

**TD: Antibiotiques**  
**Modes d'Action & Mécanismes de Résistance**

**Houssain Benabdelhak MCU à Université Paris-6,**

**LIP- UMR 7623 CNRS, Site des Cordeliers**  
**Année 2009**

# Antibiotiques

## Découverte & Définitions

---

- ➔ **1929:** découverte pénicilline G par A. Fleming (*P. notatum* & *chrysogenum*)
- 1938-1945:** premier usage clinique (2<sup>ème</sup> guerre mondiale)
  - Depuis plus de 4000 antibiotiques décrits (tous ne sont pas commercialisés)
  - ~70% sont synthétisés par les micro-organismes.

- ➔ **Définition plus large retenue en bactériologie médicale:**

Les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produit par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes.

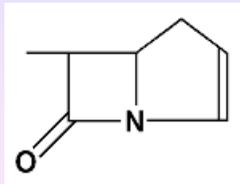
# Critères de Classification des Antibiotiques (1)

➡ **Origine:** élaborés par des micro-organismes ou produits de synthèse

➡ **Nature chimique:** très variable, souvent une structure de base (exemple le cycle  $\beta$ -lactam) sur laquelle il y a hémisynthèse

**Il existe plusieurs familles de composés en fonction de la nature du cycle adjacent:**

Carbapénème

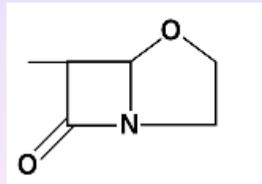


cycle à 5 atomes  
insaturé



**Imipénem &  
composés apparentés**

Clavame

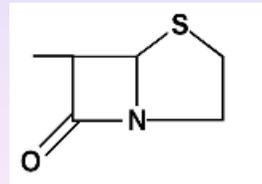


cycle à 5 atomes  
oxygéné



**Inhibiteurs  
de  $\beta$ -lactamases**

Péname

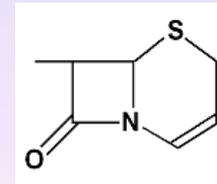


cycle à 5 atomes  
soufré



**Pénicillines**

Céphème

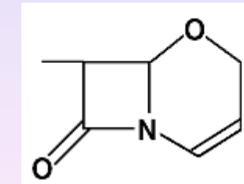


cycle à 6 atomes  
insaturé, soufré



**Céphalosporines  
(différentes générations)**

Oxacéphème

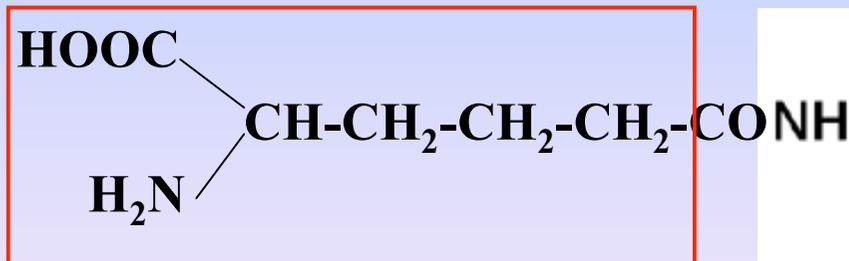


cycle à 6 atomes  
insaturé, oxygéné

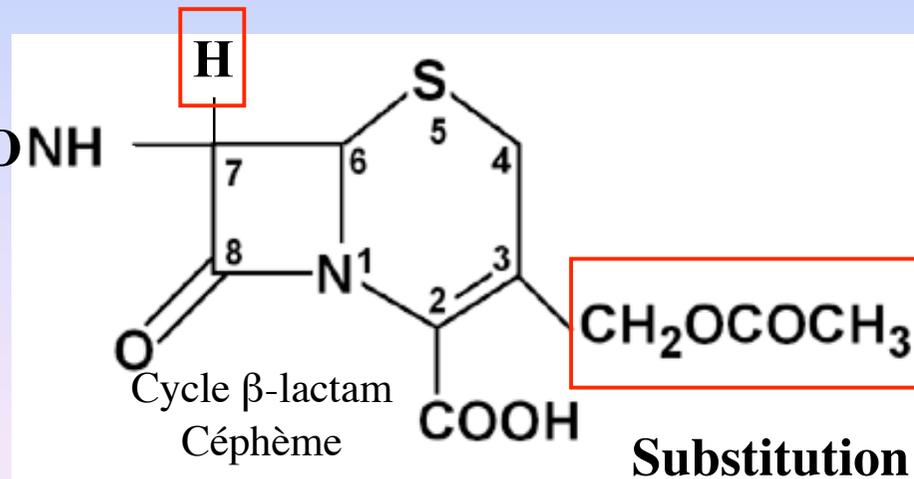
# Critères de Classification des Antibiotiques (2)

## Céphalosporine C (1<sup>ère</sup> génération)

Protection du noyau  $\beta$ -lactam  
Substitution



Substitution  
Augmentation de l'affinité  
pour la cible bactérienne



Substitution  
Modification des propriétés  
Pharmaco-cinétiques

Nature chimique donne souvent le nom à la famille d'antibiotique

# Critères de Classification des Antibiotiques (3)

---

➔ **Modalité d'action:** consiste à étudier les interactions dans le temps entre des concentrations variables d'un antibiotique et d'une bactérie.

