UNIVERSITE DE RENNES 1
(UFR Sciences de la Vie et de l'Environment)

UNIVERSITE DE RENNES 1 (U.F.R Sciences de la vie et de l'Environnement)

MASTER

SCIENCES ,TECHNOLOGIE, SANTE: mention BIOLOGIE, AGRONOMIE, SANTE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée – MFA

Evaluation de l'activité antibactérienne d'une nouvelle molécule ciblant la Trans- Traduction

Mémoire présenté le 26 Septembre 2014

Par ABDULHUSSIEN Hind

Stage effectué au sein de l'UA 1254, Université Rennes 1

UNIVERSITE DE RENNES 1 (U.F.R Sciences de la vie et de l'Environnement)

MASTER

SCIENCES ,TECHNOLOGIE, SANTE: mention BIOLOGIE, AGRONOMIE, SANTE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée – MFA

Evaluation de l'activité antibactérienne d'une nouvelle molécule ciblant la Trans- Traduction

Mémoire présenté le 26 Septembre 2014

Par ABDULHUSSIEN Hind

Maitre de stage: Gwennola ERMEL

Stage effectué au sein de l'UA 1254, Université Rennes 1

Dans le cadre de mon master 2 Sciences, Technologies, Santé : mention biologie, agronomie, santé Parcours : Microbiologie Fondamentale et Appliquée (MFA) de l'année 2013/2014, j'ai eu l'opportunité d'effectuer un stage de 6 mois (1 avril 2014 au 30 septembre 2014) au sein du laboratoire de l'UA 1254, Université Rennes 1. Encadré par **Gwennola ERMEL**, mon stage portait sur la Evaluation de l'activité antibactérienne d'une nouvelle molécule ciblant la Trans-Traduction.

ABDULHUSSIEN Hind

Remerciements

Je remercie Pr. Gwennola ERMEL mon maitre de stage, de m'avoir encadrée durant ces 6 mois, elle m'a appris comment trouver des solutions à tous les problèmes et la façon de penser pour améliorer notre recherche et je remercie bien pour le temps qu'elle a passé à corriger mon rapport.

Je remercie Pr. Carlos BLANCO responsable de master et chef de labo pour toute l'aide et les conseils pendent toute l'année.

Mes remerciements s'adressent à Sylvie GEORGEAULT, et Olivia SOLECKI pour leur implication, leurs conseils, leur enthousiasme ainsi que pour tout le temps qu'elles m'ont accordé tout au long du stage.

Je remercie également Annie TRAUTWETTER, Anne-Marie GOURAUD pour toute l'aide et les conseils qu'elle ont pu m'apporter durant ce stage.

Je remercie Marie-Christine SAVARY et Marie UGUET pour toute l'aide.

SOMMAIRE

Introduction **1**
1. Généralités 1
2. Résistances aux antibiotiques 1
    i. La production d'enzymes dégradant ou inactivant l'antibiotique 2
    ii. La modification de la cible de l'antibiotique 2
    iii. La réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique 2
3. Les systèmes d'efflux bactérien 3
4. Déblocage des ribosomes : Trans-traduction et autres systèmes 5
    a. Trans-traduction 5
    b. Les systèmes impliquant les protéines Arf (ArfA et ArfB) 7
    c. Objectif et stratégie 7
Matériels et Méthodes **8**
I- Souches bactériennes, bactériophage, molécules chimiques et conditions de culture 8
    a. Souches bactériennes 8
    b. Bactériophage 8
    c. Antibiotiques et molécules anti trans-traduction 8
2. Evaluation de l'effet des molécules anti-trans-traduction 8
    a. Préparation des solutions bactériennes 10
    b. Suivis de croissance 11
3. Evaluation de la sensibilité à la polymyxine 10
4. Transduction 11
    a. Préparation des bactériophages P1 à partir des souches donneuses 11
    b.Transduction et sélection des transductants 11
    c. Vérification du transfert des délétions par amplification par PCR 11
        - Extraction desADN génomiques 11
        - Réactions d'amplification 12
Résultats et Discussion **15**
1. Analyse de l'effet du KKL-35 sur les souches d'E.coli 15
    a. Analyse sur la souche de référence MG1655 – Effet de la température 15
    b. Analyse de l'effet du KKL-35 sur une collection de souches 15
    c. Analyse de l'effet du KKL-35 en présence de polymixine 16
2. Analyse de l'effet du KKL-35 sur des mutants de la trans-traduction et de pompe d'efflux. 19
    a. Construction de mutants isogèniques de MG1655 19
    b. Effet du KKL-35 sur les souches 6103 et 6128 mutantes dans la porine*TolC* 19
    c. Effet du KKL-35 sur les mutants de trans-traduction (*ssrA et smpB*) et un mutant d'un facteur de sauvetage des ribosomes (*arfA* 21
Conclusion et Perspectives **24**
Références Bibliographiques **26**

Liste des figures

Figure 1. L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy & Marshall, 2004). 3
Figure 2. Illustration schématique des principales pompes bactériennes d'efflux chez les bactéries gram négatives (A) et Gram-positives (B) (Piddock, 2006 4
Figure 3. Représentation schématique de la trans-traduction 6
Figure 4. Representation schématique des amplification par PCR 12
Figure 5. Effet du KKL-35 sur la croissance de MG1655 14
Figure 6. Pourcentages d'inhibition des rendements de croissance à différentes concentrations de KKL-35 14
Figure 7. Vérification de la souche E. coli6128 (MG1655Δ*tolC*::kan) 19
Figure 8. Courbes de croissance des souches 6103 et 6128 avec différentes concentrationsde KKL-35 20
Figure 9. Inhibitions des rendements de croissance pour les souches MG1655, 6025, 6089 et 6095 avec par différentes concentrations de KKL-35 22

Liste des tableaux

Tableau 1. Souches d'Escherichia coli utilisées dans cette étude 9
Tableau 2. Effet du KKL-35 sur les taux de croissance (μ 14
Tableau 3. Effet du KKL-35 sur les taux de croissance (μ) et des taux d'inhibition pour des souches de référence et uro-pathogènes 16
Tableau 4. Concentrations minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) pour des souches de référence et uro-pathogènes 17
Tableau 5. Effet du KKL-35 en présence de Polymyxine pour des souches de référence et uro-pathogènes 18
Tableau 6. Effet du KKL-35 sur les taux de croissance des mutants *ssrA*, *smpB* et *arfA*. 20

Liste des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice
CMB : Concentration minimale bactéricide
AND : Acide désoxyribonucléotidiqu
ARN : Acide ribonucléotidique
ARNtm : ARN transfert-messager
TLD: tRNA-like domain
MLD: Messenger-like domain
RF2 : Release Factor
DHFR : dihydrofolate reductase
RND: Resistance-nodulation-cell-divison
MFP : Membrane fusion protein
OMF : Outer membrane factor
LPS : Lipopolysaccharides
PLP : Protéines de liaison à la pénicilline
GTP : Guanosine triphosphate
PCR : Polymerase chain reaction
MH : Mueller Hinton
LB : Luria Bertani
DMSO: Dimethylsulfoxyde
Pm: Polymixine
Kan : Kanamycine
EDTA : Éthylène diamine tétra acétate
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
DO : Densité optique

Unités utilisées
Kb : kilobases
Pb : paire de bases

Chapitre I

Introduction

I. INTRODUCTION

1. Généralités

L'utilisation des antibiotiques s'accompagne inéluctablement par l'apparition de résistances acquises par les souches bactériennes d'origine humaine ou animale. Ces bactéries ayant acquis un ou plusieurs gènes de résistance à un ou plusieurs antibiotiques sont susceptibles d'être à l'origine d'échecs thérapeutiques. La complexité du phénomène réside notamment dans la diversité des espèces bactériennes, des antibiotiques concernés et des mécanismes mis en jeu.

La présence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques a stimulé la recherche de nouvelles voies qui peuvent être ciblés par le développement des antibiotiques. Une voie non exploitée est la *trans*-traduction, qui permet de débloquer les ribosomes en cas d'arrêt de traduction. Deux composants majeurs de la *trans*-traduction ont été caractérisés et identifiés dans les génomes bactériens séquencés. Les mutations dans ces composants affectent la viabilité ou la virulence dans un large éventail de bactéries, ce qui suggère que des inhibiteurs de la *trans*-traduction pourraient être efficaces comme antibiotiques à large spectre. Un des avantages pour cibler la voie de *trans*-traduction est que le mécanisme de contrôle qualité chez les eucaryotes est différent, ainsi les inhibiteurs seraient spécifiques des bactéries et devraient avoir peu d'effets secondaires effets sur l'hôte.

2. Résistances aux antibiotiques

Dans les années 30, Flemming avait déjà envisagé l'apparition de formes de résistance. Cela fut confirmé par l'apparition de bactéries résistantes à la pénicilline cinq ans après les premières prescriptions de cet antibiotique. Si ce phénomène de «pharmaco-résistance» était d'abord peu répandu et n'inquiétait pas les autorités, il s'agit aujourd'hui d'un problème de santé publique. Depuis plus de 20 ans, la découverte de nouveaux antibiotiques efficaces se fait rare face à une résistance en constante augmentation.

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle ou intrinsèque concerne toutes les souches d'une espèce bactérienne et détermine un phénotype sauvage et s'explique par l'absence de la cible de l'antibiotique ou par son inaccessibilité. Les gènes de résistance naturelle sont généralement chromosomiques et transmissibles aux cellules filles lors de la division bactérienne. La résistance acquise ne concerne qu'une partie des souches d'une espèce bactérienne qui deviennent résistantes par une ou des modifications du patrimoine génétique (mutation dans un gène chromosomique ou acquisition d'un

gèneporté par un plasmide conjugatif ou par un bactériophage ou élément mobile). Dans certains cas, les gènes de résistance nouvellement introduits peuvent s'intégrer dans son chromosome grâce à des phénomènes de recombinaison homologue ou de transposition.(Sanders *et al*., 2001 ; Lozniewski& Rabaud, 2010).

