binding as a Dimer to Lipid II », 2.
- Huan, Yuchen, Qing Kong, Haijin Mou, et Huaxi Yi. 2020. « Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields ». *Frontiers in Microbiology* 11 (octobre): 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
- Hui, F. M., L. Zhou, et D. A. Morrison. 1995. « Competence for Genetic Transformation in Streptococcus Pneumoniae: Organization of a Regulatory Locus with Homology to Two Lactococci A Secretion Genes ». *Gene* 153 (1): 25-31. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00841-f](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00841-f).

- Huovinen, P. 2001. « Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 (11): 1608-14. <https://doi.org/10.1086/320532>.
- Hyams, Catherine, Emilie Camberlein, Jonathan M. Cohen, Katie Bax, et Jeremy S. Brown. 2010. « The Streptococcus Pneumoniae Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms ». *Infection and Immunity* 78 (2): 704-15. <https://doi.org/10.1128/IAI.00881-09>.
- Infed, Nacera, Nils Hanekop, Arnold J. M. Driessen, Sander H. J. Smits, et Lutz Schmitt. 2011. « Influence of Detergents on the Activity of the ABC Transporter LmrA ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (9): 2313-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.05.016>.
- Jabés, Daniela, Cristina Brunati, GianPaolo Candiani, Simona Riva, Gabriella Romanó, et Stefano Donadio. 2011. « Efficacy of the New Lantibiotic NAI-107 in Experimental Infections Induced by Multidrug-Resistant Gram-Positive Pathogens ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (4): 1671-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01288-10>.
- Jackson, Lisa A., Kathleen M. Neuzil, Onchee Yu, Patti Benson, William E. Barlow, Annette L. Adams, Christi A. Hanson, Lisa D. Mahoney, David K. Shay, et William W. Thompson. 2003. « Effectiveness of Pneumococcal Polysaccharide Vaccine in Older Adults ». *New England Journal of Medicine* 348 (18): 1747-55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022678>.
- Jacobs, Michael R., Saralee Bajaksouzian, Elizabeth L. Palavecino-Fasola, Henry M. Holoszyc, et Peter C. Appelbaum. 1998. « Determination of Penicillin MICs for Streptococcus pneumoniae by Using a Two- or Three-Disk Diffusion Procedure ». *Journal of Clinical Microbiology* 36 (1): 179-83.
- Jacoby, George A., Marian A. Corcoran, et David C. Hooper. 2015. « Protective Effect of Qnr on Agents Other than Quinolones That Target DNA Gyrase ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (11): 6689-95. <https://doi.org/10.1128/AAC.01292-15>.
- Jain, Sumita, et Richard P. Darveau. 2010. « Contribution of Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide to Periodontitis ». *Periodontology 2000* 54 (1): 53-70. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00333.x>.
- Janoff, E. N., J. B. Rubins, C. Fasching, D. Charboneau, J. T. Rahkola, A. G. Plaut, et J. N. Weiser. 2014. « Pneumococcal IgA1 Protease Subverts Specific Protection by Human IgA1 ». *Mucosal Immunology* 7 (2): 249-56. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.41>.
- Jansen, W. T. M., M. Bolm, R. Balling, G. S. Chhatwal, et R. Schnabel. 2002. « Hydrogen Peroxide-Mediated Killing of Caenorhabditis elegans by Streptococcus pyogenes ». *Infection and Immunity* 70 (9): 5202-7. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.5202-5207.2002>.
- Jedrzejewski, M. J. 2001. « Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 65 (2): 187-207 ; first page, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.187-207.2001>.
- Jesorka, Aldo, et Owe Orwar. 2008. « Liposomes: Technologies and Analytical Applications ». *Annual Review of Analytical Chemistry* 1 (1): 801-32. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747>.
- Johnston, Jason W., Lisa E. Myers, Martina M. Ochs, William H. Benjamin, David E. Briles, et Susan K. Hollingshead. 2004. « Lipoprotein PsaA in Virulence of Streptococcus Pneumoniae: Surface Accessibility and Role in Protection from Superoxide ». *Infection and Immunity* 72 (10): 5858-67. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5858-5867.2004>.
- Jones, Peter M., et Anthony M. George. 2009. « Opening of the ADP-Bound Active Site in the ABC Transporter ATPase Dimer: Evidence for a Constant Contact, Alternating Sites Model for the Catalytic Cycle ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 75 (2): 387-96. <https://doi.org/10.1002/prot.22250>.
- . 2012. « Role of the D-Loops in Allosteric Control of ATP Hydrolysis in an ABC Transporter ». *The Journal of Physical Chemistry. A* 116 (11): 3004-13. <https://doi.org/10.1021/jp211139s>.
- . 2013. « Mechanism of the ABC Transporter ATPase Domains: Catalytic Models and the Biochemical and Biophysical Record ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48 (1): 39-50. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.735644>.

- Jones, Peter M., Megan L. O'Mara, et Anthony M. George. 2009. « ABC Transporters: A Riddle Wrapped in a Mystery inside an Enigma ». *Trends in Biochemical Sciences* 34 (10): 520-31. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.06.004>.
- Jones, Ronald N., Michael R. Jacobs, et Helio S. Sader. 2010. « Evolving Trends in Streptococcus Pneumoniae Resistance: Implications for Therapy of Community-Acquired Bacterial Pneumonia ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 (3): 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.04.013>.
- Jordan, Sina, Anja Junker, John D. Helmann, et Thorsten Mascher. 2006. « Regulation of LiaRS-Dependent Gene Expression in Bacillus subtilis: Identification of Inhibitor Proteins, Regulator Binding Sites, and Target Genes of a Conserved Cell Envelope Stress-Sensing Two-Component System ». *Journal of Bacteriology* 188 (14): 5153-66. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-06>.
- Jung, Kirsten, Florian Fabiani, Elisabeth Hoyer, et Jürgen Lassak. 2018. « Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing ». *Open Biology* 8 (4). <https://doi.org/10.1098/rsob.180023>.
- Kadioglu, Aras, Jeffrey N. Weiser, James C. Paton, et Peter W. Andrew. 2008. « The Role of Streptococcus Pneumoniae Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (4): 288-301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>.
- Kallenberg, F., S. Dintner, R. Schmitz, et S. Gebhard. 2013. « Identification of Regions Important for Resistance and Signalling within the Antimicrobial Peptide Transporter BceAB of Bacillus Subtilis ». *Journal of Bacteriology* 195 (14): 3287-97. <https://doi.org/10.1128/JB.00419-13>.
- Kanonenberg, Kerstin. 2018. « Biochemical Characterisation of the Escherichia coli Haemolysin A Type I Secretion System. » Thèse de Doctorat, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
- Keller, Lance E., D. Ashley Robinson, et Larry S. McDaniel. 2016. « Nonencapsulated Streptococcus Pneumoniae: Emergence and Pathogenesis ». *MBio* 7 (2): e01792. <https://doi.org/10.1128/mBio.01792-15>.
- Khan, Rabia, Fernanda Cristina Petersen, et Sudhanshu Shekhar. 2019. « Commensal Bacteria: An Emerging Player in Defense Against Respiratory Pathogens ». *Frontiers in Immunology* 10 (mai). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01203>.
- Kharat, Arun S., et Alexander Tomasz. 2003. « Inactivation of the SrtA Gene Affects Localization of Surface Proteins and Decreases Adhesion of Streptococcus Pneumoniae to Human Pharyngeal Cells in Vitro ». *Infection and Immunity* 71 (5): 2758-65. <https://doi.org/10.1128/iai.71.5.2758-2765.2003>.
- Khosa, Sakshi, Zainab Alkhatib, et Sander H. J. Smits. 2013. « NSR from Streptococcus Agalactiae Confers Resistance against Nisin and Is Encoded by a Conserved Nsr Operon ». *Biological Chemistry* 394 (11): 1543-49. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0167>.
- Khosa, Sakshi, Benedikt Frieg, Daniel Mulnaes, Diana Kleinschrodt, Astrid Hoepfner, Holger Gohlke, et Sander H. J. Smits. 2016. « Structural Basis of Lantibiotic Recognition by the Nisin Resistance Protein from Streptococcus Agalactiae ». *Scientific Reports* 6 (janvier): 18679. <https://doi.org/10.1038/srep18679>.
- Kim, Seonghoon, Marcos M. Pires, et Wonpil Im. 2018. « Insight into Elongation Stages of Peptidoglycan Processing in Bacterial Cytoplasmic Membranes ». *Scientific Reports* 8 (1): 17704. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36075-y>.
- Kingston, Anthony W., Heng Zhao, Gregory M. Cook, et John D. Helmann. 2014. « Accumulation of Heptaprenyl Diphosphate Sensitizes B Acillus Subtilis to Bacitracin: Implications for the Mechanism of Resistance Mediated by the BceAB Transporter: Heptaprenyl Diphosphate Sensitizes Bacillus Subtilis to Bacitracin ». *Molecular Microbiology* 93 (1): 37-49. <https://doi.org/10.1111/mmi.12637>.
- Kitagawa, Norio, Susumu Shiota, Yukie Shibata, Toru Takeshita, et Yoshihisa Yamashita. 2011. « Characterization of MbrC Involved in Bacitracin Resistance in Streptococcus Mutans ». *FEMS Microbiology Letters* 318 (1): 61-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02238.x>.
- Kjos, Morten, Eric Miller, Jelle Slager, Frank B. Lake, Oliver Gericke, Ian S. Roberts, Daniel E. Rozen, et Jan-Willem Veening. 2016. « Expression of Streptococcus pneumoniae Bacteriocins Is Induced by Antibiotics via Regulatory Interplay with the Competence System ». *PLoS Pathogens* 12 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005422>.