## Deux paramètres d'activité à définir:

### ⬢ **Concentration Minimale Inhibitrice (CMI):**

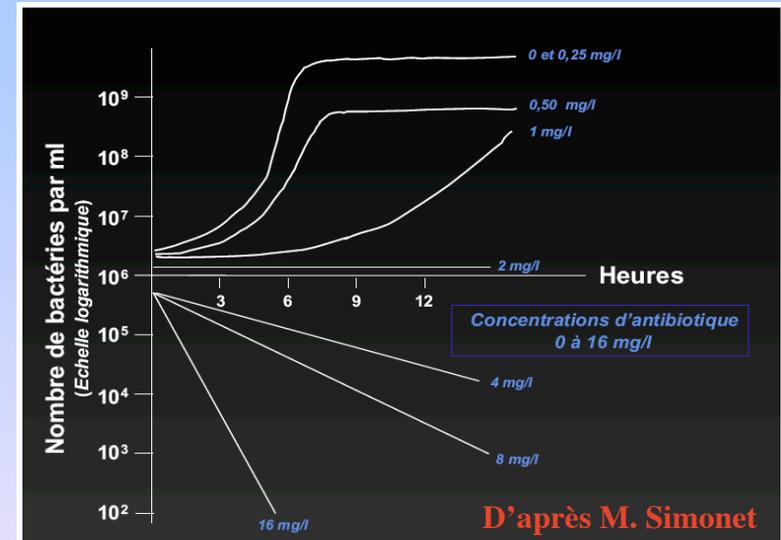
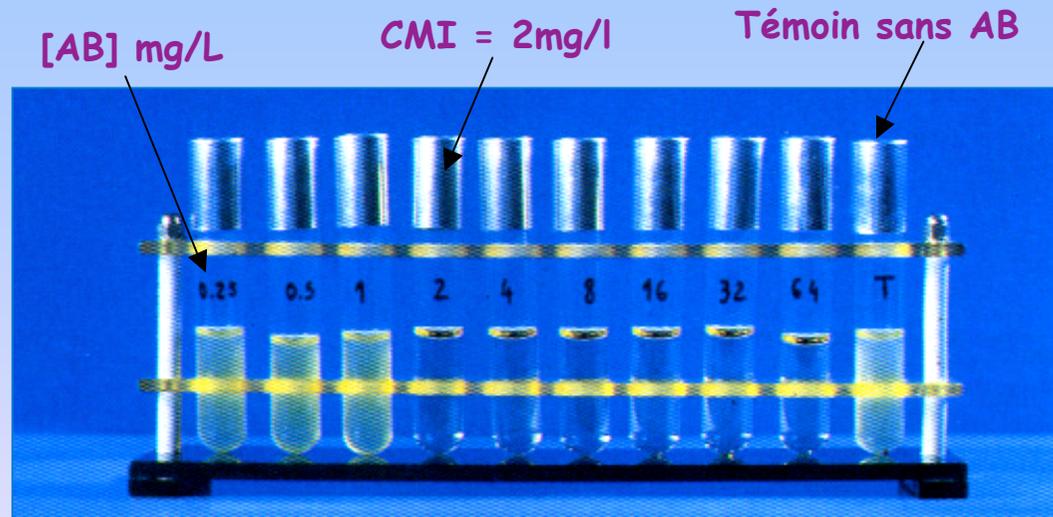
La plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe la multiplication bactérienne (bactériostase) en 18-24 heures

### ⬢ **Concentration Minimale Bactéricide (CMB):**

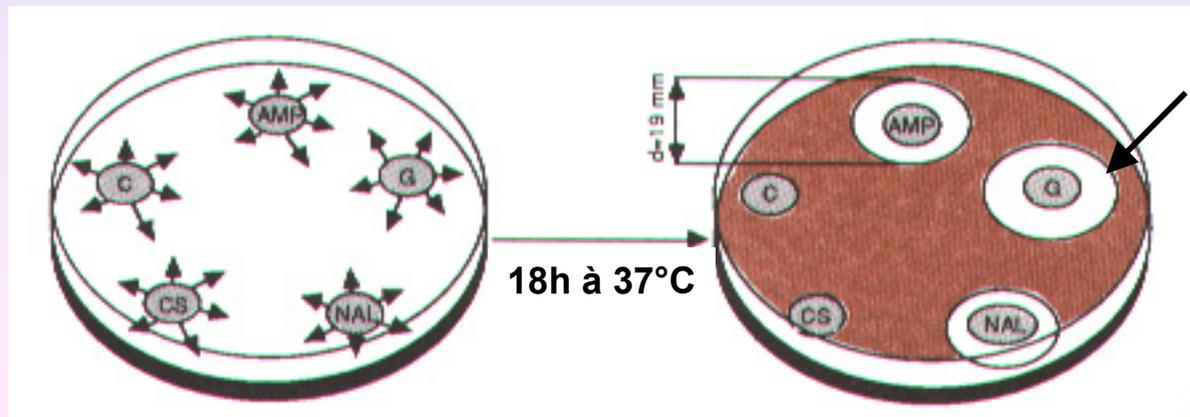
La plus faible concentration d'antibiotique qui tue 99,99% d'une population bactérienne en 18-24 heures

# Plusieurs Méthodes de détermination

## → Méthode de dilution en milieu liquide



## → Méthode de dilution en milieu solide (disques d'antibiotiques)



*Diamètre d'inhibition est proportionnelle à la CMI*

# Propriétés de l'Antibiotique

**Antibiotique bactériostatique:  
CMB/CMI = 4-16**

**Antibiotique bactéricide:  
CMB/CMI = 1-2**

# Antibiotiques Inhibant la Synthèse de la Paroi Bactérienne

---

## ➔ Inhibition de la biogenèse du peptidoglycane

### ⬢ **Les bêta-lactamines (pénicillines & céphalosporines)**

Antibiotiques qui inhibent de manière compétitive, les transpeptidases par analogie structurale entre le noyau bêta-lactame et le motif dipeptidique D-Ala-D-Ala

### ⬢ **Les glycopeptides (vancomycine & teicoplanine)**

Antibiotiques qui se fixent sur le motif dipeptidique D-Ala-D-Ala et inhibent, par encombrement stérique, les transglycosidases et les transpeptidases

## ➔ Inhibition de la formation des acides mycoliques (acides gras à longue chaîne C >60) de la « paroi » des mycobactéries

### ⬢ **Les dérivés de l'acide isonicotinique (isoniazide & pyrazinamide)**

Antibiotiques qui bloquent, par analogie structurale avec le NAD, les enzymes de biogenèse des acides mycoliques dont le co-enzyme est le NAD.

## Antibiotiques Actifs sur les Ribosomes et Inhibant la Synthèse Protéique

---

➔ **Ribosome bactérien, organelle formé de 2 sous unités (30S & 50S) sur lesquelles peuvent se fixer les antibiotiques.**

**Différentes étapes de la synthèse protéique peuvent être perturbées.**

- **Les aminosides** (streptomycine; erreur de lecture. Le message est faussé; l'acide aminé n est incorporé à au lieu de l'acide aminé a)
- **Les tétracyclines** (tétracycline; inhibition de la fixation du complexe ARNt-acide amine dans la sous-unité 50 S)
- **Les macrolides** (érythromycine; inhibition de la translocation. Le complexe ARNt-acide ne peut passer du site amino- acyl au site peptidyl)
- **Les phénicolés** (chloramphénicol; inhibition de la transpeptidation. Les acides aminés a et b ne peuvent être liés entre eux)

# Antibiotiques Inhibant la Synthèse des Acides Nucléiques

➔ **Inhibition compétitive des enzymes de biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique, précurseur des bases puriques et pyrimidiques**

⬢ **Les sulfamides et le triméthoprime**

Blocage enzymatique par analogie structurale de l'antibiotique avec le substrat d'enzyme (**dihydrofolate réductase: substrat acide dihydrofolique/triméthoprime**)

➔ **Inhibition de la transcription d'ADN par fixation sur l'ARN polymérase ADN-dépendante**