Trois principales stratégies de résistance sont développées par les bactéries :

i. La production d'enzymes dégradant ou inactivant l'antibiotique:

L'exemple typique est celui des β-lactamases qui sont majoritairement à l'origine de la résistance aux β- lactames, notamment avec l'apparition des β-lactamases à large spectre d'action ou ESBL pour Exended-Spectrum- Bêta-Lactamase (Thomson & Smith, 2000 ;Babic et *al*.,2006). Ces enzymes sont sécrétées dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram-négatif et hydrolysent les antibiotiques constitués d'un noyau β-lactame, comme la pénicilline ou les céphalosporines. Un autre exemple est celui de la résistance aux aminoglycosides. Cette fois il s'agit d'une modification chimique qui empêche la fixation de l'antibiotique sur sa cible. Les enzymes en question sont les O-phosphotransférases, les O-adényltransférases ou les N-acétyltransférases (Wright, 1999). Enfin, la résistance au chloramphénicol est également liée à une enzyme de modification : une O-acétyltransférase (Murray & Shaw, 1997).

ii. La modification de la cible de l'antibiotique

Les cibles des antibiotiques sont majoritairement des protéines. Leur mutation peut conduire à une perte de reconnaissance de l'antibiotique qui devient alors inactif. C'est le cas des PLP (Protéines de Liaison à la Pénicilline) qui sont les enzymes assurant l'assemblage des peptidoglycanes de la paroi bactérienne (transglycosidase et transpeptidase) et qui sont ciblées par les β-lactames, classe d'antibiotique dont fait partie la pénicilline. La mutation des PLP provoque une diminution de l'affinité pour ces antibiotiques (Hakenbeck&Coyette, 1998).

iii. La réduction de la concentration intracellulaire d'antibiotique

La résistance innée des bactéries aux antibiotiques est en partie liée à l'imperméabilité naturelle de la paroi cellulaire. Cela est particulièrement vrai chez les bactéries à Gram-négatif dont la paroi cellulaire est constituée de deux membranes interne et externe séparées par un espace périplasmique où de nombreuses molécules (oligosaccharides, protéines solubles et peptidoglycanes) sont présentes. Le peptidoglycane et les lipopolysaccharides

(LPS) de la membrane externe sont à l'origine de la rigidité de la membrane externe et responsables de la faible diffusion des molécules à travers la paroi cellulaire, tels que les antibiotiques (Nikaido, 2003).

La concentration intracellulaire d'antibiotique peut être significativement réduite par la synergie de deux évènements : la modification (ou l'absence) des porines et le transport actif vers l'extérieur de la cellule par des pompes d'efflux (Li &Nikaido, 2004). Ces dernières sont décrites plus précisément dans la partie qui suit.

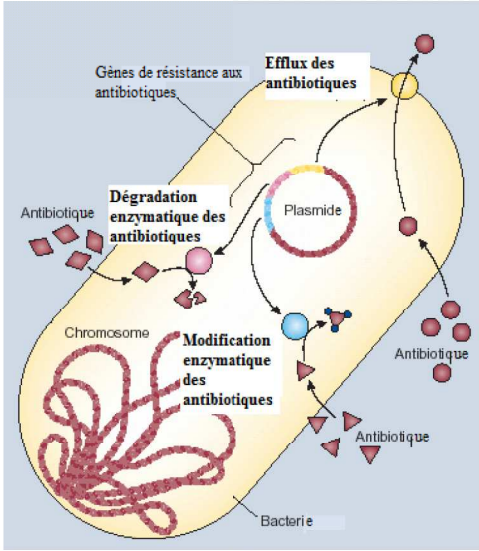


Figure1. L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy &Marshall, 2004).

2. *Les systèmes d'efflux bactériens*

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques »ou prendre en charge des composés de structures très différentes et contribuer à la multi-résistance (MDR : multi-résistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004).

Chez les bactéries Gram négatives, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'un transporteur transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein). Chez les bactéries Gram positives, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe transmembranaire. Pour fonctionner, les transporteurs utilisent l'énergie fournie par la dissipation d'un gradient de protons (familles MFS (Major FacilitatorSuperfamily), SMR (Small MultidrugResistance) et RND (Resistance-

Nodulation cell Division)) ou d'ions sodium (famille MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion)) ou encore par l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC) (figure 2)

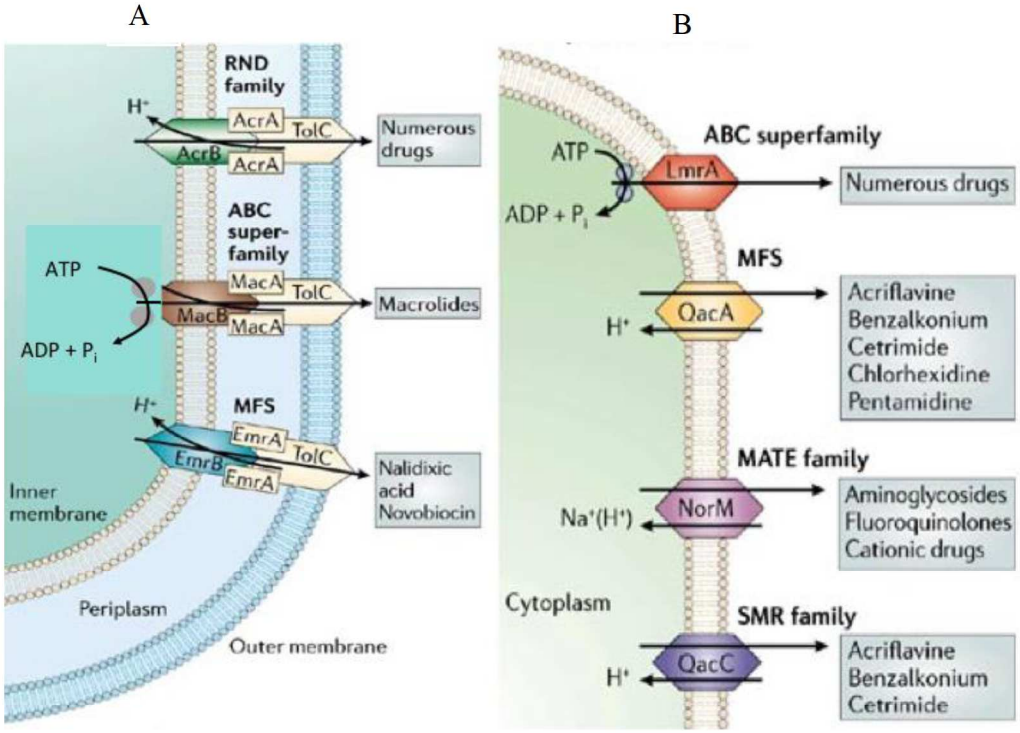


Figure 2. Illustration schématique des principales pompes bactériennes d'efflux chez les bactéries gram négatives (A) et Gram-positives (B) (Piddock, 2006).

Les **pompes d'efflux RND** forment une vaste famille de transporteurs ubiquitaires, avec au moins 7 sous-familles (Tseng*etal*., 1999) et sont essentiellement des antiports dépendantdu gradient de proton. Ils peuvent prendre en charge différents antibiotiques mais aussi des métaux lourds, des colorants, des détergents et des solvants. (Poole, 2004 ; Zgurskaya, 2002 ; Li &Nikaido, 2004). Le système d'efflux le plus étudié chez *E. coli* est le système AcrAB-TolC où le transporteur transmembranaire AcrB et la protéine périplasmiqueAcrA sont associés à la porine TolC (Thanassi*et al*., 1997 : Tsukagoshi&Aono, 2000). Cependant, TolC peut fonctionner avec d'autres transporteurs tels que AcrD associée à AcrA (Saier*et al*., 1994 : Aires &Nikaido, 2005), AcrEF (Kobayashi*et al*., 2001a), ou encore les transporteurs de type MFS (EmrAB, Borges-Walmsley*etal*., 2003) ou de la famille ABC (MacAB, Kobayashi*et al*., 2001b). Le sytème d'efflux TolC-dépendant permet aussi d'expulser des composés métaboliques intracellulaires tel l'enterobactine et la cystéine en excès (Bleuel*et al*., 2005 ; Wiriyathanawudhiwong *et al*., 2009).

Les **transporteurs MFS** sont des symports ou des antiports membranaires d'environ 400 résidus, utilisant la force proto-motrice (Saier et *al*.,1999). Les pompes MFS, effluant les

antibiotiques, forment des systèmes antiport antibiotique/H^+. Cette famille est divisée en deux sous-familles, l'une constituée de 12 segments transmembranaires et l'autre constituée de 14 segments transmembranaires. Le transporteur fonctionne généralement seul, mais il peut également s'associer à d'autres protéines de la membrane externe,

Les **transporteurs de la famille SMR** sont sous forme de tétramère qui utilise la force proto-motrice pour expulser les antibiotiques, les colorants et les cations (Paulsen*et al*., 1996) . Chez *Escherichia coli*, cette famille est représentée par la pompe EmrE (Bay& Turner, 2012).

Les **transporteurs MATE** adopte la même topologie que les transporteurs MFS (Brown *etal*., 1999). L'efflux est énergisé par un gradient de sodium et permet aux bactéries d'être résistantes aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones (Morita*et al*., 1998). Chez *E. coli*, MdtK serait un transporteur fonctionnant comme un antiport drogue/H+ (Long *et al*., 2008).

Les **transporteurs ABC**, essentiels au métabolisme bactérien, sont composés d'une partie transmembranaire et de deux sous-unités cytoplasmiques possédant une activité ATPasique (Van Veen&Konings, 1998). La majorité est chargée d'importer de nombreuses substances nécessaires à la bactérie, comme les sucres, les acides aminés, les ions métalliques et les protéines. Chez *E. coli*, MacAB constituent un transporteur de type ABC pour éliminer les macrolides en lien avec TolC (Tikhonova*et al*., 2007).

3. Déblocage des ribosomes : Trans-traduction et autres systèmes

a. Trans-traduction

Les ribosomes sont responsables de la synthèse des protéines pour traduire l'information portée par les ARN messagers (ARNm) et catalyser la formation d'une liaison peptidique entre les acides aminés. (Weiss*et al.*,2010). Le processus de traduction est réalisé grâce à de nombreux facteurs protéiques dépendants d'une activation par la guanosine triphosphate ou GTP (Nierhaus& Wilson 2004). Il peut se décomposer en trois étapes essentielles que sont le démarrage, l'allongement de la chaîne peptidique et la terminaison (Gillet &Felden., 2007). Afin d'éviter que la machinerie ribosomique ne se bloque, les cellules utilisent des systèmes de contrôle qualité pour vérifier le processus et éventuellement libérer les ribosomes bloqués. Les complexes non-stop de traduction (réactions de traduction où le ribosome a atteint l'extrémité 3 'de l'ARNm sans se terminer au niveau d'un codon d'arrêt) sont assez répandus chez les bactéries car les ARNm peuvent être tronqués ou endommagés par différents phénomènes : arrêt prématuré de la transcription, activité nucléasique ou cassures (Keiler, 2008 ; Keiler&Ramadoss,2011). Contrairement aux eucaryotes où la qualité des ARNm est

liée à la polyadénylation en 3', chez les bactéries, des ARNm tronqués peuvent être engagés dans un processus de traduction. Ito*et al*. (2011) estiment que 2 à 4% des traductions se bloquent, ainsi un ribosome serait en moyenne impliqué au moins 5 fois dans ce type de blocage au cours d'une division cellulaire.