- Kobras, Carolin M., Hannah Piepenbreier, Jennifer Emenegger, Andre Sim, Georg Fritz, et Susanne Gebhard. 2020. « BceAB-Type Antibiotic Resistance Transporters Appear To Act by Target Protection of Cell Wall Synthesis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02241-19>.
- Koebach, Johannes, et David J. Craik. 2019. « The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides ». *Trends in Pharmacological Sciences* 40 (7): 517-28. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.012>.
- Koepe, R. E., L. L. Providence, D. V. Greathouse, F. Heitz, Y. Trudelle, N. Purdie, et O. S. Andersen. 1992. « On the Helix Sense of Gramicidin A Single Channels ». *Proteins* 12 (1): 49-62. <https://doi.org/10.1002/prot.340120107>.
- Komar, Joanna, Sara Alvira, Ryan J. Schulze, Remy Martin, Jelger A. Lycklama a Nijeholt, Sarah C. Lee, Tim R. Dafforn, et al. 2016. « Membrane protein insertion and assembly by the bacterial holo-translocon SecYEG–SecDF–YajC–YidC ». *Biochemical Journal* 473 (19): 3341-54. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160545>.
- Kościuczuk, Ewa M., Paweł Lisowski, Justyna Jarczak, Nina Strzałkowska, Artur Jóźwik, Jarosław Horbańczuk, Józef Krzyżewski, Lech Zwierzchowski, et Emilia Bagnicka. 2012. « Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review ». *Molecular Biology Reports* 39 (12): 10957-70. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1997-x>.
- Kotwani, Anita, et Kathleen Holloway. 2011. « Trends in antibiotic use among outpatients in New Delhi, India ». *BMC Infectious Diseases* 11 (avril): 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-99>.
- Kramer, Naomi E., Eddy J. Smid, Jan Kok, Ben de Kruijff, Oscar P. Kuipers, et Eefjan Breukink. 2004. « Resistance of Gram-Positive Bacteria to Nisin Is Not Determined by Lipid II Levels ». *FEMS Microbiology Letters* 239 (1): 157-61. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.033>.
- Kuipers, Anneke, Esther de Boef, Rick Rink, Susan Fekken, Leon D. Kluskens, Arnold J. M. Driessen, Kees Leenhouts, Oscar P. Kuipers, et Gert N. Moll. 2004. « NisT, the Transporter of the Lantibiotic Nisin, Can Transport Fully Modified, Dehydrated, and Unmodified Prenisin and Fusions of the Leader Peptide with Non-Lantibiotic Peptides ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22176-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312789200>.
- Kumar, A, et H Schweizer. 2005. « Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1486-1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>.
- Kumar, Sanath, Mun Mun Mukherjee, et Manuel F. Varela. 2013. « Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily ». *International Journal of Bacteriology* 2013 (décembre): 1-15. <https://doi.org/10.1155/2013/204141>.
- Lacabanne, Denis, Cédric Orelle, Lauriane Lecoq, Britta Kunert, Claire Chuilon, Thomas Wiegand, Stéphanie Ravaud, Jean-Michel Jault, Beat H. Meier, et Anja Böckmann. 2019. « Flexible-to-Rigid Transition Is Central for Substrate Transport in the ABC Transporter BmrA from *Bacillus Subtilis* ». *Communications Biology* 2 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0390-x>.
- Lange, Anna, Sina Beier, Daniel H. Huson, Raphael Parusel, Franz Iglauer, et Julia-Stefanie Frick. 2018. « Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth) ». *Genome Announcements* 6 (2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01220-17>.
- Lanie, J. A., W.-L. Ng, K. M. Kazmierczak, T. M. Andrzejewski, T. M. Davidsen, K. J. Wayne, H. Tettelin, J. I. Glass, et M. E. Winkler. 2007. « Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus Pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6 ». *Journal of Bacteriology* 189 (1): 38-51. <https://doi.org/10.1128/JB.01148-06>.
- Lanne, Alice B. M., Alice Goode, Charlotte Prattley, Divya Kumari, Mette Rynun Drasbek, Paul Williams, Raquel Conde-Álvarez, Ignacio Moriyón, et Boyan B. Bonev. 2019. « Molecular Recognition of Lipopolysaccharide by the Lantibiotic Nisin ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes* 1861 (1): 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.006>.
- Ledwitch, Kaitlyn V., Morgan E. Gibbs, Robert W. Barnes, et Arthur G. Roberts. 2016. « Cooperativity between Verapamil and ATP Bound to the Efflux Transporter P-glycoprotein ». *Biochemical pharmacology* 118 (octobre): 96-108. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.08.013>.

- Lee, Chang-Chun, Yen Sun, Shuo Qian, et Huey W. Huang. 2011. « Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37 ». *Biophysical Journal* 100 (7): 1688-96. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.018>.
- Lee, Jyh-Yeuan, Lisa N. Kinch, Dominika M. Borek, Jin Wang, Junmei Wang, Ina L. Urbatsch, Xiao-Song Xie, et al. 2016. « Crystal Structure of the Human Sterol Transporter ABCG5/ABCG8 ». *Nature* 533 (7604): 561-64. <https://doi.org/10.1038/nature17666>.
- Lee, Kwang Chear, Kavita Joory, et Naiem S. Moiem. 2014. « History of burns: The past, present and the future ». *Burns & Trauma* 2 (4): 169-80. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.143620>.
- Lee, Ming-Tao, Fang-Yu Chen, et Huey W. Huang. 2004. « Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides ». *Biochemistry* 43 (12): 3590-99. <https://doi.org/10.1021/bi036153r>.
- Lehne, G. 2000. « P-Glycoprotein as a Drug Target in the Treatment of Multidrug Resistant Cancer ». *Current Drug Targets* 1 (1): 85-99. <https://doi.org/10.2174/1389450003349443>.
- Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, et R. P. Brundage. 1962. « 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ». *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 91 (septembre): 1063-65. <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>.
- Lewinson, Oded, Allen T. Lee, Kaspar P. Locher, et Douglas C. Rees. 2010. « A Distinct Mechanism for the ABC Transporter BtuCD-BtuF Revealed by the Dynamics of Complex Formation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (3): 332-38. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1770>.
- Li, Yanmei, Qi Xiang, Qihao Zhang, Yadong Huang, et Zhijian Su. 2012. « Overview on the Recent Study of Antimicrobial Peptides: Origins, Functions, Relative Mechanisms and Application ». *Peptides* 37 (2): 207-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>.
- Lin, David Yin-wei, Shuo Huang, et Jue Chen. 2015. « Crystal Structures of a Polypeptide Processing and Secretion Transporter ». *Nature* 523 (7561): 425-30. <https://doi.org/10.1038/nature14623>.
- Linton, K. J., et C. F. Higgins. 1998. « The Escherichia Coli ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins ». *Molecular Microbiology* 28 (1): 5-13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00764.x>.
- Linton, Kenneth J., et Christopher F. Higgins. 2007. « Structure and Function of ABC Transporters: The ATP Switch Provides Flexible Control ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 453 (5): 555-67. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0126-x>.
- Locher, Kaspar P., Allen T. Lee, et Douglas C. Rees. 2002. « The E. Coli BtuCD Structure: A Framework for ABC Transporter Architecture and Mechanism ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5570): 1091-98. <https://doi.org/10.1126/science.1071142>.
- Lowy, Franklin D. 2003. « Antimicrobial Resistance: The Example of Staphylococcus Aureus ». *Journal of Clinical Investigation* 111 (9): 1265-73. <https://doi.org/10.1172/JCI18535>.
- Luo, Qingshan, Xu Yang, Shan Yu, Huigang Shi, Kun Wang, Le Xiao, Guangyu Zhu, et al. 2017. « Structural Basis for Lipopolysaccharide Extraction by ABC Transporter LptB2FG ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (5): 469-74. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3399>.
- Luque-Ortega, Juan Román, Wim van't Hof, Enno C. I. Veerman, José M. Saugar, et Luis Rivas. 2008. « Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania ». *The FASEB Journal* 22 (6): 1817-28. <https://doi.org/10.1096/fj.07-096081>.
- Mächtel, Rebecca, Alessandra Narducci, Douglas A. Griffith, Thorben Cordes, et Cédric Orelle. 2019. « An Integrated Transport Mechanism of the Maltose ABC Importer ». *Research in Microbiology* 170 (8): 321-37. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.09.004>.
- Maffioli, Sonia I., Paolo Monciardini, Bruno Catacchio, Carlo Mazzetti, Daniela Münch, Cristina Brunati, Hans-Georg Sahl, et Stefano Donadio. 2015. « Family of Class I Lantibiotics from Actinomycetes and Improvement of Their Antibacterial Activities ». *ACS Chemical Biology* 10 (4): 1034-42. <https://doi.org/10.1021/cb500878h>.
- Mah, Thien-Fah. 2012. « Biofilm-Specific Antibiotic Resistance ». *Future Microbiology* 7 (9): 1061-72. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>.
- Mahlapuu, Margit, Joakim Håkansson, Lovisa Ringstad, et Camilla Björn. 2016. « Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.