⬢ **Les rifamycines (rifampicine & rifabutine)**

Antibiotiques se fixant sur la sous-unité RpoB de l'ARN polymérase

➔ **Inhibition des topo-isomérase II (GyrA/GyrB) & IV (ParC/ParE) qui contrôlent le surenroulement de l'ADN nécessaire à la réplication de l'acide nucléique**

⬢ **Les quinolones (acide nalidixique)**

⬢ **Les fluoroquinolones (norfloxacin & ciprofloxacine)**

} Cibles  
GyrA & ParC

# Origines d'Augmentation de la Résistance aux Antibiotiques

---

➡ **Consommation abusive et traitements mal adaptés**

- **En France, 60 millions de prescriptions en 2000**

➡ **Recours intensif dans l'élevage industriel**

- **Quantité importante d'antibiotiques produits dans le monde sont destinés à la médecine vétérinaire**
- **En Europe, on utilise dizaine mg d'antimicrobiens pour produire 1 kg de viande destinée à la consommation**

# Mécanismes de Résistance aux Antibiotiques (1)

---

## ➔ Modification de la cible de l'antibiotique (camouflage)

- Altération des transpeptidases (PLP) rendant la bactérie insensible aux  $\beta$ -lactamines.
- Acquisition d'une enzyme non sensible à l'antibiotique, mais capable de contourner la voie métabolique cible (**dihydrofolate-réductase supplémentaire insensible au triméthoprime**).

## ➔ Existence d'une enzyme qui modifie l'antibiotique (brouillage)

- Hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactam par des  $\beta$ -lactamases
- Phosphorylation, nucléotidylation et acylation des aminosides par Phosphoryl (**APH**)-, nucléotidyl (**ANT**)-, ou acétyl (**AAC**)-transférases

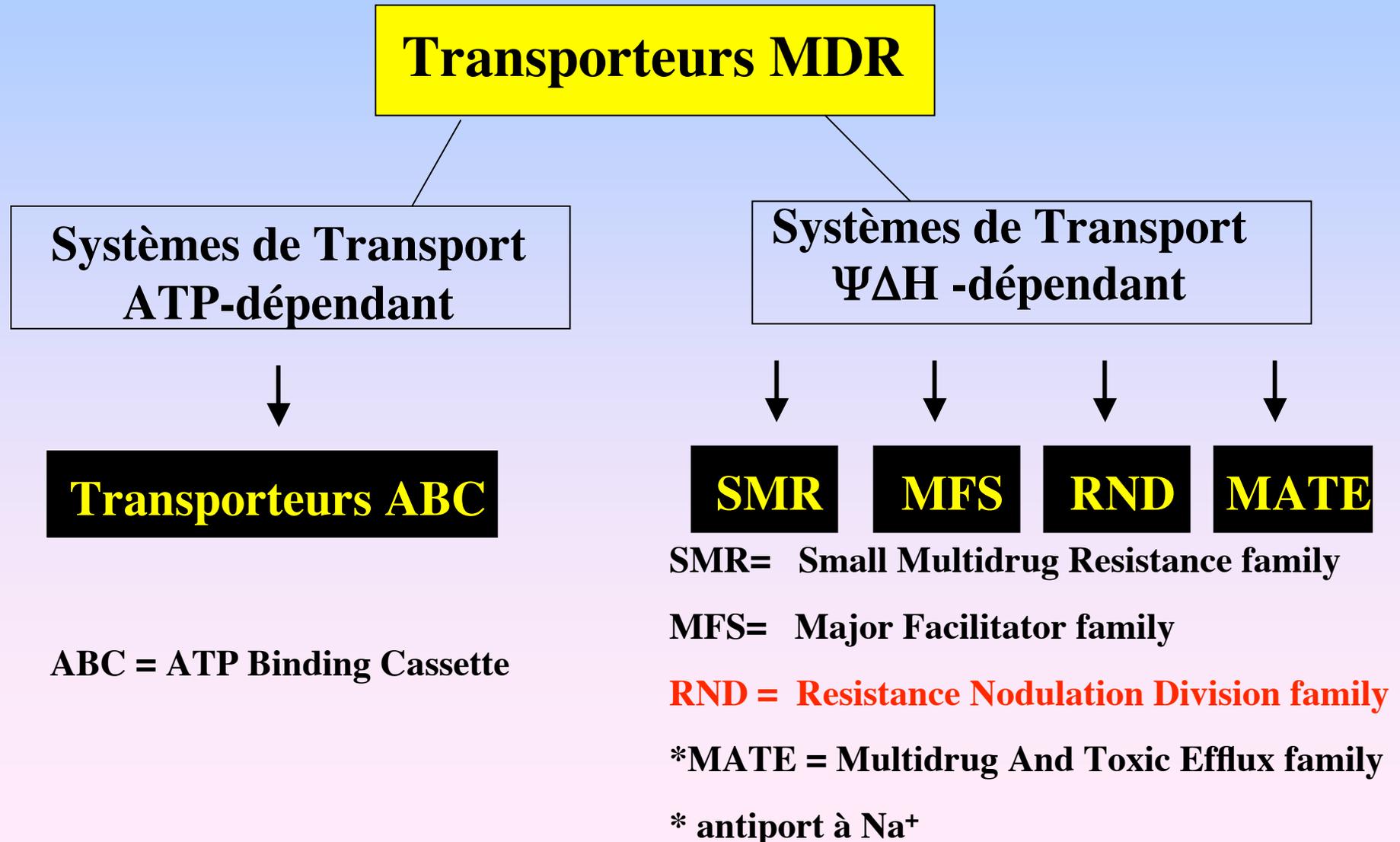
# Mécanismes de Résistance aux Antibiotiques (2)