Chez les bactéries, le mécanisme utilisé est la *trans*-traduction qui comprend un ARN hybride, ARN transfert-messager (ARNtm) codé par le gène *ssrA* et une petite protéine basique appelée protéine B ou SmpB (Karzai*et al*., 1999). L'ARNtm est une molécule chimérique qui comprend un domaine ARNt (TLD pour « tRNA-likedomain »), un anneau de pseudo-nœuds (PKs) et une partie messager (MLD pour « messenger-likedomain ») codant pour une étiquette reconnaissable par des protéases (ClpXP essentiellement) (revue de Giudice*et al*., 2014). Le domaine TLD présente un trinucléotide pouvant être amino-acylé par une alanine dans sa partie 3'. La trans-traduction (figure 3) débute lorsque le site A du ribosome contient un codon incomplet. Le site A est alors pris en charge par le complexe quaternaire constitué de l'ARNtm-alanine, de SmpB, le facteur d'élongation EF-Tu, et du GTP. Un transfert inhabituel, indépendant d'une reconnaissance codon-anticodon s'effectue pour le peptide lié à l'ARNt bloqué dans le site P vers l'alanine de l'ARNtm. Ensuite, la traduction reprend sur la partie ARNm de l'ARNtm jusqu'au codon « stop ». Enfin, le ribosome se dissocie et libère une protéine partielle étiquetée avec une dizaine de résidus (AANDENYALAA chez *E. coli).* L'ARNm endommagé est dégradé par des exonucléases (RNase R) (Revues Guidice*et al*., 2014 ; Guidice& Gillet, 2013 ; Gillet &Felden., 2007).

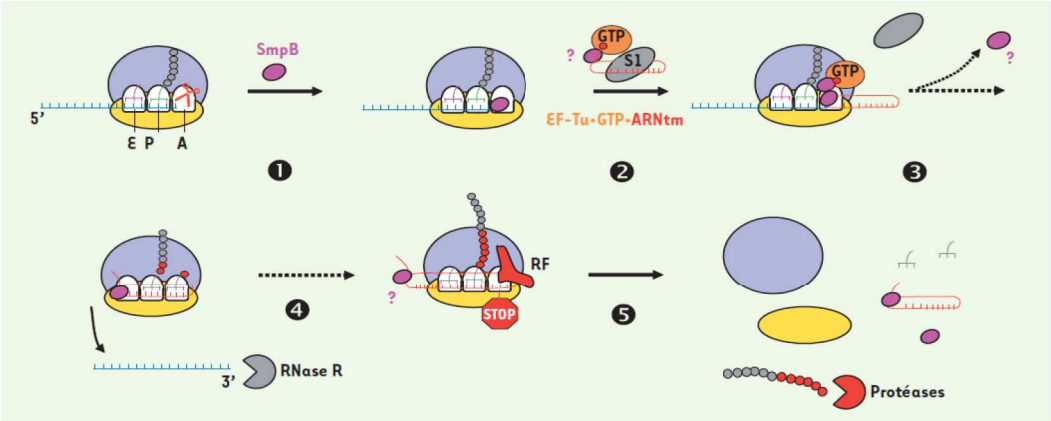


Figure 3. Représentation schématique de la trans-traduction(Gillet &Felden., 2007).

b. Les systèmes impliquant les protèinesArf (ArfA et ArfB)

Un système alternatif permettant de libérer les ribosomes bloqués implique la protéine **ArfA** (Chadani*et al*., 2010). Cette protéine se lie au site A vacant des ribosomes bloqués et recrute le facteur RF2 (Release Factor) pour hydrolyser les ARNt chargés qui restent insérés dans le ribosome au niveau du site P (Chadani*et al*., 2012).

Le système impliquant **ArfB** est équivalent : ArfB présente un domaine montrant des similitudes directes avec des facteurs de libération avec une fonction d'hydrolase des ARNt chargés dans le site P, et une queue C-terminale fonctionnant comme un senseur de l'occupation du canal d'entrée des ARNm pour distinguer les ribosomes bloqués ou non (Chadani*et al*., 2011 ; Gagnon *et al*., 2012).

Dans ces deux systèmes, le déblocage des ribosomes n'induit pas de dégradation ciblée du peptide tronqué, comme c'est le cas dans la *trans*-traduction.

c. Objectif de cette étude

Une des voies privilégiées pour développer de nouveaux antibiotiques consisterait à trouver des molécules qui inhiberaient la trans-traduction. Des travaux de Ramadoss*et al*. (2013a) rapportent un criblage haut-débit *in vitro*, basé sur l'absence d'étiquetage protéique et/ou de protéolyse des protéines étiquetées pour identifier de telles molécules. Un des composés les plus actifs, le KKL-35 a montré une activité inhibitrice importance : une concentration de 0,9µM inhibe 50% de l'étiquetage de la protéine DHFR à partir d'un ARNm sans codon stop suggérant que le KKL-35 inhibe la trans traduction.

L'objectif de notre étude est d'établir son spectre d'action sur un panel de souches d'*E. coli* comprenant des souches hospitalières uro-pathogènes. Et dans un deuxième temps d'approfondir son mécanisme d'action en nous intéressant à sa perméabilité, son efflux et la validation des cibles intracellulaires à l'aide de mutants.

Chapitre II

Matériel &Méthode

II. MATERIELS ET METHODES

1. *Souches bactériennes, bactériophage, molécules chimiques et conditions de culture*

a. Souches bactériennes.

Les souches bactériennes utilises dans cette étude appartiennent à l'espèce *Escherichia coli* : elles sont de référence, proviennent du laboratoire de bactériologie du CHU de Rennes (don de A.Gougeon, Université Rennes 1) ou sont des mutants construits dans le laboratoire (Tableau 1). Toutes les souches sont conservées à -80°C en milieu LB glycérolé (Glycérol 15% (v/v)). Pour leur croissance, les différentes souches ont été isolées sur gélose LB-Agaravec et sans antibiotiques, puis incubées à 30° pendent 24 heures, Les cultures en milieu liquide ont été réalisées en milieu LB sous agitation à 30°C (ou à 37°C ou 42°C pour les besoins de l'expérience).

b. Bactériophage.

Pour les transductions, le bactériophage P1 Cm*cts* a été utilisé, celui-ci est un phage thermosensible dérivé du phage P1 qui n'est pas capable de maintenir le lysogénie à 42 °C et porte la résistance au chloramphénicol (Silhavy*et al*., 1984).

Les stocks de lysat de phage P1 (10^9à10^{10} CFU/ml) obtenus à partir de la lyse de la souche MG1655ont été conservés à 4°C en présence de quelques gouttes de chloroforme.

c. Antibiotiques et molécules anti trans-traduction

La Polymyxine B (Sigma-Aldrich) a été dissoute dans de l'H2O à une concentration finale de 0,8mg/mL pour réaliser la solution stock qui a été conservée à -20°C.

Le KKL-35 ou 4-Chloro-N-[5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-benzamide (Sigma-Aldrich) a été dissout dans du DMSO (Dimethylsulfoxide) à une concentration finale de 10 mM et des fractions aliquotes ont été conservés à -80°C..

2. *Evaluation de l'effet des molécules anti-trans-traduction .*

L'effet du KKL-35 a été évalué par des suivis de croissance dans des puits de microplaque à l'aide d'un lecteur de densité optique (Power Wave XS, BIOTEK) en présence de différentes concentrations de KKL-35 à partir d'un inoculum provenant de cultures en phase exponentielle de croissance.

Tableau 1. Souches d'*Escherichia coli* utilisées dans cette étude.

N° Souche Laboratoire[1]	Origine (Nom original, autres informations)	Génotype[2]	ATB^{R}[3]	Référence
5282	NM522	*supE, thi, Δ(lac-proAB), hsd5 (r⁻, m⁻), [F', proAB, lacI^{q}ZΔM15]*	/	Gough& Murray, 1983
5490	CSH120, autre nom : BW6156	*Hfr P4X relA1 spoT1 metB1 zje-2005::Tn10*	TET	Wanner, 1986
5790	DH5α	*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*	NAL	Taylor *et al.*, 1993
5929	80305 40842, uropathogène	nc	/	CHU Rennes[4]
5930	80223 37943, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5931	80603 40929, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5932	80306 40901, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5933	80306 40900, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5934	80305 40565, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5935	80305 40703, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5936	80305 40852, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5937	80307 41178, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5938	80307 41214, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5939	80307 41181, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5940	80304 40366, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5941	80306 40894, uropathogène	nc	/	CHU Rennes
5987	MG1655, *E. coli* K12	F⁻, lambda⁻, *rph-1*	/	Blattner*et al.*, 1997
6018	W3110 *ssrA*	F⁻ lambda⁻ IN(*rrnD-rrnE*)1 *rph*-1 *ssrA*::*aphA3*	KAN	Komine*et al.*, 1994
6025	MG 1655 *ssrA* (transduction P1 / 6018)	F-, lambda-, *rph*-1 *ssrA*::*aphA3*	KAN	Ce Laboratoire
6089	JW2601-1	F-, *Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔsmpB776::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514*	KAN	Baba *et al.*, 2006
6095	JW3243-1	F-, *Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔarfA728::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514*	KAN	Baba *et al.*, 2007
6103	JW5503-1	F-, *Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ⁻, ΔtolC732::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514*	KAN	Baba *et al.*, 2008
6127	MG1655 *arfA* (transduction P1 / 6095)	F-, lambda-, *rph-1, arfA::aphA3*	KAN	Ce Laboratoire
6128	MG1655 *tolC* (transduction P1 / 6103)	F-, lambda-, *rph-1, tolC::aphA3*	KAN	Ce Laboratoire

(1) Les N° en italique sont présentés à titre indicatif, les noms des souches d'origine seront utilisés dans le rapport
(2) nc : non connu
(3) ATB^{R} : antibiorésistance : TET : Tétracycline ; NAL : acide nalidixique ; KAN : Kanamycine
(4) don de A. Gougeon, CHU Rennes, Université Rennes 1

a. Préparation des solutions bactériennes.

A partir d'une culture sur gélose LB-agar, une colonie est mise en pré-culture dans du bouillon LB, et incubée à 30°C sous agitation (150 rpm) toute la nuit. A partir de cette pré-culture,10 ml de milieu Muller Hinton (MH) ont été inoculés (1% (v/v)), incubés à 30C° sous agitation jusqu'à une densité optique à 600nm (DO_{600}) égale à 0,5, ce qui correspond à la phase logarithmique de croissance. Cette culture a été utilisée pour inoculer les 100µL de milieu à une DO_{600} initiale de 0,05.

b. Suivis de croissance.

Des dilutions de KKL35 ont été réalisées à partir de la solution stock de KKL-35 (10 mM) et ont ensuite été ajoutées dans les puits des microplaques à des concentrations finales de 0 à 100µM. Enfin les microplaques ont été insérées dans le lecteur de microplaque avec les paramètres suivants : incubation à 30C°, agitation par vibration avant chaque lecture de l'absorbance à 600nm et enregistrement des DO_{600} toutes les 30 minutes.

Etant donné que la solution stock de KKL-35 a été réalisée en DMSO, des témoins de croissance ont été réalisés en absence ou en présence de DMSO à des concentrations équivalentes à la solution stock de KKL.

A partir de ces croissances, les taux de croissance ont été calculés lors de la phase exponentielle et les pourcentages d'inhibition ont été calculés à partir des DO_{600nm} obtenues en point final (après 18h de culture). Le calcul est le suivant : 100 X (1- (DO600nm obtenue avec les différentes concentrations de KKL-35 / DO_{600nm} obtenue en absence de KKL-35).