- Maire, M. le, P. Champeil, et J. V. Moller. 2000. « Interaction of Membrane Proteins and Lipids with Solubilizing Detergents ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1508 (1-2): 86-111. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(00\)00010-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(00)00010-1).
- Majchrzykiewicz, J. A., O. P. Kuipers, et J. J. E. Bijlsma. 2010. « Generic and Specific Adaptive Responses of *Streptococcus Pneumoniae* to Challenge with Three Distinct Antimicrobial Peptides, Bacitracin, LL-37, and Nisin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1): 440-51. <https://doi.org/10.1128/AAC.00769-09>.
- Majchrzykiewicz, Joanna A., Oscar P. Kuipers, et Jetta JE Bijlsma. 2010. « Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, LL-37, and nisin ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (1): 440-51.
- Mapara, Manjeet, Betsy Sara Thomas, et K. M. Bhat. 2012. « Rabbit as an Animal Model for Experimental Research ». *Dental Research Journal* 9 (1): 111-18. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.92960>.
- Marijuán, Pedro C., Jorge Navarro, et Raquel del Moral. 2010. « On Prokaryotic Intelligence: Strategies for Sensing the Environment ». *Biosystems* 99 (2): 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2009.09.004>.
- Marquette, C. H., D. Wermert, F. Wallet, M. C. Copin, et A. B. Tonnel. 1999. « Characterization of an Animal Model of Ventilator-Acquired Pneumonia ». *Chest* 115 (1): 200-209. <https://doi.org/10.1378/chest.115.1.200>.
- Martin, Bernard, Anne-Lise Soulet, Nicolas Mirouze, Marc Prudhomme, Isabelle Mortier-Barrière, Chantal Granadel, Marie-Françoise Noirot-Gros, Philippe Noirot, Patrice Polard, et Jean-Pierre Claverys. 2013. « ComE/ComE~P Interplay Dictates Activation or Extinction Status of Pneumococcal X-State (Competence) ». *Molecular Microbiology* 87 (2): 394-411. <https://doi.org/10.1111/mmi.12104>.
- Martínez-Hackert, Erik, et Ann M. Stock. 1997. « The DNA-Binding Domain of OmpR: Crystal Structures of a Winged Helix Transcription Factor ». *Structure* 5 (1): 109-24. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00170-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00170-6).
- Mascher, Thorsten. 2006. « Intramembrane-Sensing Histidine Kinases: A New Family of Cell Envelope Stress Sensors in Firmicutes Bacteria ». *FEMS Microbiology Letters* 264 (2): 133-44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00444.x>.
- Mascher, Thorsten, Manuel Heintz, Dorothea Zähler, Michelle Merai, et Regine Hakenbeck. 2006. « The CiaRH System of *Streptococcus Pneumoniae* Prevents Lysis during Stress Induced by Treatment with Cell Wall Inhibitors and by Mutations in Pbp2x Involved in Beta-Lactam Resistance ». *Journal of Bacteriology* 188 (5): 1959-68. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1959-1968.2006>.
- Mascher, Thorsten, John D. Helmann, et Gottfried Uden. 2006. « Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (4): 910-38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-06>.
- Matejuk, A., Q. Leng, M.D. Begum, M.C. Woodle, P. Scaria, S-T Chou, et A.J. Mixson. 2010. « Peptide-based Antifungal Therapies against Emerging Infections ». *Drugs of the future* 35 (3): 197.
- Mathieu, Khadija, Waqas Javed, Sylvain Vallet, Christian Lesterlin, Marie-Pierre Candusso, Feng Ding, Xiaohong Nancy Xu, Christine Ebel, Jean-Michel Jault, et Cédric Orelle. 2019. « Functionality of Membrane Proteins Overexpressed and Purified from *E. Coli* Is Highly Dependent upon the Strain ». *Scientific Reports* 9 (1): 2654. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39382-0>.
- McCluskey, J., J. Hinds, S. Husain, A. Witney, et T. J. Mitchell. 2004. « A Two-Component System That Controls the Expression of Pneumococcal Surface Antigen A (PsaA) and Regulates Virulence and Resistance to Oxidative Stress in *Streptococcus Pneumoniae*: A Two-Component System That Controls the Expression of Pneumococcal Surface Protein A ». *Molecular Microbiology* 51 (6): 1661-75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03917.x>.
- McKessar, S. J., et R. Hakenbeck. 2007. « The Two-Component Regulatory System TCS08 Is Involved in Cellobiose Metabolism of *Streptococcus Pneumoniae* R6 ». *Journal of Bacteriology* 189 (4): 1342-50. <https://doi.org/10.1128/JB.01170-06>.
- Meer, Gerrit van, et Anton I. P. M. de Kroon. 2011. « Lipid Map of the Mammalian Cell ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 1): 5-8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.



- Mellroth, Peter, Robert Daniels, Alice Eberhardt, Daniel Rönnlund, Hans Blom, Jerker Widengren, Staffan Normark, et Birgitta Henriques-Normark. 2012. « LytA, Major Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11018-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584>.
- Melo, Manuel N., et Miguel A. R. B. Castanho. 2012. « The Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides: Lipid Vesicles vs. Bacteria ». *Frontiers in Immunology* 3 (août). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00236>.
- Meurens, François, Artur Summerfield, Hans Nauwynck, Linda Saif, et Volker Gerdt. 2012. « The Pig: A Model for Human Infectious Diseases ». *Trends in Microbiology* 20 (1): 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002>.
- Miller, William R., Arnold S. Bayer, et Cesar A. Arias. 2016. « Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026997>.
- Ming, Li-June, et Jon D. Epperson. 2002. « Metal Binding and Structure–Activity Relationship of the Metalloantibiotic Peptide Bacitracin ». *Journal of Inorganic Biochemistry* 91 (1): 46-58. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00464-6](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00464-6).
- Miroux, Bruno, et John E. Walker. 1996. « Over-Production of Proteins In *Escherichia Coli*: Mutant Hosts That Allow Synthesis of Some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels ». *Journal of Molecular Biology* 260 (3): 289-98. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>.
- Mitchell, Timothy J. 2003. « The Pathogenesis of Streptococcal Infections: From Tooth Decay to Meningitis ». *Nature Reviews Microbiology* 1 (3): 219-30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro771>.
- Mitrophanov, A. Y., et E. A. Groisman. 2008. « Signal Integration in Bacterial Two-Component Regulatory Systems ». *Genes & Development* 22 (19): 2601-11. <https://doi.org/10.1101/gad.1700308>.
- Mizuno, T. 1997. « Compilation of All Genes Encoding Two-Component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of *Escherichia Coli* ». *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 4 (2): 161-68. <https://doi.org/10.1093/dnares/4.2.161>.
- Möglich, Andreas, Rebecca A. Ayers, et Keith Moffat. 2009. « Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains ». *Structure (London, England : 1993)* 17 (10): 1282-94. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>.
- Mohedano, M. Luz, Karin Overweg, Alicia de la Fuente, Mark Reuter, Silvia Altabe, Francis Mulholland, Diego de Mendoza, Paloma López, et Jerry M. Wells. 2005. « Evidence That the Essential Response Regulator YycF in *Streptococcus Pneumoniae* Modulates Expression of Fatty Acid Biosynthesis Genes and Alters Membrane Composition ». *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2357-67. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2357-2367.2005>.
- Morita, Yuji, Atsuko Kataoka, Sumiko Shiota, Tohru Mizushima, et Tomofusa Tsuchiya. 2000. « NorM of *Vibrio parahaemolyticus* Is an Na<sup>+</sup>-Driven Multidrug Efflux Pump ». *Journal of Bacteriology* 182 (23): 6694-97.
- Morlot, Cécile. 2017. « Morphogenèse et division bactérienne: une approche multidisciplinaire ».
- Müller, Anna, Anna Klöckner, et Tanja Schneider. 2017. « Targeting a Cell Wall Biosynthesis Hot Spot ». *Natural Product Reports* 34 (7): 909-32. <https://doi.org/10.1039/C7NP00012J>.
- Münch, Daniela, Anna Müller, Tanja Schneider, Bastian Kohl, Michaela Wenzel, Julia Elisabeth Bandow, Sonia Maffioli, et al. 2014. « The Lantibiotic NAI-107 Binds to Bactoprenol-bound Cell Wall Precursors and Impairs Membrane Functions ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (17): 12063-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537449>.
- Munita, Jose M., et Cesar A. Arias. 2016. « Mechanisms of Antibiotic Resistance ». *Microbiology Spectrum* 4 (2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- Munoz, Marcia, Michelle Henderson, Michelle Haber, et Murray Norris. 2007. « Role of the MRP1/ABCC1 Multidrug Transporter Protein in Cancer ». *IUBMB Life* 59 (12): 752-57. <https://doi.org/10.1080/15216540701736285>.
- Nakanishi, Takeo, et Douglas D. Ross. 2012. « Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression ». *Chinese Journal of Cancer* 31 (2): 73-99. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10320>.