---

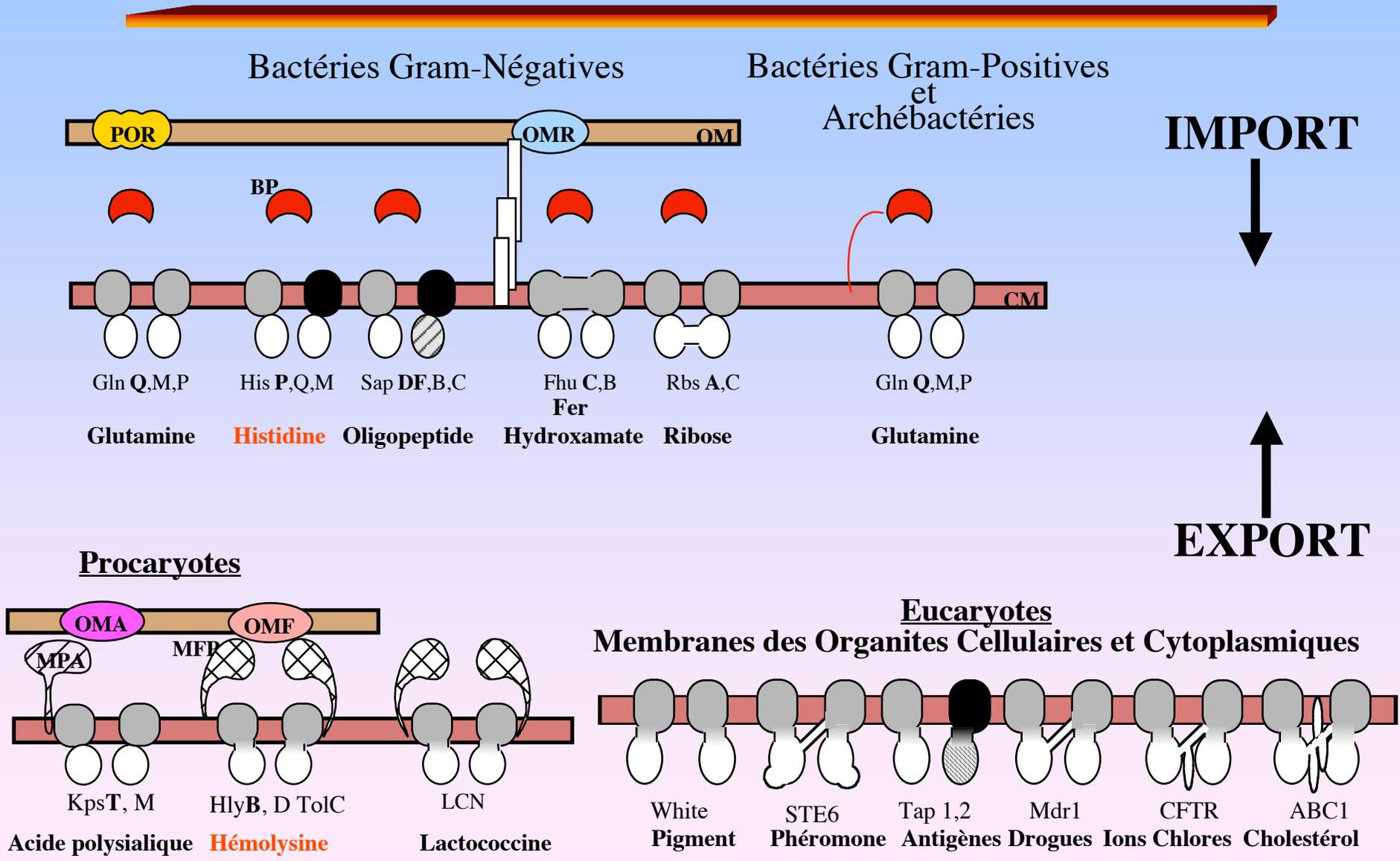
## ➔ Modification de la perméabilité membranaire (blindage)

- Réduction du nombre ou diamètre des porines, localisées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif.
- Activation des systèmes de pompes à efflux, localisés dans la membrane cytoplasmique (ou interne) des bactéries Gram négatif et à Gram positif, permettant d'expulser un antibiotique de la bactérie.

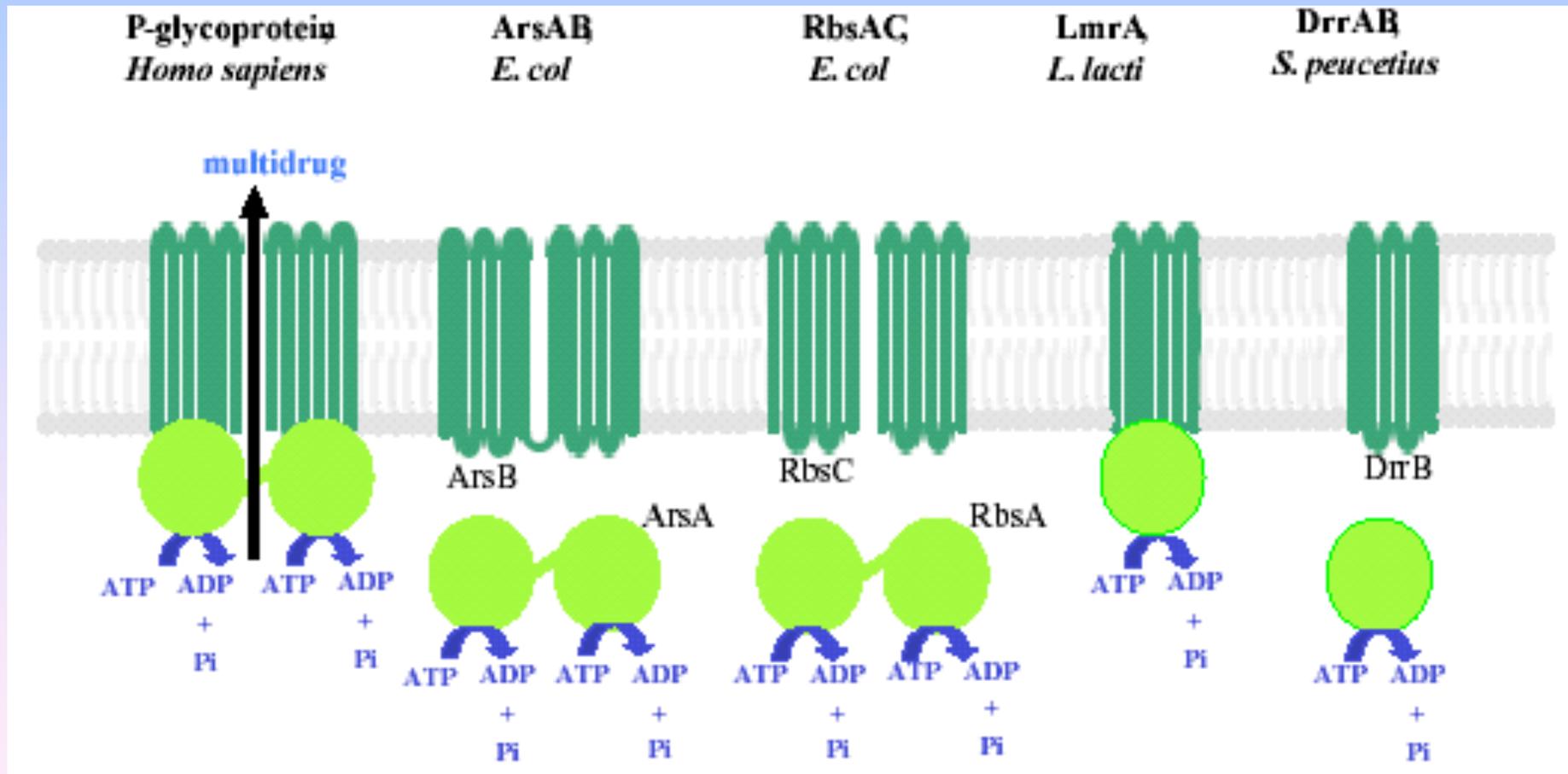
# Classification des Systèmes de Multi-Drogues Résistance (MDR)