3. *Evaluation de la sensibilité à la polymyxine.*

Les sensibilités des souches à la polymixine B des souches ont été évaluées par l'établissement de concentration minimale inhibitrice (CMI) en microplaque avec des cultures préparées comme précédemment. Les concentrations testées (de 0 à 8 µg/mL) ont été réalisées par des dilutions en série (1/2) à partir de la solution stock de polymyxine (0,8 mg/mL). Des lectures (Power Wave XS, BIOTEK) en point final des absorbances à 600nm ont été faites après une incubation à 30°C de 18h00 et ont permis de déterminer la CMI. Les concentrations minimales bactéricides (CMB) ont été établies en utilisant la méthode des stries sur géloses LB agar : des dépôts de 10 µL des puits où aucune croissance n'était visible ont été étalés en ligne et ont été comparés avec des dépôts de 10 µL des dilutions 10^{-1} à 10^{-4} des inocula.

4. *Transduction.*

La transduction permet le transfert d'ADN *via* des bactériophages. Dans cette étude, nous avons réalisé le transfert dans la souche *E.coli* MG1655 de délétions construites par Baba *et al.* (2006) chez la souche BW25113 (Datsenko&Wanner,2000) ou d'une autre construction réalisée par Komine*et al*. (1994). Ainsi, les 4 souches donneusesont été : 6018 (*ssrA*::*ahpA3*), 6089 (*smpB*:: *aphA3*), 6095 (*arfA*::*aphA3*), et 6103 (*tolC*::*aphA3*) et la souche receveuse était la souche MG1655.

a. Préparation des bactériophages P1 à partir des souches donneuses.

A partir d'unepréculturede chaque souche donneuse réalisée à 30°C, 10 ml de LB additionné deCacl2 (10 mM final),$MgSO_4$ (5 mM final), et de glucose (10 mM final) ont été inoculés et cultivés jusqu'à DO_{600} = 0,2 - 0,3.Ensuite, 50µL de phage P1 (préalablement obtenue par infection de la souche MG1655,6.10^9 UFC/ml) ont été ajoutés à la culture puis incubés 45 min à 43°C en agitation puis à 30°C jusqu'à la visualisation d'une lyse. Le mélange a été centrifugé (2000 g,10 min) et le surnageant a été filtré (45µm) et additionné de 200 µL de $CHCl_3$ puis stocké à 4°C.

b. Transduction et sélection des transductants

Parallèlement à la préparation des phage P1 à partir des souches donneuses, une culture de *E.coli* MG1655 (réceptrice) a été effectués à 30C° jusqu'à une DO_{600nm}= 0.8 additionné de $Cacl_2$ (10 mM final) et de $MgSo_4$ (5mM final). Ensuite, différents mélanges ont été réalisés : 500µL de le culture de la souches réceptrice (MG1655) ; et différents volumes (100, 50 et 10 µL) des phages P1 issus des souches donneuses. Un témoin a été également réalisé sans phage P1.Les mélanges ont été laissés à température ambiante pendant 30 min, et 1h30 à 37°C. Ensuite, ces mélanges ont été centrifugés (2000g 10min), lavés avec 1ml de LB, et étalés sur des géloses LB agar additionnées de kanamycine (50 µg/ml final). Après une incubation à 37°C, pendant 24h, les transductants ayant poussé sur les géloses LB-agar Kan ont été vérifiés par PCR après extraction des ADN génomiques

c. Vérification du transfert des délétions par amplification par PCR

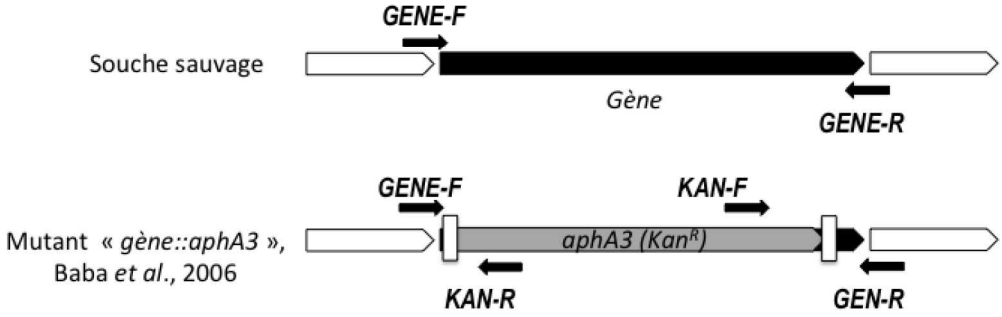
Extraction des ADN génomiques.

L'extraction des ADN génomiques de MG1655, des souches donneuses et des transductants sélectionnésa été réalisée selon la méthode de Chen &Kuo (1993) : 1,5 mLde culture a été centrifugé (10000 g, 3min).Le culot a été remis dans 300µL de solution de lyse (Tris-acétate

pH 7.8 40mM et sodium acétate 20mM et EDTA 1 mM). Ensuite, 30µL de SDS (10% (v/v)) ont été ajoutés et le mélange été incubé 5min à 80°C. Après refroidissement à température ambiante, 3µL de la solution de RNase A (4 mg/mL) ont été ajoutés et après une incubation à 37°C pendant 60 min, 110µL de NaCl 5M ont été ajoutés. Les lysats ont été centrifugés (10000 g, 10min, 4°C). L'ADN génomique contenu dans le surnageant a été récupéré par précipitation alcoolique (addition de 1ml d' Ethanol et centrifugation à 10000g pendant 20min à 4°C). Le culot d'ADN a été repris dans 50µL d'eau distillé stérile et la mesure la concentration a été réalisée par spectrophotomètre à 260 nm.

Réactions d'amplification

Pour vérifier que les transductions portaient les délétions, différentes réactions d'amplification par PCR ont été réalisées avec (1) des amorces situées en amont et en aval des gènes cibles et (2) des amorces situées soit en amont avec une amorce dans le début du gène *aphA3*, soit en aval avec une amorce dans le fin du gène*aphA3*comme le montre la figure 4.



Gènes cibles	Noms et séquences			
tolC	**TOLC-F**	TCGCGCTAAATACTGCTTCA	**TOLC-R**	GAAGAATGCGGCAGATAACC
arfA	**ARFA-F**	TACACTCGCGCCGTTAAATA	**ARRA-R**	CGTGATTTGCTGAAAGAGCA
smpB	**SMPB-F**	GGGGTGTTTTCGATTTCAGA	**SMPB-R**	CGGTGAGGAACTGGTCAATAA
ssrA	**SSRA-F**	TCATGGCGCTCATAAATCTG	**SSRA-R**	GCGGGCTCTTAGGACTTCAT
aphA3	**KAN-F**	CGTTGGCTACCCGTGATATT	**KAN-R**	CCAGTCATAGCCGAATAGCC

Figure 4. Représentation schématique des amplifications par PCR concernant soit les gènes cibles, soit les extrémités des délétions réalisées par insertion du gène *aphA3* codant la résistance à la Kanamycine par Baba *et al*. (2006).
Le tableau inclus dans cette figure donne les séquences de l'ensemble des oligonucléotides utilisés qui ont été déterminés avec le logiciel en ligne Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus).

Les amplifications par PCR qui ont été réalisées avec le mix Go-Taq Master Mix (Promega),qui contient l'ADN polymeraseGO Taq®, les dNTP et du MgCl2 (1,5 mM final).Le volume final de 50µL contenant 25µL du GO Taq® Green Master Mix(2x),1µL de chaque amorce (10 µM), 20,5 µL d'H_2O et 2,5 µL d'extrait d'ADN (20 ng/µL). Le programme d'amplification PCR était composé des étapes suivantes : dénaturation initiale de à 95°C durant 5 minutes, 35 cycles d'amplification (dénaturation 95C° pendant 45 secondes, hybridation à 50°C pendant 45 secondes, élongation à 72°C pendant 2 minutes). Le programme s'est terminé par une phase d'extension à 72°C pendant 7 minutes.La détection des fragments amplifiés a été effectuée par électrophorèse en gel d'agarose standard 1,5 % dans un champ éléctrique de 3V/cm pendant 3h en tampon TAE (Tris-Acétate pH 8,2, 40mM ;EDTA1mM). Après la migration, le gel a été mis à colorer dans une solution de bromure d'éthidium (BET) durant 10 minutes puis les fragments d'ADN ont été visualisés sous UV.

Chapitre III

Résultats et Discussion

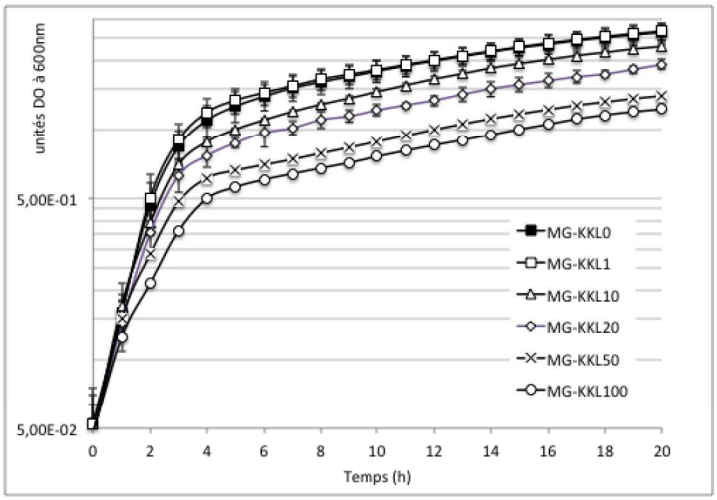


Figure 5. Effet du KKL-35 sur la croissance de MG1655.
Les croissances ont été réalisées en milieu MH à 30°C, 37°C et 42°C en absence de KKL-35 (MG-KKL0) ou en présence de différentes concentrations de KKL-35 (1 µM à 100µM ; MG-KKL1 à MG-KKL100). Cette représentation est issue de trois expériences indépendantes.

Tableau 2. Effet du KKL-35 sur les taux de croissance (µ).

	KKL-35 (µM)					
Températures	0	1	10	20	50	100
30°C	0,576 +/- 0,031	0,516 +/- 0,166	0,498 +/- 0,111	0,430 +/- 0,108	3,44 +/- 0,058	0,260 +/- 0,004
37°C	0,582 +/- 0,081	0,620 +/- 0,086	0,478 +/- 0,005	0,365 +/- 0,037	0,371 +/- 0,003	0,471 +/- 0,014
42°C	0,566 +/- 0,054	0,501 +/- 0,021	0,526 +/- 0,015	0,547 +/- 0,013	0,332 +/- 0,084	0,303 +/- 0,018

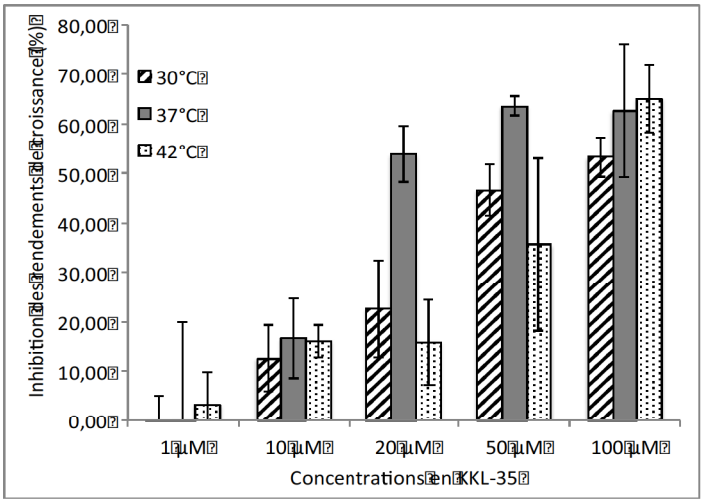


Figure 6. Pourcentages d'inhibition des rendements de croissance à différentes concentrations de KKL-35.
Les croissances ont été effectuées à différentes températures (30°C, 37°C et 42°C). Les valeurs obtenues pour chaque concentration ont été obtenues selon le calcul suivant : % inhibition = 100 X (1-(DO_{600nm}^{KKLn}/ DO_{600nm}^{KKL0}). DO_{600nm}^{KKLn} et DO_{600nm}^{KKL0}correspondent

aux valeurs d'absorbance obtenues après 18h d'incubation en absence de KKL-35 (KKL0) ou en présence d'une concentration donnée de KKL-35 (KKLn). Ainsi, un % d'inhibition de rendement égal à 100% signifie une absence de croissance et un % d'inhibition de rendement égal à 0% signifie aucune différence avec le témoin en absence de KKL-35.