- Nau, Roland, Fritz Sörgel, et Helmut Eiffert. 2010. « Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections ». *Clinical Microbiology Reviews* 23 (4): 858-83. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-10>.
- Ng, Wai-Leung, Ho-Ching Tiffany Tsui, et Malcolm E. Winkler. 2005. « Regulation of the PspA Virulence Factor and Essential PcsB Murein Biosynthetic Genes by the Phosphorylated VicR (YycF) Response Regulator in *Streptococcus Pneumoniae* ». *Journal of Bacteriology* 187 (21): 7444-59. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7444-7459.2005>.
- Nichol, Kimberly A., George G. Zhanel, et Daryl J. Hoban. 2002. « Penicillin-Binding Protein 1A, 2B, and 2X Alterations in Canadian Isolates of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (10): 3261-64. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3261-3264.2002>.
- Nishikata, M., T. Kanehira, H. Oh, H. Tani, M. Tazaki, et Y. Kuboki. 1991. « Salivary Histatin as an Inhibitor of a Protease Produced by the Oral Bacterium *Bacteroides Gingivalis* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174 (2): 625-30. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91463-m](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91463-m).
- Nissen-Meyer, Jon, Camilla Oppedgård, Per Rogne, Helen Sophie Haugen, et Per Eugen Kristiansen. 2010. « Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins ». *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2 (1): 52-60. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9021-z>.
- Niu, Chao, Dong Yu, Yuelan Wang, Hongguang Ren, Yuan Jin, Wei Zhou, Beiping Li, et al. 2013. « Common and pathogen-specific virulence factors are different in function and structure ». *Virulence* 4 (6): 473-82. <https://doi.org/10.4161/viru.25730>.
- Novak, R., B. Henriques, E. Charpentier, S. Normark, et E. Tuomanen. 1999. « Emergence of Vancomycin Tolerance in *Streptococcus Pneumoniae* ». *Nature* 399 (6736): 590-93. <https://doi.org/10.1038/21202>.
- Oancea, Giani, Megan L. O'Mara, W. F. Drew Bennett, D. Peter Tieleman, Rupert Abele, et Robert Tampé. 2009. « Structural Arrangement of the Transmission Interface in the Antigen ABC Transport Complex TAP ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (14): 5551-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811260106>.
- Ohki, Reiko, Giyanto, Kozue Tateno, Waka Masuyama, Shigeki Moriya, Kazuo Kobayashi, et Naotake Ogasawara. 2003. « The BceRS Two-Component Regulatory System Induces Expression of the Bacitracin Transporter, BceAB, in *Bacillus Subtilis*: Bacitracin-Resistant Genes in *B. Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 49 (4): 1135-44. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03653.x>.
- Okusu, H, D Ma, et H Nikaido. 1996. « AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. » *Journal of Bacteriology* 178 (1): 306-8.
- Oldham, M. L., et J. Chen. 2011. « Snapshots of the Maltose Transporter during ATP Hydrolysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (37): 15152-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108858108>.
- Oldham, Michael L., Amy L. Davidson, et Jue Chen. 2008. « Structural Insights into ABC Transporter Mechanism ». *Current Opinion in Structural Biology* 18 (6): 726-33. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.09.007>.
- Oldham, Michael L., Dheeraj Khare, Florante A. Quioco, Amy L. Davidson, et Jue Chen. 2007. « Crystal Structure of a Catalytic Intermediate of the Maltose Transporter ». *Nature* 450 (7169): 515-21. <https://doi.org/10.1038/nature06264>.
- Oppenheim, J, A Biragyn, L Kwak, et D Yang. 2003. « Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 62 (Suppl 2): ii17-21. [https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl\\_2.ii17](https://doi.org/10.1136/ard.62.suppl_2.ii17).
- Orelle, Cédric, Olivier Dalmas, Philippe Gros, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2003. « The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-Binding Cassette Transporter BmrA ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (47): 47002-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308268200>.
- Orelle, Cédric, Claire Durmort, Khadija Mathieu, Benjamin Duchêne, Sandrine Aros, François Fenaille, François André, Christophe Junot, Thierry Vernet, et Jean-Michel Jault. 2018. « A Multidrug ABC

- Transporter with a Taste for GTP ». *Scientific Reports* 8 (1): 2309. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20558-z>.
- Orelle, Cédric, Khadija Mathieu, et Jean-Michel Jault. 2019. « Multidrug ABC Transporters in Bacteria ». *Research in Microbiology* 170 (8): 381-91. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.06.001>.
- Ouyang, Jing, Xiao-Lin Tian, Jennifer Versey, Alexander Wishart, et Yung-Hua Li. 2010. « The BceABRS Four-Component System Regulates the Bacitracin-Induced Cell Envelope Stress Response in *Streptococcus Mutans* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (9): 3895-3906. <https://doi.org/10.1128/AAC.01802-09>.
- Padilla, Emma, Enrique Llobet, Antonio Doménech-Sánchez, Luis Martínez-Martínez, José Antonio Bengoechea, et Sebastián Albertí. 2010. « *Klebsiella Pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1): 177-83. <https://doi.org/10.1128/AAC.00715-09>.
- Park, C. B., H. S. Kim, et S. C. Kim. 1998. « Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (1): 253-57. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>.
- Park, Kyu-Ho, Emmanuelle Billon-Denis, Tassadite Dahmane, Florence Lebaupain, Bernard Pucci, Cécile Breyton, et Francesca Zito. 2011. « In the Cauldron of Cell-Free Synthesis of Membrane Proteins: Playing with New Surfactants ». *New Biotechnology* 28 (3): 255-61. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.08.008>.
- Paterson, Gavin K., et Tim J. Mitchell. 2006. « The Role of *Streptococcus Pneumoniae* Sortase A in Colonisation and Pathogenesis ». *Microbes and Infection* 8 (1): 145-53. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.009>.
- Pereira, Thais Cristine, Patrícia Pimentel de Barros, Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, Rodnei Dennis Rossoni, Felipe de Camargo Ribeiro, Raquel Teles de Menezes, Juliana Campos Junqueira, et Liliana Scorzoni. 2018. « Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens ». *Journal of Fungi* 4 (4). <https://doi.org/10.3390/jof4040128>.
- Pericone, Christopher D., Sunny Park, James A. Imlay, et Jeffrey N. Weiser. 2003. « Factors Contributing to Hydrogen Peroxide Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Include Pyruvate Oxidase (SpxB) and Avoidance of the Toxic Effects of the Fenton Reaction ». *Journal of Bacteriology* 185 (23): 6815-25. <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.6815-6825.2003>.
- Pesingi, Prasanna Vadhana, Bhoj Raj Singh, Pavan Kumar Pesingi, Monika Bhardwaj, Shiv Varan Singh, Manoj Kumawat, Dharmendra Kumar Sinha, et Ravi Kumar Gandham. 2019. « MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas Aeruginosa* Offers Resistance to Carvacrol: A Herbal Antimicrobial Agent ». *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02664>.
- Piepenbreier, Hannah, Angelika Diehl, et Georg Fritz. 2019. « Minimal Exposure of Lipid II Cycle Intermediates Triggers Cell Wall Antibiotic Resistance ». *Nature Communications* 10 (1): 2733. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10673-4>.
- Pietääinen, Milla, Patrice François, Hanne-Leena Hyyryläinen, Manuela Tangomo, Vera Sass, Hans-Georg Sahl, Jacques Schrenzel, et Vesa P Kontinen. 2009. « Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance ». *BMC Genomics* 10 (septembre): 429. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-429>.
- Pocanschi, Cosmin L., Tassadite Dahmane, Yann Gohon, Fabrice Rappaport, Hans-Jürgen Apell, Jörg H. Kleinschmidt, et Jean-Luc Popot. 2006. « Amphipathic Polymers: Tools to Fold Integral Membrane Proteins to Their Active Form ». *Biochemistry* 45 (47): 13954-61. <https://doi.org/10.1021/bi0616706>.
- Pontes, Daniela Santos, Marcela Santiago Pacheco de Azevedo, Jean-Marc Chatel, Philippe Langella, Vasco Azevedo, et Anderson Miyoshi. 2011. « *Lactococcus Lactis* as a Live Vector: Heterologous Protein Production and DNA Delivery Systems ». *Protein Expression and Purification* 79 (2): 165-75. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.005>.