# Organisation des Transporteurs-ABC



# Organisation Topologique Transporteurs ABC



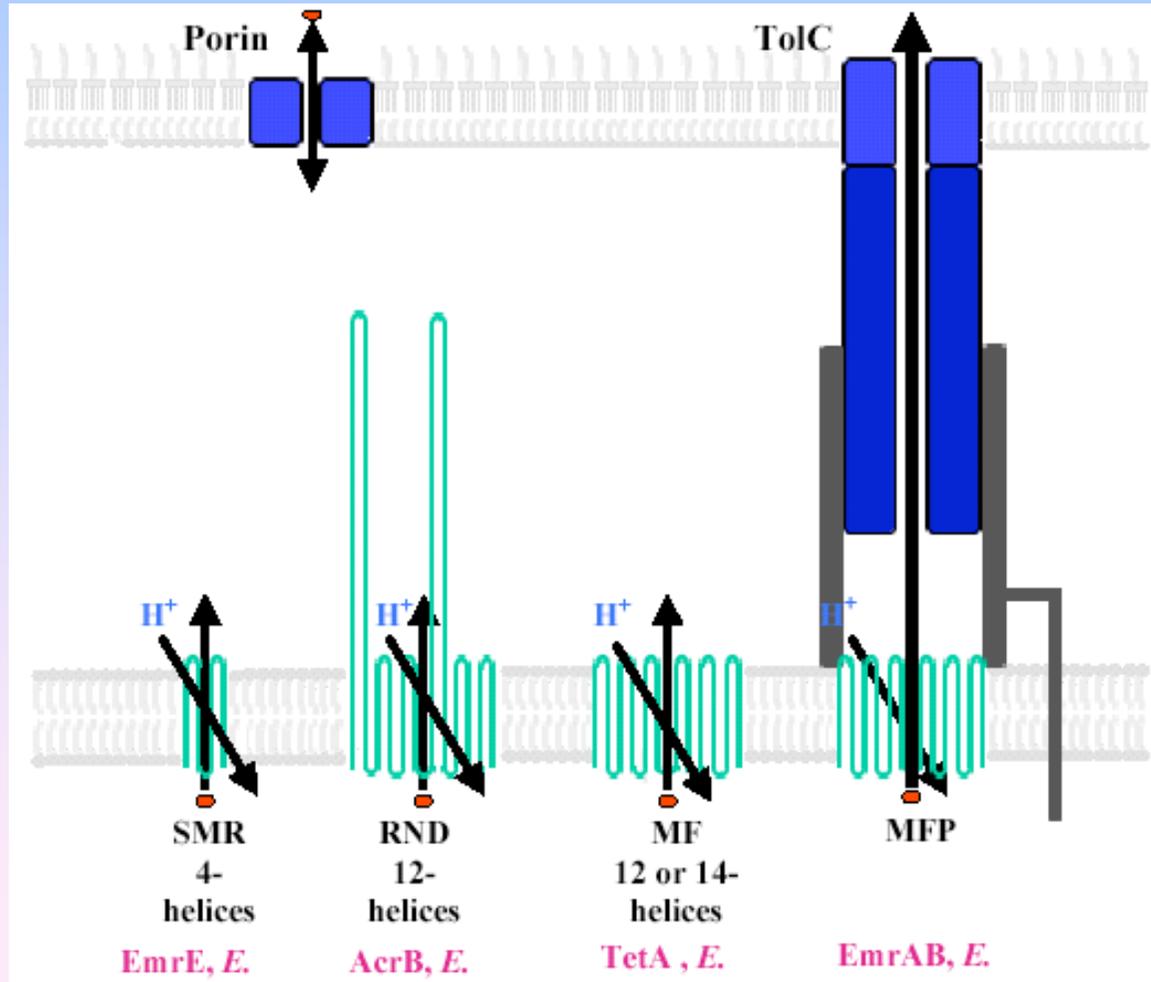
# Organisation Topologique des Systèmes MDR à Protons chez les Procaryotes