Résultats et Discussion

1. Analyse de l'effet du KKL-35 sur les souches d'E. coli

a. Analyse sur la souche de référence MG1655 – Effet de la température.

Dans un premier temps, nous avons choisi de tester le KKL-35 sur la souche MG1655. Cette analyse a été effectuée par des suivis de croissance en milieu Muller Hinton (MH) à différentes températures, en absence et en présence de différentes concentrations de KKL-35 (1 à 100 µM).

Le KKL-35, en milieu MH, induit un arrêt de croissance lors de la phase de ralentissement et une quantité de biomasse produite moins importante à 30°C (figure 5), à 37°C et à 42°C (données non montrées).

Pour analyser l'effet du KKL-35, les taux de croissance (tableau 2) et les pourcentages d'inhibition (figure 6) ont été calculés. Il apparaît que les taux de croissance sont affectés par le KKL-35 à partir de 20 µM à 30°C et à partir de 50 µM à 37°C et 42°C. Le KKL-35 montre des inhibitions de croissance qui commencent à partir de 20 µM quelle que soit la température.

Nos résultats diffèrent de ceux de Ramadoss *et al*. (2013a) et cette différence pourrait être due aux milieux utilisés. En effet, ces auteurs ont réalisé leurs essais selon les recommandations du « National Committee for Clinical Laboratory Standards » (Wayne, Pennsylvanie) en milieu RPMI1640 qui est un milieu synthétique bien défini contenant des vitamines, l'ensemble des acides aminés et du glucose. Dans nos essais, le milieu utilisé a été le milieu dit empirique de Muller Hinton (infusion de viande, peptone de caséine, amidon de maïs) qui est généralement employé pour analyser l'action des antibiotiques. Il est vraisemblable que ces éléments du MH peuvent altérer l'effet inhibiteur de croissance du KKL-35. D'autre part, nous pouvons également soupçonner une dégradation du KKL-35 par la température, c'est pourquoi les tests d'inhibition réalisés par la suite ont été effectués à 30°C.

b. Analyse de l'effet du KKL-35 sur une collection de souches.

L'analyse de l'effet inhibiteur du KKL-35 sur la croissance de souches de références (MG1655, CSH120, NM522, DH5A) et des souches uro-pathogènes issues de la collection du CHU de Rennes (5929 à 5941) a été réalisée par des suivis de croissance de l'ensemble de ces souches en milieu MH à 30°C. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3. Effet du KKL-35 sur les taux de croissance (μ) et des taux d'inhibition pour des souches de référence et uropathogènes.

Souches	μ (h^{-1})			Inhibition des rendements de croissance (%)*	
	Témoin	KKL-35 10 μM	KKL-35 50 μM	KKL-35 10 μM	KKL-35 50 μM
MG1655	0,576 +/- 0,031	0,498 +/-0,111	0,344 +/- 0,058	11,09 +/- 6,11	41,01 +/- 4,80
CSH120	0,512 +/- 0,100	0,521 +/- 0,085	0,441 +/- 0,031	7,90 +/- 2,60	23,94 +/- 18,75
NM522	0,427 +/- 0,007	0,451 +/- 0,028	0,431 +/- 0,14	25,26 +/- 15,27	50,17 +/- 0,24
DH5α	0,463 +/- 0,054	0,423 +/- 0,004	0,286 +/- 0,014	15,57 +/- 15,88	42,91 +/- 2,82
5929	0,959 +/- 0,006	0,990 +/- 0,003	0,689 +/- 0,004	4,47 +/- 32,83	52,06 +/- 0,68
5930	0,954+/-0,012	0,945+/- 0,009	0,423 +/- 0,011	0,80 +/- 29,25	48,76 +/- 9,89
5931	0,895 +/- 0,033	0,908 +/- 0,011	0,380 +/- 0,014	0,08 +/- 32,04	55,50 +/- 2,79
5932	0,753 +/- 0,017	0,616 +/- 0,006	0,547 +/- 0,015	2,08 +/- 23,86	43,00 +/- 1,63
5933	0,789 +/- 0,006	0,692 +/- 0,002	0,484 +/- 0,018	2,00+/- 24,09	39,71 +/- 0,13
5934	0,769 +/- 0,008	0,659 +/- 0,12	0,419 +/- 0,01	27,47 +/- 15,91	37,52 +/- 0,34
5935	0,924 +/- 0,007	0,667 +/- 0,016	0,414 +/- 0,005	31,8 +/- 12,87	53,28 +/- 5,85
5936	1,002 +/- 0,004	0,878 +/- 0,006	0,484 +/- 0,034	29,26 +/- 8,83	44,49 +/- 0,49
5937	1,120 +/- 0,012	0,757 +/- 0,020	0,470 +/- 0,05	31,80 +/- 12,87	53,26 +/- 5,85
5938	0,890 +/- 0,004	0,620 +/- 0,014	0,492 +/- 0,078	20,44 +/- 20,72	55,78 +/- 6,28
5939	0,948 +/- 0,019	0,785 +/- 0,017	0,666 +/- 0,013	21,25 +/- 17,12	50,78 +/- 2,53
5940	0,913 +/- 0,006	0,726 +/- 0,079	0,654 +/- 0,016	15,60 +/- 20,17	49,04 +/- 3,36
5941	0,682 +/- 0,137	0,585 +/- 0,005	0,357 +/- 0,025	51,59 +/- 29,20	39,21 +/- 1,87

* Les pourcentages rendements de croissance ont été calculés de la façon suivante : % i= 100 X (1-(DO_{600nm}^{KKLn} / DO_{600nm}^{KKL0}). DO_{600nm}^{KKLn} et DO_{600nm}^{KKL0}correspondent aux valeurs d'absorbance obtenues après 18h d'incubation en absence de KKL-35 (KKL0) ou en présence d'une concentration donnée de KKL-35 (KKLn). Un rendement égal à 100% signifie une absence de croissance et un rendement égal à 0% signifie aucune différence avec le témoin de croissance en absence de KKL-35.

Les taux de croissance obtenus (tableau 3) montrent quelques variations de 0,463 h^{-1} à 1,12 h^{-1}, et de manière globale, les souches uro-pathogènes se divisent plus rapidement que les souches de références dans nos conditions expérimentales. Le KKL-35 provoque des diminutions des taux de croissance pour toutes les souches : léger effet dès la concentration

10 µM et plus importante à la concentration 50 µM. D'autre part, le KKL-35, bien qu'ayant un effet léger sur les taux de croissance montrent surtout un effet inhibiteur de la croissance totale avec des pourcentages d'inhibition compris entre 44,2 et 76 % selon les souches. L'inhibition du taux de croissance a été déterminée à partir de l'absorbance et peut donc n'être qu'apparente, il faudra la confirmer à partir du dénombrement des bactéries cultivables.

c. Analyse de l'effet du KKL-35 en présence de polymixine.

L'effet inhibiteur du KKL-35 a été analysé en présence de polymyxine sur l'ensemble des souches (références et uro-pathogènes). Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé les concentrations minimales inhibitrices de polymyxine pour les différentes souches, celles-ci sont présentées dans le tableau 4. Les CMI de polymyxine sont comprises entre 2 et 8 µ/mL et les CMB sont égales aux CMI montrant que la polymyxine a un effet bactéricide.

Tableau 4. Concentrations minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) pour des souches de référence et uro-pathogènes.

Souches	CMI (µ/mL)	CMB (µ/mL)
MG1655	2	2
CSH120	2	2
NM522	2	2
DH5a	2	2
5929	2	2
5930	4	4
5931	4	4
5932	2	2
5933	2	2
5934	2	2
5935	4	4
5936	2	2
5937	4	2
5938	2	2
5939	2	2
5940	4	4
5941	4	4

Pour tester le KKL-35, nous nous sommes placés à une concentration de polymyxine égale à 0,5 µg / mL, concentration où les croissances des différentes souches étaient peu affectées comme le montre le tableau R4 pour les données collectées en absence de KKL-35.

L'utilisation de la polymixine B en mélange avec KKL35 augmente la sensibilité des souches testées (Tableau 5). Nous avons observé que pour l'ensemble des souches testées, la molécule

KKL-35 à une concentration de 10 µM diminue les taux de croissance, et pour certaines souches, abolit la croissance (taux de croissance égal à 0). Lorsque la concentration du KKL-35 est augmentée à 50 µM, la grande majorité des souches est complètement inhibée. Seules les souches 5929, 5931 et 5932 ont montré un taux de croissance diminué.

Souches	Taux de croissance (µ (h-1)) en présence de Polymyxine (0,5 µg/mL)*		
	Control (KKL-35 0 µM)	KKL-35 10 µM	KKL-35 50 µM
MG1655	0,538 +/- 0,047	0,514 +/- 0,456	**0,004 +/- 0,007**
CSH120	0,432 +/- 0,026	0,220 +/- 0,556	**0,004 +/- 0,055**
NM522	0,445 +/- 0,062	**0,000 +/- 0,000**	**0,000 +/- 0,000**
DH5 alpha	non fait	non fait	non fait
5929	0,885 +/- 0,022	0,928 +/- 0,028	0,319 +/- 0,098
5930	0,817 +/- 0,058	0,292 +/- 0,164	**0,007 +/- 0,010**
5931	0,832 +/- 0,040	0,711 +/- 0,157	0,124 +/- 0,176
5932	0,875 +/- 0,002	0,895 +/- 0,07	0,153 +/- 0,144
5933	0,888 +/- 0,040	0,927 +/- 0,011	**0,000 +/- 0,000**
5934	non fait	non fait	non fait
5935	0,844 +/-0,007	**0,000 +/- 0,000**	**0,000 +/- 0,000**
5936	0,864 +/- 0,081	**0,000 +/- 0,000**	**0,007 +/- 0,010**
5937	0,810 +/- 0,185	**0,058 +/- 0,082**	**0,006 +/- 0,009**
5938	0,609 +/- 0,039	**0,000 +/- 0,000**	**0,007 +/- 0,010**
5939	0,949 +/- 0,008	**0,000 +/- 0,000**	**0,000 +/- 0,000**
5940	0,769 +/- 0,018	**0,014 +/- 0,020**	**0,000 +/- 0,000**
5941	0,662 +/- 0,035	**0,007 +/- 0,010**	**0,000 +/- 0,000**

* : les valeurs en gras soulignent une absence de croissance.