- Poolman, Bert. 1993. « Energy transduction in lactic acid bacteria ». [https://core.ac.uk/reader/148199803?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/148199803?utm_source=linkout).
- Popella, Peter, Sophia Krauss, Patrick Ebner, Mulugeta Nega, Julia Deibert, et Friedrich Götz. 2016. « VraH Is the Third Component of the Staphylococcus aureus VraDEH System Involved in Gallidermin and Daptomycin Resistance and Pathogenicity ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (4): 2391-2401. <https://doi.org/10.1128/AAC.02865-15>.
- Popot, J.-L., T. Althoff, D. Bagnard, J.-L. Banères, P. Bazzacco, E. Billon-Denis, L. J. Catoire, et al. 2011. « Amphipols from A to Z ». *Annual Review of Biophysics* 40: 379-408. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155219>.
- Popot, J.-L., E. A. Berry, D. Charvolin, C. Creuzenet, C. Ebel, D. M. Engelman, M. Flötenmeyer, et al. 2003. « Amphipols: Polymeric Surfactants for Membrane Biology Research ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 60 (8): 1559-74. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3169-6>.
- Postis, Vincent, Shaun Rawson, Jennifer K. Mitchell, Sarah C. Lee, Rosemary A. Parslow, Tim R. Dafforn, Stephen A. Baldwin, et Stephen P. Muench. 2015. « The Use of SMALPs as a Novel Membrane Protein Scaffold for Structure Study by Negative Stain Electron Microscopy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848 (2): 496-501. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.018>.
- Prasad, Rajendra, Atanu Banerjee, Nitesh Kumar Khandelwal, et Sanjiveeni Dhamgayee. 2015. « The ABCs of Candida albicans Multidrug Transporter Cdr1 ». *Eukaryotic Cell* 14 (12): 1154-64. <https://doi.org/10.1128/EC.00137-15>.
- Pretzel, Jette, Franziska Mohring, Stefan Rahlfs, et Katja Becker. 2013. « Antiparasitic Peptides ». In *Yellow Biotechnology I*, édité par Andreas Vilcinskas, 135:157-92. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_191](https://doi.org/10.1007/10_2013_191).
- Primrose, S. B., et Richard M. Twyman. 2006. *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 7th ed. Malden, MA ; Oxford: Blackwell Pub.
- Pushpanathan, Muthuirulan, Jeyaprakash Rajendhran, Sathyanarayanan Jayashree, Balakrishnan Sundarakrishnan, Seetharaman Jayachandran, et Paramasamy Gunasekaran. 2012. « Identification of a Novel Antifungal Peptide with Chitin-Binding Property from Marine Metagenome ». *Protein and Peptide Letters* 19 (12): 1289-96. <https://doi.org/10.2174/092986612803521620>.
- Radeck, Jara, Susanne Gebhard, Peter Shevlin Orchard, Marion Kirchner, Stephanie Bauer, Thorsten Mascher, et Georg Fritz. 2016. « Anatomy of the Bacitracin Resistance Network in *B. Acillus Subtilis*: Anatomy of the Bacitracin Resistance Network ». *Molecular Microbiology* 100 (4): 607-20. <https://doi.org/10.1111/mmi.13336>.
- Rai, Prashant, Fang He, Jimmy Kwang, Bevin P. Engelward, et Vincent T.K. Chow. 2016. « Pneumococcal Pneumolysin Induces DNA Damage and Cell Cycle Arrest ». *Scientific Reports* 6 (mars). <https://doi.org/10.1038/srep22972>.
- Ramesh, Arati, Sruti DebRoy, Jonathan R. Goodson, Kristina A. Fox, Herbey Faz, Danielle A. Garsin, et Wade C. Winkler. 2012. « The Mechanism for RNA Recognition by ANTAR Regulators of Gene Expression ». *PLoS Genetics* 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002666>.
- Regev-Yochay, Gili, Krzysztof Trzciński, Claudette M. Thompson, Richard Malley, et Marc Lipsitch. 2006. « Interference between Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus: In Vitro Hydrogen Peroxide-Mediated Killing by Streptococcus pneumoniae ». *Journal of Bacteriology* 188 (13): 4996-5001. <https://doi.org/10.1128/JB.00317-06>.
- Reiners, Jens, Marcel Lagedroste, Katja Ehlen, Selina Leusch, Julia Zschke-Kriesche, et Sander H. J. Smits. 2017a. « The N-terminal Region of Nisin Is Important for the BceAB-Type ABC Transporter NsrFP from Streptococcus agalactiae COH1 ». *Frontiers in Microbiology* 8 (août). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01643>.
- . 2017b. « The N-Terminal Region of Nisin Is Important for the BceAB-Type ABC Transporter NsrFP from Streptococcus Agalactiae COH1 ». *Frontiers in Microbiology* 8 (août): 1643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01643>.

- Reinoso-Vizcaíno, Nicolás M., Melina B. Cian, Paulo R. Cortes, Nadia B. Olivero, Mirelys Hernandez-Morfa, Germán E. Piñas, Chandan Badapanda, Ankita Rathore, Daniel R. Perez, et José Echenique. 2020. « The Pneumococcal Two-Component System SirRH Is Linked to Enhanced Intracellular Survival of *Streptococcus Pneumoniae* in Influenza-Infected Pulmonary Cells ». Édité par Carlos Javier Orihuela. *PLOS Pathogens* 16 (8): e1008761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008761>.
- Rempel, S., W. K. Stanek, et D. J. Slotboom. 2019. « ECF-Type ATP-Binding Cassette Transporters ». *Annual Review of Biochemistry* 88 (juin): 551-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111705>.
- Revilla-Guarinos, Ainhoa, Qian Zhang, Christoph Loderer, Cristina Alcántara, Ariane Müller, Mohammad Rahnamaeian, Andreas Vilcinskas, Susanne Gebhard, Manuel Zúñiga, et Thorsten Mascher. 2020. « ABC Transporter DerAB of *Lactobacillus Casei* Mediates Resistance against Insect-Derived Defensins ». Édité par Harold L. Drake. *Applied and Environmental Microbiology* 86 (14): e00818-20, /aem/86/14/AEM.00818-20.atom. <https://doi.org/10.1128/AEM.00818-20>.
- Reyes, Christopher L., Andrew Ward, Jodie Yu, et Geoffrey Chang. 2006. « The Structures of MsbA: Insight into ABC Transporter-Mediated Multidrug Efflux ». *FEBS Letters*, ABC Transporters, 580 (4): 1042-48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.033>.
- Rice, Austin J., Aekyung Park, et Heather W. Pinkett. 2014. « Diversity in ABC Transporters: Type I, II and III Importers ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 49 (5): 426-37. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953626>.
- Rieg, Siegbert, Anja Huth, Hubert Kalbacher, et Winfried V. Kern. 2009. « Resistance against Antimicrobial Peptides Is Independent of *Escherichia Coli* AcrAB, *Pseudomonas Aeruginosa* MexAB and *Staphylococcus Aureus* NorA Efflux Pumps ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 33 (2): 174-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.032>.
- Rietkötter, Eva, Diana Hoyer, et Thorsten Mascher. 2008a. « Bacitracin Sensing in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 68 (3): 768-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06194.x>.
- . 2008b. « Bacitracin Sensing in *Bacillus Subtilis* ». *Molecular Microbiology* 68 (3): 768-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06194.x>.
- Rigaud, Jean-Louis, et Daniel Lévy. 2003. « Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes ». In *Methods in Enzymology*, 372:65-86. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)72004-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)72004-7).
- Rigaud, Jean-Louis, Bruno Pitard, et Daniel Levy. 1995. « Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes: Application to Energy-Transducing Membrane Proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1231 (3): 223-46. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00091-V](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00091-V).
- Rigaud, J.-L., Daniel Levy, Gervaise Mosser, et Oliver Lambert. 1998. « Detergent Removal by Non-Polar Polystyrene Beads ». *European Biophysics Journal* 27 (4): 305-19. <https://doi.org/10.1007/s002490050138>.
- Robbins, J. B., R. Austrian, C. J. Lee, S. C. Rastogi, G. Schiffman, J. Henrichsen, P. H. Mäkelä, C. V. Broome, R. R. Facklam, et R. H. Tiesjema. 1983. « Considerations for Formulating the Second-Generation Pneumococcal Capsular Polysaccharide Vaccine with Emphasis on the Cross-Reactive Types within Groups ». *The Journal of Infectious Diseases* 148 (6): 1136-59. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.6.1136>.
- Rodionov, Dmitry A., Peter Hebbeln, Aymeric Eudes, Josy ter Beek, Irina A. Rodionova, Guus B. Erkens, Dirk J. Slotboom, et al. 2009. « A Novel Class of Modular Transporters for Vitamins in Prokaryotes ». *Journal of Bacteriology* 191 (1): 42-51. <https://doi.org/10.1128/JB.01208-08>.
- Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, et H. R. Masure. 1997. « Contribution of Novel Choline-Binding Proteins to Adherence, Colonization and Immunogenicity of *Streptococcus Pneumoniae* ». *Molecular Microbiology* 25 (5): 819-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi494.x>.
- Saizieu, Antoine de, Christophe Gardès, Nicholas Flint, Christian Wagner, Markus Kamber, Timothy J. Mitchell, Wolfgang Keck, Kurt E. Amrein, et Roland Lange. 2000. « Microarray-Based Identification of a Novel *Streptococcus pneumoniae* Regulon Controlled by an Autoinduced Peptide ». *Journal of Bacteriology* 182 (17): 4696-4703.