SMR= Small Multidrug Resistance

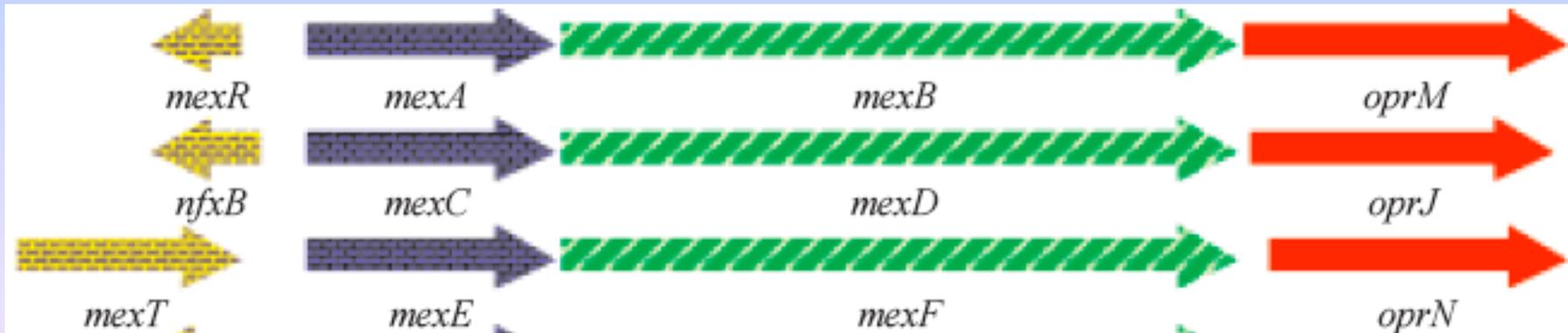
MF= Major Facilitator

RND= Resistance Nodulation Division

MFP= Membrane Fusion Protein

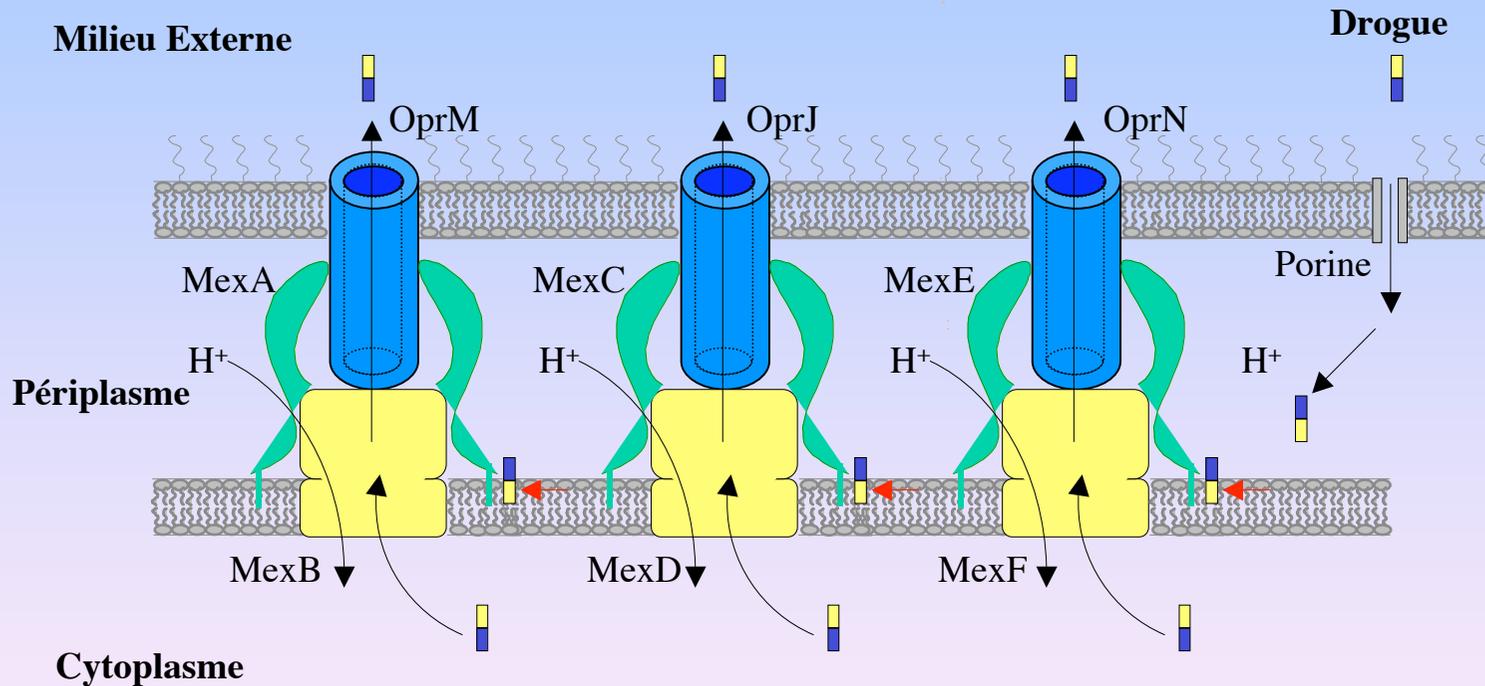


# Organisation Génique des Systèmes de Pompes à Efflux (RND) chez *Pseudomonas aeruginosa*



Schweizer HP 2003, *Genet. Mol. Res.*, 2

# Systemes de Pompes à Efflux chez *Pseudomonas aeruginosa*



**RND = Resistance Nodulation Division family**

**MFP = Membrane Fusion Protein family**

**OMF = Outer Membrane Factor family**

# Modèles *in silico* d'Assemblage du Système d'Efflux AcrAB-TolC chez *E. coli*

3:3:3

3:6:3

3:9:3

**TolC**

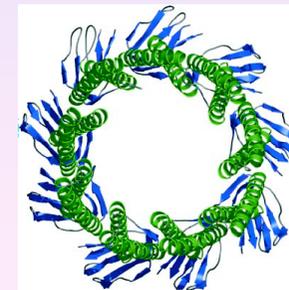
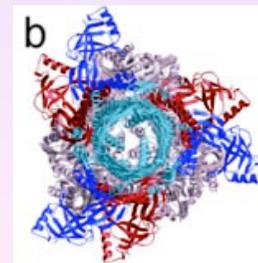
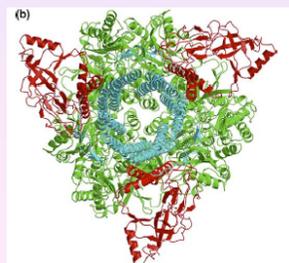
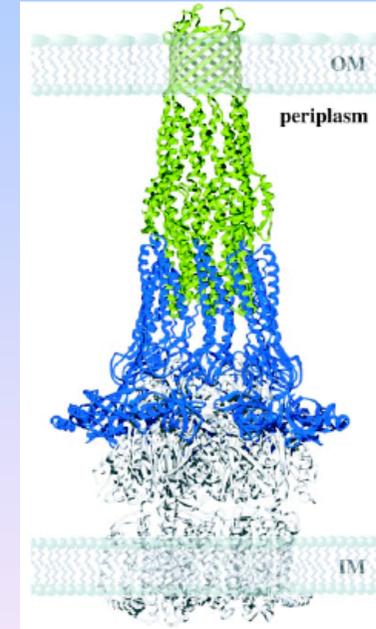
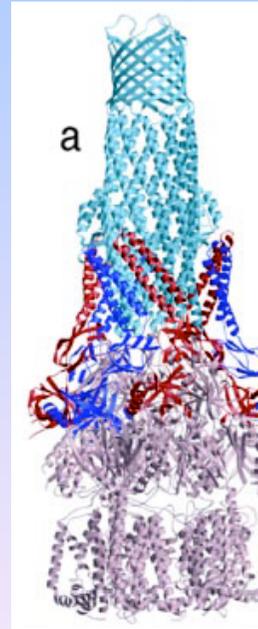
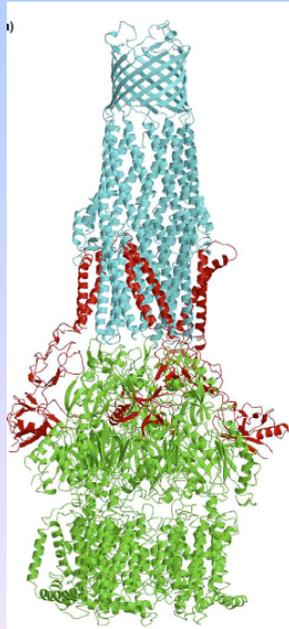
Nature 405, 2000