Ces résultats peuvent s'expliquer par l'augmentation de perméabilité de la paroiau KKL-35 par l'action de la polymyxine B. Les polymyxines interagissent avec les lipo-poly-saccharides (LPS) de la membrane externe des bactéries Gram-négatives par déplacement des ions Mg2+ et Ca2+ et entrainent une perturbation de la perméabilité de celles-ci (Vaara, 1992). L'action fatale des polymyxines est la conséquence des dommages de la membrane cytoplasmique (Tsubery*et al*., 2000). Ainsi, dans notre étude, la perméabilité membranaire du KKL-35 est augmentée pour toutes les souches en présence de polymyxine. La synergie KKL-35 et polymyxine ne s'applique pas trois des souches testées (5929, 5931 et 5932).Pour expliquer ces différences nous faisons l'hypothèse que la polymyxine déstabiliserait moins la membrane externe de par la nature des LPS de ces trois souches malgré le fait que ces souches présentent des CMI de polymyxine équivalentes aux autres souches testées. Pour valider cette hypothèse, nous pourrions déterminer le profil saccharidique des LPS par la technique de Hitchcock *et al*. (1983) et nous pourrions également évaluer la perméabilité des cellules bactériennes en

utilisant le 1-N-phenylnaphthylamine qui est une petite molécule hydrophobique qui fluoresce fortement dans un environnement hydrophobe (Hancock *et al*., 1991).

2. Analyse de l'effet du KKL-35 sur des mutants de la trans-traduction et de pompe d'efflux

a. Construction de mutants isogèniques de MG1655

Au laboratoire, nous possédons des mutants de la collection KEIO (Baba *et al*., 2006) issus de la souche BW25113 qui présente un contexte génétique différent de la souche MG1655. Elles dérivent bien de *E. coli* K12, mais la BW25113 a subi plusieurs modifications. Parmi les mutants, nous avions à notre disposition les souches 6018 (W3110Δ*ssrA*::kan), 6089 (BW25113Δ*smpB*::kan), 6095 (BW25113Δ*arfA*::kan) et 6103 (BW25113Δ*tolC*::kan). Nous avons décidé de construire les mutants isogéniques de MG1655 par transduction avec le phage P1. Nous avons obtenus des transductants pour les délétions des gènes ssrA,*arfA* et tolC. Ceux-ci ont été vérifiés par différentes amplifications par PCR. La figure 7 représente la vérification d'un transductantMG1655Δ*tolC*::kan(souche 6128) Les données pour les autres gènes ne sont pas montrées.

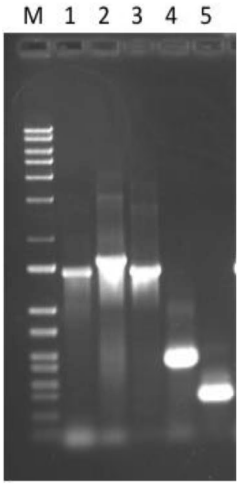


Figure 7. Vérification de la souche 6128 (MG1655Δ*tolC*::kan).
M : 1 kb Ladder (New EnglandBiolabs), 1 : amplification réalisée avec les amorces TOLC-F et –R sur l'ADN de la souche 6103 (BW25113Δ*tolC*::kan), 2 :amplification réalisée avec les amorces TOLC-F et –R sur l'ADN de la souche MG1655, 3:amplification réalisée avec les amorces TOLC-F et –R sur l'ADN de la souche 6128 (MG1655Δ*tolC*::kan), 4 :amplification réalisée avec les amorces TOLC-F et KAN-R sur l'ADN de la souche 6128, 5 :amplification réalisée avec les amorces TOLC-R et –KAN -F sur l'ADN de la souche 6128.

Pour l'ensemble des transductants et des souches donneuses, l'insertion du gène *aphA3* générait un produit d'amplification d'environ 1,45 kb avec les amorces GENE-F et GENE-R (puits 1 et 3, figure 7). Dans le cas de la souche MG1655, l'amplification avec les mêmes amorces correspondait à la taille du gène : 1,59 kb pour le gène *tolC*(puits 2, figure 7) ; 457 pb

pour *ssrA* ; 286 pb pour *arfA* ; 559 pb pour *smpB*. Ensuite, deux autres amplifications ont été réalisées pour vérifier la bonne insertion du gène *aphA3* (kan^R). Comme le montre la figure 3R, où les amplifications avec les amorces TOLC-F et KAN-R d'une part ou avec les amorces KAN-F et TOLC-R d'autre part (puits 4 et 5 de la figure 7) ont généré des fragments de 0,7 kb et de 0,4 kb respectivement pour la vérification de l'insertion de *aphA3* dans le gène *tolC* de la souche receveuse MG1655.

Les transductants qui ont été obtenus sont 6025 (MG1655 Δ*ssrA*::kan), 6127 (MG1655 Δ*arfA*::kan) et 6128 (MG1655 Δ*tolC*::kan). Nous n'avons pas pu obtenir les transductants pour la délétion Δ*smpB*::kan dans la souche MG1655.

b. Effet du KKL-35 sur les souches 6103 et 6128 mutantes dans laporine TolC.

L'effet du KKL-35 a été évalué sur des croissances des 2 souches 6013 (mutant *tolC* isogènique de BW25113) et 6128 (mutant *tolC* isogènique de MG1655) en absence et en présence de différentes concentrations de KKL-35. La figure 8 présente les courbes de croissances obtenues pour ces deux souches. Pour la souche 6103, aucune croissance n'a été observée lorsque du KKL-35 était présent : en effet, l'inhibition de croissance a été totale dès la concentration de 10 µM. Par contre, dans le cas de la souche 6128, nous n'avons pas observé d'inhibition totale de ce mutant *tolC*.

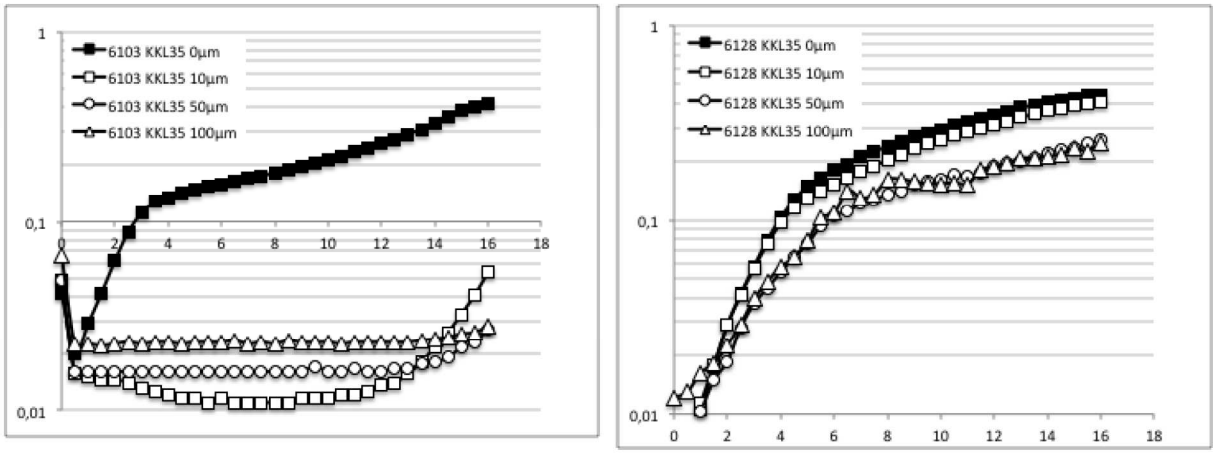


Figure 8. Courbes de croissance des souches 6103 et 6128 avec différentes concentrations de KKL-35.

Le graphe de gauche présente les croissances de la souche 6103 en absence (KKL35 0µM, carrés noirs) et en présence de différentes concentrations de KKL-35 (10 à 100 µM, marqueurs blancs). Le graphe de droite présente les croissances de la souche 6128 dans les mêmes conditions. Les croissances de la souche 6103 et 6128 ont été réalisées dans des expériences indépendantes et écartées dans le temps (1 mois).

L'absence de la protéine TolC chez *Escherichia coli*, présentent une hypersensibilité à une de nombreuses molécules (sels biliaires, détergents, antibiotiques…, Whitney (1971)). Nous pouvons donc supposer que le KKL-35 peut passer la membrane externe et probablement s'accumuler dans le périplasme et dans la cellule bactérienne et agir au niveau de la *trans*-traduction.

La différence de sensibilité des souches 6103 et 6128 pourrait être expliquée par une différence de perméabilité entre les deux mutants qui ont des contextes génétiques différents. Des expériences de stabilité du KKL-35 devront être menées et des suivis de croissance en présence de KKL devront être à nouveau réalisés.

c. *Effet du KKL-35 sur les mutants de trans-traduction (ssrA et smpB) et un mutant d'un facteur de sauvetage des ribosomes (arfA).*

L'activité du KKL-35 a été évaluée sur les croissances des 3 souches 6025(MG1655 Δ*ssrA*::kan), 6089 (BW25113 Δ*smpB*::kan) et 6095 (BW25113 Δ*arfA*::kan) en absence et en présence de différentes concentrations de KKL-35. Les taux de croissance sont présentés dans le tableau 6, et les pourcentages d'inhibition calculés sont montrés dans la figure 9.

Tableau 6. Effet du KKL-35 sur les taux de croissance des mutants *ssrA*, *smpB* et *arfA*.

Souches	μ (h^{-1})			
	Témoin	KKL-35 10 μM	KKL-35 50 μM	KKL-35 100 μM
MG1655	0,602 +/- 0,087	0,477 +/- 0,073	0,424 +/- 0,045	0,377 +/- 0,018
6025 MG1655 Δ*ssrA*::kan	0,526 +/- 0,084	0,406 +/- 0,12	0,353 +/- 0,03	0,313 +/- 0,23
6089 BW25113 Δ*smpB*::kan	0,560 +/- 0,109	0,416 +/- 0,135	0,403 +/- 0,031	0,278 +/- 0,035
6095 BW25113 Δ*arfA*::kan	0,584 +/- 0,060	0,507 +/- 0,032	0,422 +/- 0,33	0,336 +/- 0,026

Pour toutes les souches, le KKL-35 provoque des diminutions des taux de croissance dès la concentration 10μM. Dans le cas des mutants de la *trans*-traduction (6025 ou 6089), une concentration de 100μM de KKL-35 réduit les taux de croissance : 0,313 h^{-1} pour la souche

6025 et 0,278 h^{-1} pour la souche 6089. Des réductions semblables sont observées pour le mutant *arfA* et la souche MG1655.