- Santos, Joana A, Stephan Rempel, Sandra TM Mous, Cristiane T Pereira, Josy ter Beek, Jan-Willem de Gier, Albert Guskov, et Dirk J Slotboom. 2018. « Functional and Structural Characterization of an ECF-Type ABC Transporter for Vitamin B12 ». *ELife* 7 (mai): e35828. <https://doi.org/10.7554/eLife.35828>.
- Saurin, W., W. Köster, et E. Dassa. 1994. « Bacterial Binding Protein-Dependent Permeases: Characterization of Distinctive Signatures for Functionally Related Integral Cytoplasmic Membrane Proteins ». *Molecular Microbiology* 12 (6): 993-1004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01087.x>.
- Schägger, Hermann. 2006. « Tricine–SDS–PAGE ». *Nature Protocols* 1 (1): 16-22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- Scheit, K. H., E. S. Reddy, et P. M. Bhargava. 1979. « Seminaplasmin Is a Potent Inhibitor of E. Coli RNA Polymerase in Vivo ». *Nature* 279 (5715): 728-31. <https://doi.org/10.1038/279728a0>.
- Schlegel, Susan, Pierre Genevaux, et Jan-Willem de Gier. 2015. « De-Convoluting the Genetic Adaptations of E. Coli C41(DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields ». *Cell Reports* 10 (10): 1758-66. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.029>.
- Schlegel, Susan, John Löfblom, Chiara Lee, Anna Hjelm, Mirjam Klepsch, Marc Strous, David Drew, Dirk Jan Slotboom, et Jan-Willem de Gier. 2012. « Optimizing Membrane Protein Overexpression in the Escherichia Coli Strain Lemo21(DE3) ». *Journal of Molecular Biology* 423 (4): 648-59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.019>.
- Schneider, Tanja, et Hans-Georg Sahl. 2010. « An Oldie but a Goodie - Cell Wall Biosynthesis as Antibiotic Target Pathway ». *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 300 (2-3): 161-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.005>.
- Schweizer, Frank. 2009a. « Cationic Amphiphilic Peptides with Cancer-Selective Toxicity ». *European Journal of Pharmacology* 625 (1-3): 190-94. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.043>.
- . 2009b. « Cationic Amphiphilic Peptides with Cancer-Selective Toxicity ». *European Journal of Pharmacology* 625 (1-3): 190-94. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.043>.
- Sengupta, Saswati, Madhab K. Chattopadhyay, et Hans-Peter Grossart. 2013. « The Multifaceted Roles of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature ». *Frontiers in Microbiology* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>.
- Sercombe, Lisa, Tejaswi Veerati, Fatemeh Moheimani, Sherry Y. Wu, Anil K. Sood, et Susan Hua. 2015. « Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery ». *Frontiers in Pharmacology* 6 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- Shelton, Catherine L., Forrest K. Raffle, Wandy L. Beatty, Sara M. Johnson, et Kevin M. Mason. 2011. « Sap Transporter Mediated Import and Subsequent Degradation of Antimicrobial Peptides in Haemophilus ». Édité par H. Steven Seifert. *PLoS Pathogens* 7 (11): e1002360. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002360>.
- Sherwood, E. J., A. R. Hesketh, et M. J. Bibb. 2013. « Cloning and Analysis of the Planosporicin Lantibiotic Biosynthetic Gene Cluster of Planomonospora Alba ». *Journal of Bacteriology* 195 (10): 2309-21. <https://doi.org/10.1128/JB.02291-12>.
- Siegel, Steven J., et Jeffrey N. Weiser. 2015. « Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract ». *Annual review of microbiology* 69: 425-44. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104209>.
- Siggins, Robert W., John N. Melvan, David A. Welsh, Gregory J. Bagby, Steve Nelson, et Ping Zhang. 2011. « Alcohol Suppresses the Granulopoietic Response to Pulmonary Streptococcus Pneumoniae Infection with Enhancement of STAT3 Signaling ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (7): 4306-13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002885>.
- Silvestro, Loraine, Jeffrey N. Weiser, et Paul H. Axelsen. 2000. « Antibacterial and Antimembrane Activities of Cecropin A in Escherichia coli ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3): 602-7.
- Simone, Matteo, Paolo Monciardini, Eleonora Gaspari, Stefano Donadio, et Sonia I. Maffioli. 2013. « Isolation and Characterization of NAI-802, a New Lantibiotic Produced by Two Different Actinoplanes Strains ». *The Journal of Antibiotics* 66 (2): 73-78. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.92>.

- Smith, Heather J., Kimberly A. Nichol, Daryl J. Hoban, et George G. Zhanel. 2002. « Dual Activity of Fluoroquinolones against *Streptococcus Pneumoniae*: The Facts behind the Claims ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49 (6): 893-95. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf047>.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, et D. C. Klenk. 1985. « Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid ». *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Smith, Paul C, Nathan Karpowich, Linda Millen, Jonathan E Moody, Jane Rosen, Philip J Thomas, et John F Hunt. 2002. « ATP Binding to the Motor Domain from an ABC Transporter Drives Formation of a Nucleotide Sandwich Dimer ». *Molecular Cell* 10 (1): 139-49. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00576-2).
- Smits, Sander H.J., Lutz Schmitt, et Konstantinos Beis. 2020. « Self-immunity to Antibacterial Peptides by ABC Transporters ». *FEBS Letters* 594 (23): 3920-42. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13953>.
- Standish, Alistair J., Uwe H. Stroehrer, et James C. Paton. 2007. « The Pneumococcal Two-Component Signal Transduction System RR/HK06 Regulates CbpA and PspA by Two Distinct Mechanisms ». *Journal of Bacteriology* 189 (15): 5591-5600. <https://doi.org/10.1128/JB.00335-07>.
- Staroń, Anna, Dora Elisabeth Finkeisen, et Thorsten Mascher. 2011a. « Peptide Antibiotic Sensing and Detoxification Modules of *Bacillus Subtilis* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (2): 515-25. <https://doi.org/10.1128/AAC.00352-10>.
- . 2011b. « Peptide Antibiotic Sensing and Detoxification Modules of *Bacillus subtilis* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (2): 515-25. <https://doi.org/10.1128/AAC.00352-10>.
- Steel, Helen C., Riana Cockeran, Ronald Anderson, et Charles Feldman. 2013. « Overview of Community-Acquired Pneumonia and the Role of Inflammatory Mechanisms in the Immunopathogenesis of Severe Pneumococcal Disease ». *Mediators of Inflammation* 2013: 490346. <https://doi.org/10.1155/2013/490346>.
- Štefková, J, R Poledne, et J A Hubá. 2003. « ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Human Metabolism and Diseases » 53: 9.
- Stein, Torsten, Stefan Heinzmann, Irina Solovieva, et Karl-Dieter Entian. 2003. « Function of *Lactococcus Lactis* Nisin Immunity Genes *NisI* and *NisFEG* after Coordinated Expression in the Surrogate Host *Bacillus Subtilis* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (1): 89-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207237200>.
- Steinfels, Emmanuelle, Cédric Orelle, Jean-Raphaël Fantino, Olivier Dalmas, Jean-Louis Rigaud, François Denizot, Attilio Di Pietro, et Jean-Michel Jault. 2004. « Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus Subtilis* ». *Biochemistry* 43 (23): 7491-7502. <https://doi.org/10.1021/bi0362018>.
- Stevenson, Cynthia L. 2009. « Advances in Peptide Pharmaceuticals ». *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10 (1): 122-37. <https://doi.org/10.2174/138920109787048634>.
- Stock, Ann M., Victoria L. Robinson, et Paul N. Goudreau. 2000. « Two-Component Signal Transduction ». *Annual Review of Biochemistry* 69 (1): 183-215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>.
- Stratton, C. W. 2000. « Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents ». *Le Journal Medical Libanais. The Lebanese Medical Journal* 48 (4): 186-98.
- Studier, F. W. 1991. « Use of Bacteriophage T7 Lysozyme to Improve an Inducible T7 Expression System ». *Journal of Molecular Biology* 219 (1): 37-44. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90855-z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90855-z).
- Studier, F. W., et B. A. Moffatt. 1986. « Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes ». *Journal of Molecular Biology* 189 (1): 113-30. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, et J. W. Dubendorff. 1990. « Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes ». *Methods in Enzymology* 185: 60-89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c).
- Sun, Yue-Li, Atish Patel, Priyank Kumar, et Zhe-Sheng Chen. 2012. « Role of ABC transporters in cancer chemotherapy ». *Chinese Journal of Cancer* 31 (2): 51-57. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10466>.