**MexA**

PNAS 101, 2004  
JBC 279, 2004

**AcrB**

Nature 419, 2002



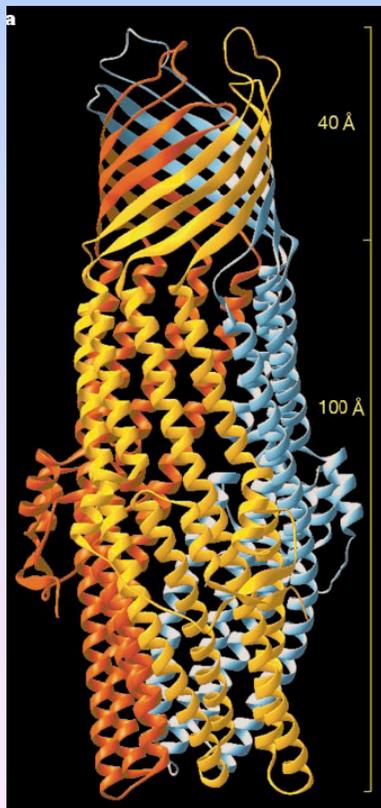
FEBS Letters 578, 2004

JBC 279, 2004

PNAS 101, 2004

# Structure Cristalline de TolC, Protéine de la Membrane Externe chez *E. coli* appartenant au Système d'Efflux AcrAB-TolC

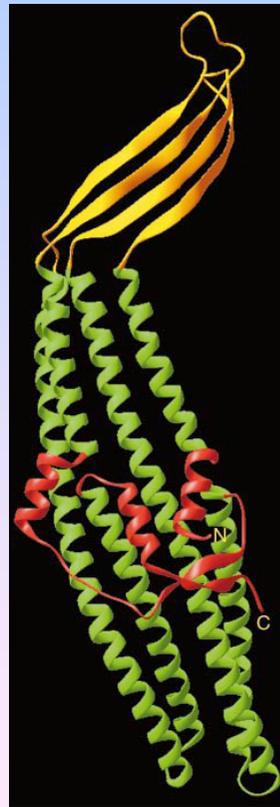
TolC<sub>trimère</sub>



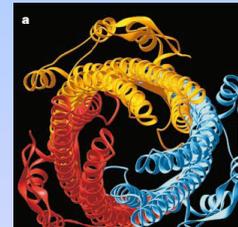
40 Å

100 Å

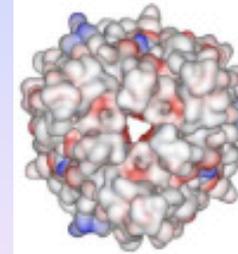
TolC<sub>monomère</sub>



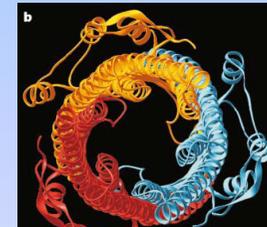
Fermé



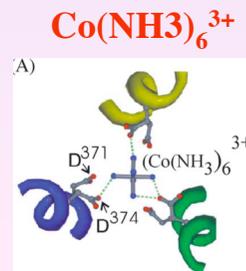
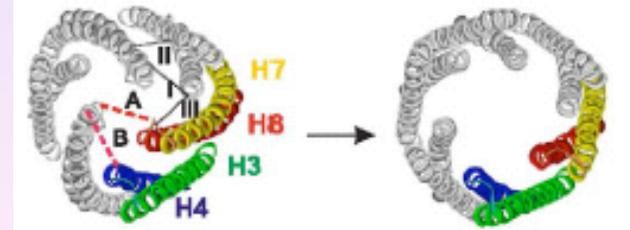
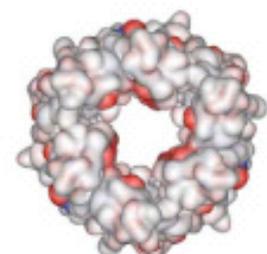
closed