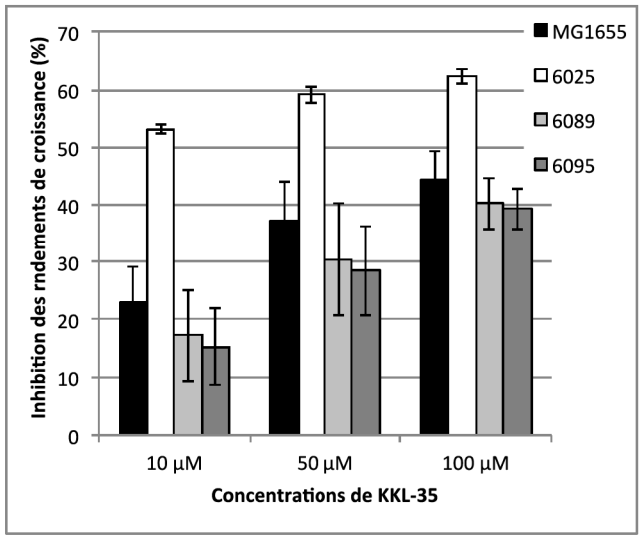


Figure 9. Inhibitions des rendements de croissance pour les souches MG1655, 6025, 6089 et 6095 par différentes concentrations de KKL-35.

Les inhibitions des rendements de croissance ont été calculés de la façon suivante : % inhibition = 100 X (1-(DO_{600nm}^{KKLn} / DO_{600nm}^{KKL0}). DO_{600nm}^{KKLn} et DO_{600nm}^{KKL0}correspondent aux valeurs d'absorbance obtenues après 18h d'incubation en absence de KKL-35 (KKL0) ou en présence d'une concentration donnée de KKL-35 (KKLn). Un % d'inhibition de rendement égal à 100% signifie une absence de croissance et un % d'inhibition de rendement égal à 0% signifie aucune différence avec le témoin en absence de KKL-35.

Le mutant *ssrA* (souche 6025) est plus affecté par le KKL-35, en effet, le pourcentage d'inhibition de la croissance totale est d'environ 60 % pour des concentrations de 50 et 100µM, alors que pour les trois autres souches (MG1655, 6089 et 6095) ces pourcentages sont aux alentours de 40 %. Les comportements vis à vis du KKL-35 du simple mutant *smpB* est similaire à celui de la souche MG1655 et concorde avec les résultats de Ramadoss *et al.* (2013a)qui expliquent que chez *E. coli*, lorsque la trans-traduction est inefficace, le système ArfA prend le relai (Chadani *et al.*, 2010 ; Ramadoss *et al.*, 2013b). En ce qui concerne le mutant *arfA*, nos résultats diffèrent de ceux de Ramadoss *et al.* (2013a) qui ont montré que chez *Shigella dysenteriae* qui ne possède de système ArfA, l'addition du KKL-35 entraine la mort des bactéries et qu'une souche de *S. dysenteriae* porteuse d'un plasmide exprimant la protéine ArfA d'*E. coli* devenait insensible au KKL-35.

Nos résultats sont surprenants dans le sens où l'absence d'un seul des deux acteurs de la *trans*-traduction, l'ARNtm, augmente la sensibilité au KKL-35, alors que l'absence de SmpB n'induit pas un phénotype différent de la souche MG1655.

Ramadoos *et al.* (2013a), ont montré, *in vitro*, que le KKL-35 bloque l'étiquetage codé par la partie ARNm de l'ARNtm. Ainsi, l'absence de l'ARNtm entrainerait une accumulation de

complexes non-stop de traduction et les ribosomes bloqués pourraient être sauvés par les facteurs ArfA(ou ArfB) dont la concentration intracellulaire augmente en absence de *trans*-traduction (Garza-Sánchez *et al*., 2011 ; Schaub *et al*., 2012).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer nos résultats. Un des premiers points concerne nos conditions expérimentales de culture (microaérophilie et stress associé) qui peuvent avoir induit de nombreux complexes non-stop de traduction (réactions de traduction où le ribosome a atteint l'extrémité 3 'de l'ARNm sans se terminer au niveau d'un codon d'arrêt) qui seraient résolus en absence de KKL-35. Cette augmentation du taux de complexes non-stop pourrait engendrer un dépassement des mécanismes de sauvetage des ribosomes incluant le système de *trans*-traduction et le système ArfA. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait déterminer les proportions de ribosomes bloqués en analysant par exemple les taux de protéines portant l'étiquetage de l'ARNtm normal ou une étiquette histidine (non dégradable) amenée par un ARNtm-His (modifié dans la partie messager)dans nos conditions expérimentales.

Dans le cas du mutant *ssrA* qui montre undéfaut de rendement de croissance en présence de KKL-35, l'absence du tmRNA entrainerait peut être une interaction de SmpB avec les ribosomes via le KKL-35 formant des structures non résolvables et ainsi augmenterait le nombre de ribosomes bloqués non récupérables ou qui dépasserait les capacités du système médiépar les facteurs Arf. Dans ce cas, l'effet du KKL-35 sur un double mutant *ssrA-smpB* redonnerait un phénotype équivalent à celui de la souche sauvage.

Nous pouvons également envisager que le KKL-35, bien qu'il ait été montré comme inhibant la *trans*-traduction, ou plus exactement l'étiquetage des peptides tronqués avec une efficacité par Ramadoss *et al*. (2013a), ait une activité plus complexe en agissant sur les capacités traductionnelles de la bactérie.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Cette étude a permis de tester l'effet d'une nouvelle molécule, le KKL-35 sur la croissance de souches de références uro-pathogènes d'*E. coli*. Toutes les souches se sont avérées sensibles au KKL-35 en milieu MH avec une inhibition de 50% du taux de croissance en présence de 50µM de KKL-35. Néanmoins, nous avons remarqué que son efficacité était plus faible que dans les travaux de Ramadoss *et al*. (2013a). Nous avons alors supposé que la molécule pénétrait en faible concentration dans la cellule à cause de la structure de la membrane externe ou ressortait par l'action de pompes d'efflux. La polymyxineB (agissant sur la membrane externe) utilisée à une dose sub-inhibitricea augmenté la sensibilité en diminuantles taux de croissance pour toutes les souches testées, et pour certaines souches a directement abolit la croissance pour une concentration faible en KKL-35.

La sensibilité au KKL-35 a été testée chez le mutant *tolC,* gène codant pour uncomposant de la membrane externe commun à plusieurs pompes d'efflux(AcrA-B, MacA-B, ErmA-B...). Une inhibition complète de la croissance de la souche a été obtenue. Le mutant *tolC*est incapable de croitre en présence de KKL-35 à 10µM. La pompe primaire (Acr , Mac, Erm) impliquée dans l'efflux du KKL-35 pourra être identifiée à l'aide des mutants correspondants. D'autre, il est également envisageable d'utiliser des inhibiteurs de pompes d'efflux plus spécifiques (Mahamoud *et al*., 2007).

Nos travaux font suite à ceux de Ramadoss *et al*. (2013a, 2013b) qui ont montré que le KKL-35 bloque la *trans*-traduction et empêche la fonction d'étiquetage (tag de dégradation codé par la partie messager de l'ARNtm) sur une protéine fluorescente (mCherry) codée par un ARNm sans codon stop. Ainsi, nous nous attendions à ne pas avoir d'effet du KKL-35 chez les mutants du système de *trans*-traduction *ssrA* et *smpB*. Or le mutant smpB s'est montré aussi sensible que la souche sauvage, et le mutant *ssrA* est plus sensible. Le mutant *arfA* est aussi résistant que la souche sauvage alors qu'une augmentation de l'efficacité du KKL-35 était attendue. Il apparaît que l'action du KKL-35 serait donc plus complexe. Les travaux de Ramadoss *et al*. (2013a) mettent en évidence un rôle du KKL-35 dans la traduction et leurs résultats apportent la preuve que le KKL-35 cible bien la trans-traduction chez *Shigella dysenteriae*. En effet, ces auteurs ont montré effet délétère du KKL-35 chez *S. dysenteriae*qui ne possède que la trans-traduction comme système de récupération des ribosomes, effet qui est annulé lors de l'expression chez cette bactérie de la protéine ArfA d'*E.coli*. Plusieurs questions se posent : est-ce que le KKL-35 interagit avec les ribosomes et empêchent les phénomènes de sauvetage ? Est-ce que le KKL-35 interagit avec SmpB et cette interaction

pourrait être néfaste pour la cellule, ce qui pourrait expliquer l'effet plus important du KKL-35 sur le mutant *ssrA*. Pour répondre à ces questions il est envisagé de construire des doubles mutants *ssrA-smpB,*ce qui permettrait de valider ou non l'hypothèse d'une interaction délétère avec SmpB. La validation de l'action du KKL-35 sur la *trans*-traduction pourrait être menée sur une souche porteuse d'un ARNtm modifié dans son étiquetage : c'est à dire en remplaçant l'étiquette de l'ARNtm par des résidus histidine. Il serait alors possible de d'évaluer l'effet du KKL-35 par le dosage de peptides avec une étiquette histidine. Pour évaluer une activité potentiellement plus élargie du KKL-35 sur les ribosomes et sur la fonctionnalité de la machinerie traductionelle, des expériences permettant de mesurer la fidélité (dosage d'une enzyme portant un codon stop dans la partie 5' de la séquence codante), l'initiation (incorporation de F-Met) et l'élongation en présence de KKL-35 pourraient être envisagées.

Il est également possible que le KKL-35 puisse se lier avec une autre protéine telle que la protéine ribosomale S1 qui est importante dans la traduction et dans la trans-traduction comme cela a été montré pour la pyrazinamide, molécule anti-tuberculeuse (Personne & Parish, 2014). Chez *Mycobacterium tuberculosis*, la pyranzinamide est convertie en acide pyrazinoique, forme active qui inhibe la trans- traduction. Le fait que des mutants *smpB* et *ssrA* n'aient pas eu leur sensibilité à la pyrazinamide affectée (Personne & Parish, 2014) et que l'acide pirazinoi que se lie à la protéine S1 (Shi *et al*., 2011) expliquerait que l'inhibition de la *trans*-traduction par la pyrazinamide. La recherche de protéines se liant au KKL-35 par chromatographie d'affinité permettrait de déterminer la cible. De plus, si la cible du KKL-35 est la protéine S1, une surexpression de cette protéine devrait lever la sensibilité au KKL-35 des souches sauvages et des mutants *smpB* et *ssrA*.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Aires, J.R.,&Nikaido, H.(2005). Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol***187**, 1923-1929.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai,Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *MolSystBiol***2**,1-11

Babic, M., Hujer, A.M., &Bonomo, R.A. (2006). What's new in antibiotic resistance. Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat***9**, 142-156.

Bay, DC., & Turner, R.J. (2012). Small Multidrug Resistance Protein EmrE Reduces Host pH and Osmotic Tolerance to Metabolic Quaternary CationOsmoprotectants.*J Bacteriol***194** ,5941-5948.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burl&, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.*Science* **277**,1453-1474.