- Sung, C. K., H. Li, J. P. Claverys, et D. A. Morrison. 2001. « An RpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus Pneumoniae* ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11): 5190-96. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5190-5196.2001>.
- Taglialegna, Agustina, Maria C. Varela, Roberto R. Rosato, et Adriana E. Rosato. 2019. « VraSR and Virulence Trait Modulation during Daptomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infection ». Édité par Paul D. Fey. *MSphere* 4 (1): e00557-18, /msphere/4/1/mSphere557-18.atom. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00557-18>.
- Tam, James P., Shujing Wang, Ka H. Wong, et Wei Liang Tan. 2015. « Antimicrobial Peptides from Plants ». *Pharmaceuticals* 8 (4): 711-57. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>.
- Tang, Jing, Jiali Hu, Lei Kang, Zhengjun Deng, Jiaofen Wu, et Jiaqian Pan. 2015. « The use of vancomycin in the treatment of adult patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: a survey in a tertiary hospital in China ». *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (10): 19436-41.
- Taylor, Nicholas M. I., Ioannis Manolaridis, Scott M. Jackson, Julia Kowal, Henning Stahlberg, et Kaspar P. Locher. 2017. « Structure of the Human Multidrug Transporter ABCG2 ». *Nature* 546 (7659): 504-9. <https://doi.org/10.1038/nature22345>.
- Taylor, Scott D., et Michael Palmer. 2016. « The Action Mechanism of Daptomycin ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24 (24): 6253-68. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.052>.
- Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, et al. 2001. « Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus Pneumoniae* ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5529): 498-506. <https://doi.org/10.1126/science.1061217>.
- « The State of the World's Antibiotics, 2015 ». s. d. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP). Consulté le 26 mars 2020. [https://cddep.org/publications/state\\_worlds\\_antibiotics\\_2015/](https://cddep.org/publications/state_worlds_antibiotics_2015/).
- Thevaranjan, Netusha, Fiona J. Whelan, Alicja Puchta, Eta Ashu, Laura Rossi, Michael G. Surette, et Dawn M. E. Bowdish. 2016. « *Streptococcus Pneumoniae* Colonization Disrupts the Microbial Community within the Upper Respiratory Tract of Aging Mice ». *Infection and Immunity* 84 (4): 906-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01275-15>.
- Thompson, Andrew, Jürgen Schäfer, Karsten Kuhn, Stefan Kienle, Josef Schwarz, Günter Schmidt, Thomas Neumann, R. Johnstone, A. Karim A. Mohammed, et Christian Hamon. 2003. « Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS ». *Analytical Chemistry* 75 (8): 1895-1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>.
- Throup, John P., Kristin K. Koretke, Alexander P. Bryant, Karen A. Ingraham, Alison F. Chalker, Yigong Ge, Andrea Marra, et al. 2000a. « A Genomic Analysis of Two-Component Signal Transduction in *Streptococcus Pneumoniae* ». *Molecular Microbiology* 35 (3): 566-76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01725.x>.
- . 2000b. « A Genomic Analysis of Two-Component Signal Transduction in *Streptococcus Pneumoniae*: Two-Component Signal Transduction in *S. Pneumoniae* ». *Molecular Microbiology* 35 (3): 566-76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01725.x>.
- Tian, Xiao-Lin, Hasan Salim, Gaofeng Dong, Madison Parcells, et Yung-Hua Li. 2018. « The BceABRS Four-Component System That Is Essential for Cell Envelope Stress Response Is Involved in Sensing and Response to Host Defence Peptides and Is Required for the Biofilm Formation and Fitness of *Streptococcus Mutans* ». *Journal of Medical Microbiology* 67 (6): 874-83. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000733>.
- Tokairin, Yoshikane, Yoko Shibata, Makoto Sata, Shuichi Abe, Noriaki Takabatake, Akira Igarashi, Tomomi Ishikawa, Sumito Inoue, et Isao Kubota. 2008. « Enhanced Immediate Inflammatory Response to *Streptococcus Pneumoniae* in the Lungs of Mice with Pulmonary Emphysema ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 13 (3): 324-32. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01229.x>.
- Tracey, W. Daniel. 2007. « Genetics Can Be Painless: Molecular Genetic Analysis of Nociception in *Drosophila* ». In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, édité par Wolfgang B. Liedtke et Stefan Heller. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5247/>.



- Tribet, Christophe, Roland Audebert, et Jean-Luc Popot. 1996. « Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (26): 15047-50.
- Trihn, My, Xiuchun Ge, Alleson Dobson, Todd Kitten, Cindy L. Munro, et Ping Xu. 2013. « Two-Component System Response Regulators Involved in Virulence of *Streptococcus Pneumoniae* TIGR4 in Infective Endocarditis ». Édité par Indranil Biswas. *PLoS ONE* 8 (1): e54320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054320>.
- Tsai, Catherine Jia-Yun, Jacelyn Mei San Loh, et Thomas Proft. 2016. « *Galleria Mellonella* Infection Models for the Study of Bacterial Diseases and for Antimicrobial Drug Testing ». *Virulence* 7 (3): 214-29. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.
- Tsuda, Hiromasa, Yoshihisa Yamashita, Yukie Shibata, Yoshio Nakano, et Toshihiko Koga. 2002. « Genes Involved in Bacitracin Resistance in *Streptococcus mutans* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (12): 3756-64. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3756-3764.2002>.
- Tsutsumi, Kenta, Ryo Yonehara, Etsuko Ishizaka-Ikeda, Naoyuki Miyazaki, Shintaro Maeda, Kenji Iwasaki, Atsushi Nakagawa, et Eiki Yamashita. 2019. « Structures of the Wild-Type MexAB–OprM Tripartite Pump Reveal Its Complex Formation and Drug Efflux Mechanism ». *Nature Communications* 10 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09463-9>.
- Ulijasz, Andrew T., Shaun P. Falk, et Bernard Weisblum. 2009. « Phosphorylation of the RitR DNA-Binding Domain by a Ser-Thr Phosphokinase: Implications for Global Gene Regulation in the Streptococci ». *Molecular Microbiology* 71 (2): 382-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06532.x>.
- Ulrich, Luke E., Eugene V. Koonin, et Igor B. Zhulin. 2005. « One-Component Systems Dominate Signal Transduction in Prokaryotes ». *Trends in Microbiology* 13 (2): 52-56. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.12.006>.
- Uyterhoeven, Erika T., Chase H. Butler, Danette Ko, et Donald E. Elmore. 2008. « Investigating the Nucleic Acid Interactions and Antimicrobial Mechanism of Buforin II ». *FEBS Letters* 582 (12): 1715-18. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.036>.
- Van Acker, Heleen, Patrick Van Dijck, et Tom Coenye. 2014. « Molecular Mechanisms of Antimicrobial Tolerance and Resistance in Bacterial and Fungal Biofilms ». *Trends in Microbiology* 22 (6): 326-33. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.001>.
- Vanaken, T., S. Foxall-Vanaken, S. Castleman, et S. Ferguson-Miller. 1986. « [3] Alkyl Glycoside Detergents: Synthesis and Applications to the Study of Membrane Proteins ». In *Methods in Enzymology*, 125:27-35. Biomembranes Part M. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(86\)25005-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(86)25005-3).
- Varney, Kristen M., Alexandre M. J. J. Bonvin, Marzena Pazgier, Jakob Malin, Wenbo Yu, Eugene Ateh, Taiji Oashi, et al. 2013. « Turning Defense into Offense: Defensin Mimetics as Novel Antibiotics Targeting Lipid II ». Édité par Michael Zasloff. *PLoS Pathogens* 9 (11): e1003732. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003732>.
- Vázquez-Laslop, Nora, et Alexander S. Mankin. 2018. « How macrolide antibiotics work ». *Trends in biochemical sciences* 43 (9): 668-84. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011>.
- Velikova, Nadya, Kevin Kavanagh, et Jerry M. Wells. 2016. « Evaluation of *Galleria Mellonella* Larvae for Studying the Virulence of *Streptococcus Suis* ». *BMC Microbiology* 16 (1): 291. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0905-2>.
- Ventola, C Lee. 2015. « The Antibiotic Resistance Crisis », 7.
- Vigonsky, Elena, Elena Ovcharenko, et Oded Lewinson. 2013. « Two Molybdate/Tungstate ABC Transporters That Interact Very Differently with Their Substrate Binding Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (14): 5440-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213598110>.
- Vinothkumar, Kutti R., et Richard Henderson. 2010. « Structures of Membrane Proteins ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 43 (1): 65-158. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000041>.
- Vorac, Jaroslav. 2016. « Le Fonctionnement Du Transporteur ABC de *Streptococcus Pneumoniae* Impliqué Dans La Résistance Contre Les Peptides Antimicrobiens ». Université Grenoble Alpes.