Bleuel ,C., Große, C., Taudte, N., Scherer, J., &Wesenberg, D.(2005). TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **187,6701–6707.**

Borges-Walmsley ,M.I., Beauchamp, J., Kelly ,S.M., Jumel, K., C&lish, D., Harding, S.E., Price, N.C., &Walmsley, A.R.(2003). Identification of oligomerization and drug-binding domains of the membrane fusion protein EmrA.*BiolChem***278** ,12903-12912.

Brown, M.H., Paulsen, I.T., &Skurray, R.A. (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology***31**, 394-395.

Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., Abo, T. 2012. ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *MolMicrobiol*.**86** , 37-50.

Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K., & Abo T. (2011). *Escherichia coli*YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways. *MolMicrobiol*. **80** , 772-785.

Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., & Abo, T. (2010). Ribosome rescue by *Escherichia coli*ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system.*MolMicrobiol*. **78** , 796-808.

Chen W. P. &Kuo T. T. (1993).A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Res. **21**, 2260.

Gagnon, M.G., Seetharaman, S.V., Bulkley, D., &Steitz, T.A.(2012). Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome. *Science*. **335** , 1370-1372.

Garza-Sánchez, F., Schaub, R.E., Janssen, BD., &Hayes,C.S.(2011). tmRNA regulates synthesis of the ArfA ribosome rescue factor. *Mol Microbiol***80(5),**1204–1219.

Gillet, R., &Felden, B.(2007). Lost in translation. Le déblocage des ribosomes bactériens par le mécanisme de trans-traduction. *Médecine /Sciences* ,**23** , 633-9

Giudice, E., &Gillet, R. (2013). The task force that rescues stalled ribosomes in bacteria. Trends *in Biochemical Sciences*, **38**,403-411.

Giudice, E., Macé, K., &Gillet, R.(2014). Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB. *Front Microbiol*.**5**, 113.

Gough, J.A., & Murray, N.E. (1983). Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J MolBiol,***166** , 1-19.

Hakenbeck, R., &Coyette, J. (1998). Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci***54**, 332-340.

Hancock, R.E., Farmer, S.W., Li, Z. S., Poole, K. (1991). Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide andOmpFporin of *Escherichia coli.Antimicrob. Agents Chemother*. **35** , 1309-1314.

Hitchcock, P.J., & Brown, T.M. (1983). Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol*. **154** , 269-277.

Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y. & Abo, T. (2011).Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in Escherichia coli. *PLoS One***6**, e28413.

Karzai, A.W., Susskind, M.M., Sauer, R.T. 1999. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA).*EMBO*; **18**,3793–3799.

Keiler, K.C., (2008). Biology of trans-translation.*Annu Rev Microbiol*, **62**, 133–151

Keiler, K.C. &Ramadoss N.S. (2011).Bifunctional transfer-messenger RNA, *Biochimie.***93,** 1993-1997.

Kobayashi, K., Tsukagoshi. N., &Aono, R. (2001a). Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coliacrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the acrEF operon with the IS1 or IS2 element. *J.Bacteriol***183** ,2646-2653.

Kobayashi, N., Nishino, K., & Yamaguchi, A.(2001b). "Novcl macrolidc-spccific ABC-typc efflux transporter in *Escherichiacoli*. *J Bacteriol***183** : 5639-5644.

Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K., &Inokuchi, H.(1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichiacoli*. *ProcNatlAcadSci* U S A. **91** , 9223-9227.

Levy, S.B. & Marshall B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine***10**, S122 - S129.

Li, X.Z., &Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs***64**, 159-204.

Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W.M., & Yu, E.W. (2008). Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from Neisseria gonorrhoeae and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **52**, 3052-3060.

Lozniewski, A., &Rabaud, C. (2010). Resistance aux antibiotiques. *CCLIN Sud-Est* 1-4

Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W.V. &Pagès, J.M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J AntimicrobChemother*. **59 ,**1223-1229. Epub 2007 Jan 17.

Marat, M., Yusupov, Gulnara, Z.h., Yusupova,A. B., Lieberman, K., Thomas, N., Earnest, J.H.D., Harry, C.,&Noller, F.(2001).Crystal structure of the ribosome at 5.5 A° Resolution,*Sciences express***10**,1126*science*.**10,**60089

Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., & Tsuchiya, T.(1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli.Antimicrob Agents Chemother.***42**, 1778-1782.

Murray, I.A., & Shaw, W.V. (1997). O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products.*Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1-6.

Nierhaus, K. H., & Wilson, D. N. (2004). Protein synthesis and ribosome structure. Translating the genome, *Weinheim : Wiley-VCH*, P**580**.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.*MicrobiolMolBiol Rev***67**, 593-656.

Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R. Saier, M.H., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B., Grinius, L.L. (1996). The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol*. **19**,1167-1175

Personne, Y. & Parish T. (2014). Mycobacterium tuberculosis possesses an unusual tmRNA rescue system. *Tuberculosis*. **94**, 34–42

Piddock, L.J.V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Nature Rev Microbiol***4**, 629-636

Poole, K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria.*ClinMicrobiol Infect***10**, 12-26.

Raetz, C.R., Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem***71**, 635–700.

Ramadoss, N.S., Alumasa,J.N., Cheng, L., Wang, Y., Li, S., Chambers, B.S., Chang, H., Chatterjee, A.K., Brinker, A., Engels, I.H., &Keiler, K.C. (2013a) Small molecule inhibitors of trans-translation have broad-spectrum antibiotic activity. *ProcNatlAcadSci U S A*. **110** , 10282-10287.

Ramadoss, N.S., Zhou, X. &Keiler, K.C. (2013b). tmRNA is essential in *Shigellaflexneri*. *PLoS ONE***8**,e ,57537.

Sanders, C. C. (2001).Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones.*Clin Infect Diseases***32** (Suppl.1), S1-S8.

Saier, M.H. Tam, R. Reizer, A.,&Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *MolMicrobiol***11** , 841-847.

Saier, M.H., Jr., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., & Liu, J. (1999). The major facilitator superfamily.*J MolMicrobiolBiotechnol.***1**, 257-279.

Schaub, R.E., Poole, S.J., Garza-Sánchez, F., Benbow, S., & Hayes, C.S. (2012).ProteobacterialArfA peptides are synthesized from non-stop messenger RNAs. *J BiolChem***287(35),** 29765–29775.

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J.S., Barry, C.E. 3rd, Wang, H., Zhang. W. & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science***333**, 1630-16322.

Silhavy, T.J., Berman, M.L. &Enquist L.W. (1984). Experiments in Gene Fusion. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, *NY* , p. **250**

Taylor, R.G., Walker, D.C. &McInnes, R.R. (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res*. 21:1677-1678.

Thanassi, D.G., Cheng, L.W., &Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*.*J Bacteriol***179** , 2512-2518.

Thomson, K.S., & Smith Mol&, E. (2000).The new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium.*Microbes Infect.***2**, 1225-1235

Tikhonova, E.B., Devroy, V.K., Lau, S.Y., &Zgurskaya H.I. (2007). Reconstitution of the *Escherichia coli* macrolide transporter: the periplasmic membrane fusion protein MacA stimulates the ATPase activity of MacB. Mol. *Microbiol*. **63**, 895-910.

Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., &Saier, M.H., Jr. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J MolMicrobiolBiotechnol.* **1**, 107-125.

Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S., &Fridkin, M. (2000). The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide. *Biochemistry***39**, 11838-11844

Tsukagoshi, N., &Aono, R. (2000). Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump.*J Bacteriol***182** , 4803-4810.

Vaara, M., (1992).Agents that increase the permeability of the outer membrane.*Microbiol Rev***56** ,395-411.

vanVeen, H.W., Konings, W.N. (1998). The ABC family of multidrug transporters in microorganisms, *Bioch. BiophysActa - Bioenergetics*, **1365**, 31-36.

Wanner, B.L. (1986).Novel regulatory mutants of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12.*J.Mol.Biol*. **191**,39-58

Weis, F., Bron, P., Giudice, E., Roll&, J.P., Thomas D., Felden B. &Gillet R. (2010). tmRNA–SmpB: a journey to the centre of the bacterial ribosome. *EMBO J.* **29**, 3810-3818.

Whitney, E. N. 1971. The *tolC* locus of *Escherichia coli* K12.*Genetics***67**, 39–53.

Wiriyathanawudhiwong, N., Ohtsu, I., Li, Z-D., Mori, H., & Takagi, H. (2009). The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *ApplMicrobiolBiotechnol*. **81**,903–913.

Wright, G.D. (1999). Aminoglycoside-modifying enzymes.*CurrOpinMicrobiol.***2**, 499-503.

Yusupov , M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D. &Nollcr, H. F. (2001).Crystal structurcs of thc ribosomc at 5.5 A° Rcsolution,*Science***292**, 883-896.

Zgurskaya, H.I. (2002). Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance.*Int Med Microbiol***292**, 95-105.

Résumé

Les mécanismes mis en jeu par les bactéries pour la résistance aux antibiotiques sont en développement continu, pour cela des études sont menés afin de rechercher une nouvelle voie qui peut-être ciblée par le développement des antibiotiques comme la trans-transduction.
Le KKL-35 est une molécule qui peuvent inhiber la trans-transduction.
L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité de KKL-35 par l'étude de son mécanisme d'action en s'intéressant à la perméabilité des souches, à la pompe efflux a l'aide des souches hospitalières uro-pathogènes et par la validation des cibles intracellulaires en testant des souches mutants en *tolC* ,*smpB* ,*arfA* .
Toutes les souches ont été sensibles au KKL-35 avec une inhibition de 50% de taux de croissances avec 50 µM de KKL-35. L'utilisation à une dose sub-inhibitrice da la polymyxine 0,5 µg/mL dans une mélange avec KKL-35 à 10µM a abouti à une augmentation de la sensibilité en diminuant les taux des croissances et pour certains souches abolit directement la croissance. Le mutant de pompe d'efflux *tolC* est incapable de croitre en présence de KKL-35 à 10µM. Les mutants de trans-traduction et le mutant *smpB* montre une sensibilité pareille à celle de la souche sauvage par contre le mutant *ssrA* est plus sensible .De même le mutant *arfA* est résistante comme la souche sauvage.

Mots clés : Trans-traduction, pompe d'efflux, KKL-35, polymyxine, *tolC*, *ssrA*, *smpB*, *arfA*

Abstract

The mechanisms used by bacteria to antibiotic resistance are in constant development. Studies are conducted to find new path, that could target trans-translation
The objective of this study is to evaluate the activity of KKL-35 by studying the mechanism of action by looking at the permeability of the strains, the efflux pump using hospital uro-pathogenic strains and validation of intracellular targets by testing mutant strains, *smpB, tolC* , *arfA.*
All the strains were sensitive to KKL-35 with 50% inhibition of growth rates with 50 µM of KKL-35. Using a sub-inhibitory dose of polymyxin (0.5 µg/ml) in a mixture with KKL 35 (10 µM) led to an increase of the sensitivity by reducing the growth rate of the strains and in some cases, directly abolishes the growth. The mutant *tolC* (efflux pump) is unable to grow in the presence of KKL-35 10 µM. The *smpB* mutant shows a similar sensitivity to that of wild strains while on the contrary, the *ssrA* mutant is more sensitive. Similarly, the mutant *arfA* is resistant as the wild strain.