- Vuong, Cuong, Jovanka M. Voyich, Elizabeth R. Fischer, Kevin R. Braughton, Adeline R. Whitney, Frank R. DeLeo, et Michael Otto. 2004. « Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) Protects Staphylococcus Epidermidis against Major Components of the Human Innate Immune System ». *Cellular Microbiology* 6 (3): 269-75. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x>.
- Wagner, S., M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, et al. 2008. « Tuning Escherichia Coli for Membrane Protein Overexpression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (38): 14371-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804090105>.
- Wagner, Samuel, Louise Baars, A. Jimmy Ytterberg, Anja Klussmeier, Claudia S. Wagner, Olof Nord, Per-Ake Nygren, Klaas J. van Wijk, et Jan-Willem de Gier. 2007. « Consequences of Membrane Protein Overexpression in Escherichia Coli ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6 (9): 1527-50. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600431-MCP200>.
- Wagner, Samuel, Mirjam M. Klepsch, Susan Schlegel, Ansgar Appel, Roger Draheim, Michael Tarry, Martin Högbom, et al. 2008. « Tuning Escherichia Coli for Membrane Protein Overexpression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (38): 14371-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804090105>.
- Wang, Charles Y., Nisha Patel, Wei-Yun Wholey, et Suzanne Dawid. 2018. « ABC transporter content diversity in Streptococcus pneumoniae impacts competence regulation and bacteriocin production ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (25): E5776-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804668115>.
- Weinstein, John N., Robert Blumenthal, et Richard D. Klausner. 1986. « [38] Carboxyfluorescein Leakage Assay for Lipoprotein-Liposome Interaction ». In *Methods in Enzymology*, 128:657-68. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28098-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28098-2).
- Weiser, Jeffrey N., Daniela M. Ferreira, et James C. Paton. 2018. « Streptococcus Pneumoniae: Transmission, Colonization and Invasion ». *Nature Reviews Microbiology* 16 (6): 355-67. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>.
- WHO. 2014. « WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance ». WHO. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>.
- Wholey, Wei-Yun, Maha Abu-Khdeir, Emily A. Yu, Saher Siddiqui, Ogenna Esimai, et Suzanne Dawid. 2019. « Characterization of the Competitive Pneumocin Peptides of Streptococcus pneumoniae ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (mars): 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00055>.
- Wibowo, David, et Chun-Xia Zhao. 2019. « Recent Achievements and Perspectives for Large-Scale Recombinant Production of Antimicrobial Peptides ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (2): 659-71. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9524-1>.
- Wilkins, Stephan. 2015. « Structure and mechanism of ABC transporters ». *F1000Prime Reports* 7 (février). <https://doi.org/10.12703/P7-14>.
- Wimley, William C. 2010. « Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model ». *ACS chemical biology* 5 (10): 905-17. <https://doi.org/10.1021/cb1001558>.
- Wiseman, Benjamin, Arnaud Kilburg, Vincent Chaptal, Gina Catalina Reyes-Mejia, Jonathan Sarwan, Pierre Falson, et Jean-Michel Jault. 2014. « Stubborn Contaminants: Influence of Detergents on the Purity of the Multidrug ABC Transporter BmrA ». *PLoS ONE* 9 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114864>.
- Wood, W. Barry, et Mary Ruth Smith. 1949. « THE INHIBITION OF SURFACE PHAGOCYTOSIS BY THE CAPSULAR "SLIME LAYER" OF PNEUMOCOCCUS TYPE III ». *The Journal of Experimental Medicine* 90 (1): 85-96.
- Wright, G. 2005. « Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1451-70. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>.
- Yang, Ying, Mingjing Luo, Haokui Zhou, Carmen Li, Alison Luk, GuoPing Zhao, Kitty Fung, et Margaret Ip. 2019. « Role of Two-Component System Response Regulator BceR in the Antimicrobial Resistance, Virulence, Biofilm Formation, and Stress Response of Group B Streptococcus ». *Frontiers in Microbiology* 10 (janvier): 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00010>.

- Yasin, Bushra, Wei Wang, Mabel Pang, Natalia Cheshenko, Teresa Hong, Alan J. Waring, Betsy C. Herold, Elizabeth A. Wagar, et Robert I. Lehrer. 2004. « Theta Defensins Protect Cells from Infection by Herpes Simplex Virus by Inhibiting Viral Adhesion and Entry ». *Journal of Virology* 78 (10): 5147-56. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.10.5147-5156.2004>.
- Yeaman, Michael R., et Nannette Y. Yount. 2003. « Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance ». *Pharmacological Reviews* 55 (1): 27-55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.
- Yerushalmi, Hagit, Mario Lebendiker, et Shimon Schuldiner. 1995. « EmrE, an Escherichia Coli 12-KDa Multidrug Transporter, Exchanges Toxic Cations and H<sup>+</sup> and Is Soluble in Organic Solvents ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (12): 6856-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6856>.
- Yount, Nannette Y., et Michael R. Yeaman. 2013. « Peptide Antimicrobials: Cell Wall as a Bacterial Target: Peptide Antimicrobials ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277 (1): 127-38. <https://doi.org/10.1111/nyas.12005>.
- Zafar, M. Ammar, Yang Wang, Shigeto Hamaguchi, et Jeffrey N. Weiser. 2017. « Host-to-Host Transmission of Streptococcus Pneumoniae Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin ». *Cell Host & Microbe* 21 (1): 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.005>.
- Zaitseva, Jelena, Stefan Jenewein, Alexander Wiedenmann, Houssain Benabdelhak, I. Barry Holland, et Lutz Schmitt. 2005. « Functional Characterization and ATP-Induced Dimerization of the Isolated ABC-Domain of the Haemolysin B Transporter ». *Biochemistry* 44 (28): 9680-90. <https://doi.org/10.1021/bi0506122>.
- Zasloff, M. 1987. « Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from Xenopus Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (15): 5449-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449>.
- Zhanel, G. G., M. Dueck, D. J. Hoban, L. M. Vercaigne, J. M. Embil, A. S. Gin, et J. A. Karlowsky. 2001. « Review of Macrolides and Ketolides: Focus on Respiratory Tract Infections ». *Drugs* 61 (4): 443-98. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161040-00003>.
- Zhang, Hai-tao, Jun Wu, Hai-feng Zhang, et Qi-feng Zhu. 2006. « Efflux of Potassium Ion Is an Important Reason of HL-60 Cells Apoptosis Induced by Tachyplesin ». *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (10): 1367-74. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00377.x>.
- Zhang, Ling-juan, et Richard L. Gallo. 2016. « Antimicrobial Peptides ». *Current Biology* 26 (1): R14-19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.
- Zhang, Minhua, Zhihao Bao, Qin Zhao, Hui Guo, Ke Xu, Chengcheng Wang, et Peng Zhang. 2014. « Structure of a Pantothenate Transporter and Implications for ECF Module Sharing and Energy Coupling of Group II ECF Transporters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (52): 18560-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412246112>.
- Zheng, Sen, et Kenji Sonomoto. 2018. « Diversified Transporters and Pathways for Bacteriocin Secretion in Gram-Positive Bacteria ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (10): 4243-53. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8917-5>.
- Zolnerciks, Joseph K., Begum G. Akkaya, Marjolein Snippe, Peter Chiba, Anna Seelig, et Kenneth J. Linton. 2014. « The Q Loops of the Human Multidrug Resistance Transporter ABCB1 Are Necessary to Couple Drug Binding to the ATP Catalytic Cycle ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (10): 4335-46. <https://doi.org/10.1096/fj.13-245639>.
- Zoonens, Manuela, et Jean-Luc Popot. 2014. « Amphipols for Each Season ». *The Journal of Membrane Biology* 247 (9-10): 759-96. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9666-8>.
- Zutz, Ariane, Jan Hoffmann, Ute A. Hellmich, Clemens Glaubitz, Bernd Ludwig, Bernd Brutschy, et Robert Tampé. 2011. « Asymmetric ATP Hydrolysis Cycle of the Heterodimeric Multidrug ABC Transport Complex TmrAB from Thermus Thermophilus ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (9): 7104-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201178>.