Ouvert

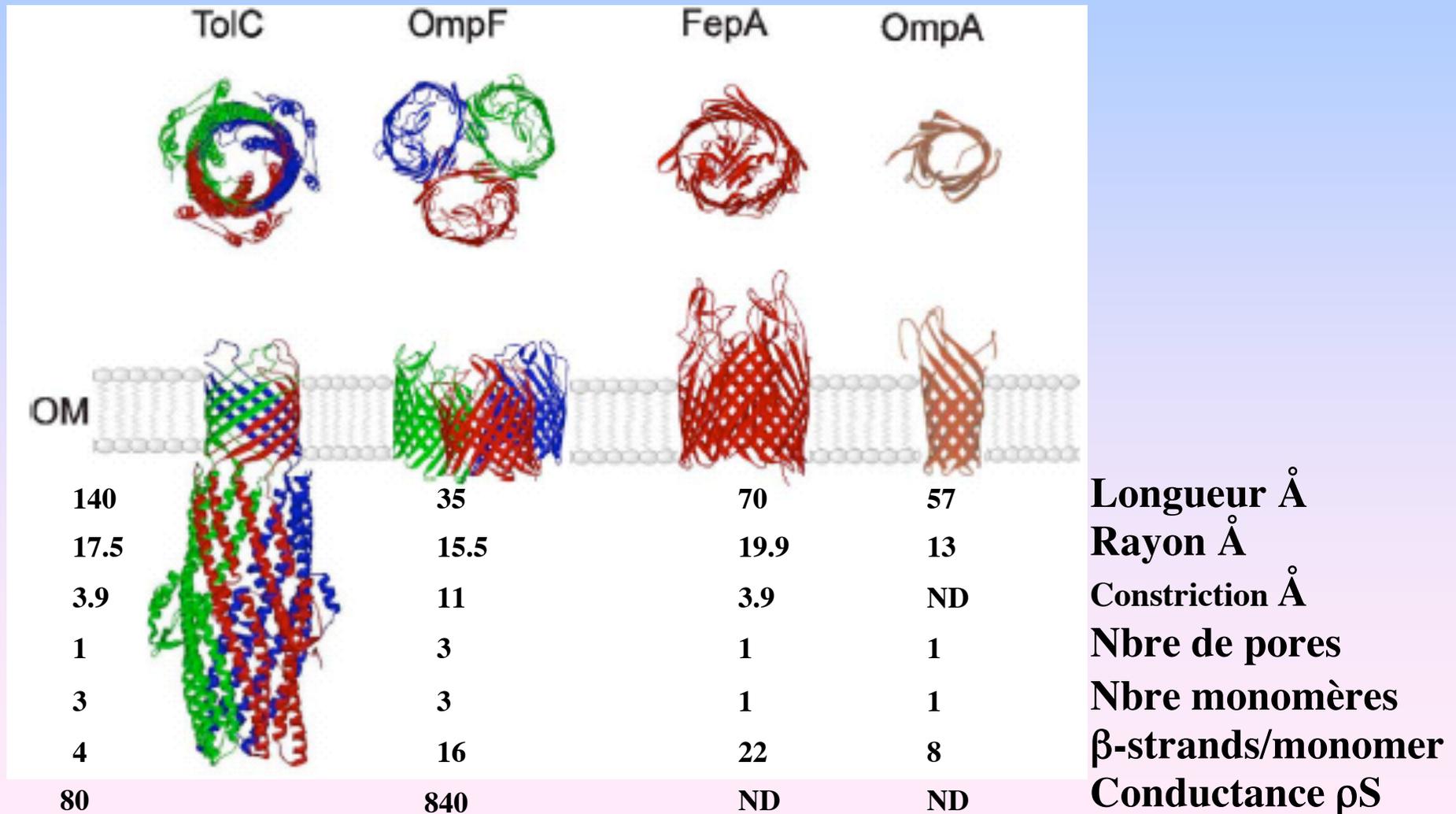


open



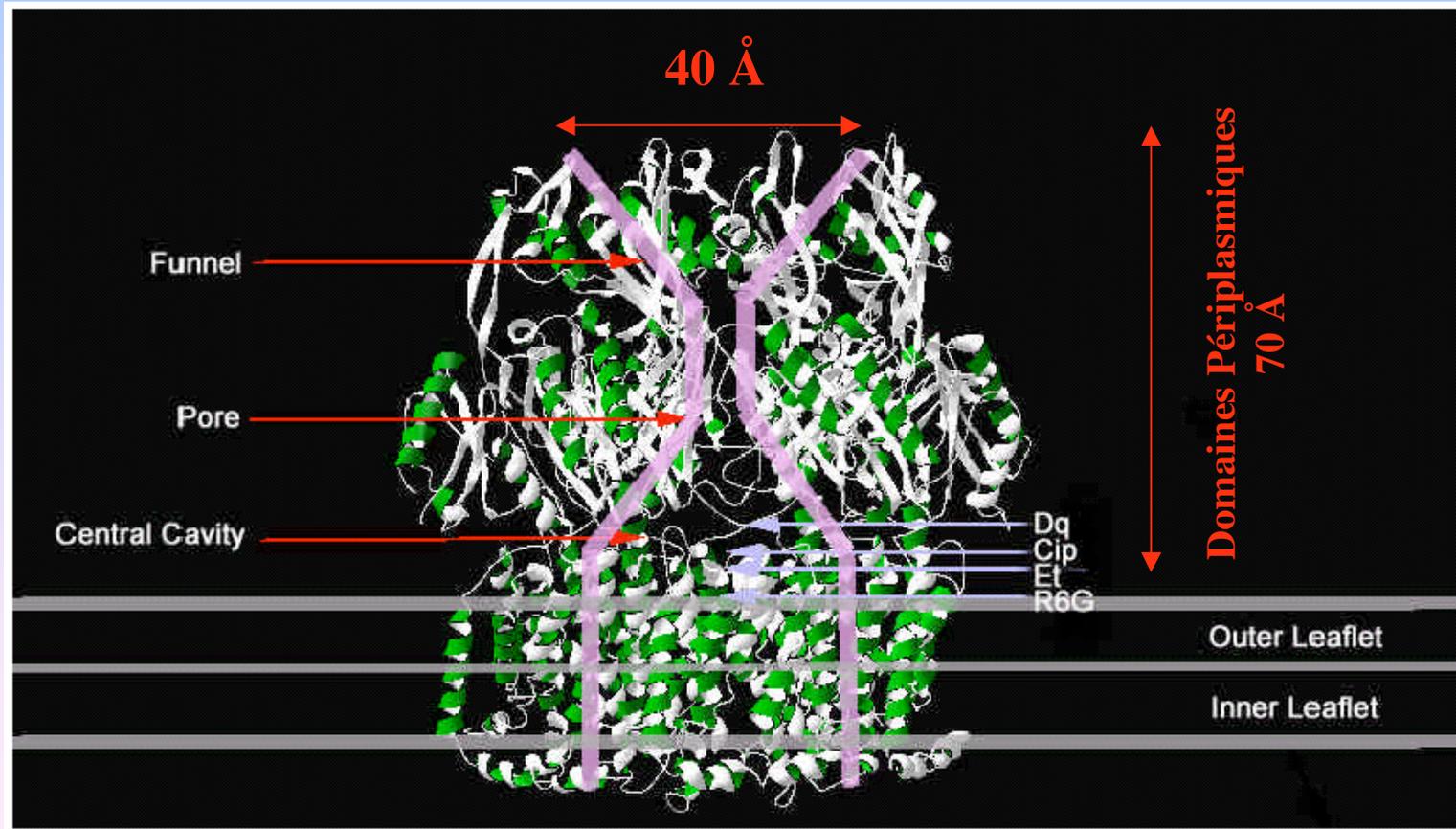
Koronakis et al., 2000  
Nature 405

# Comparaison des Propriétés Structurales de TolC à d'autres Protéines de Membrane Externe



# Structure Cristalline de AcrB (RND)

## Protéine de Membrane Interne Chez *Escherichia coli*



Murakami *et al.*, *Nature* 419, 2002

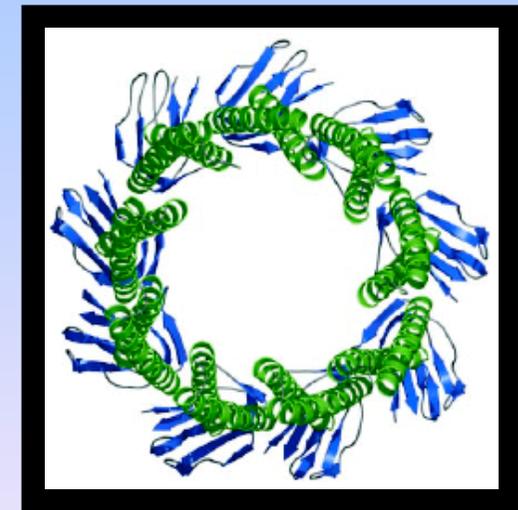
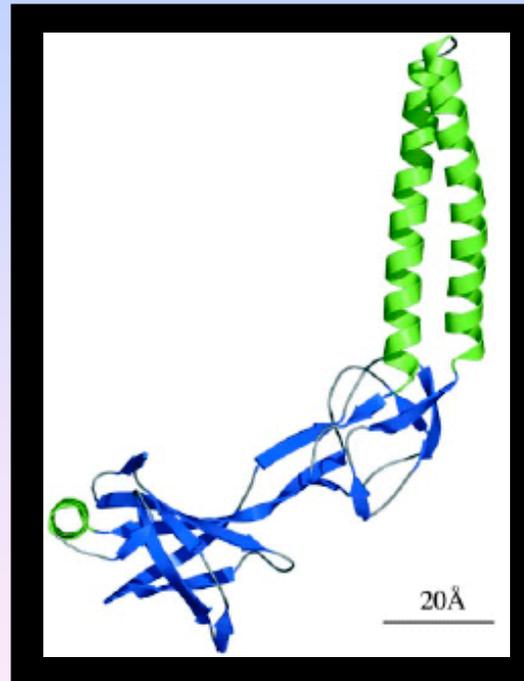
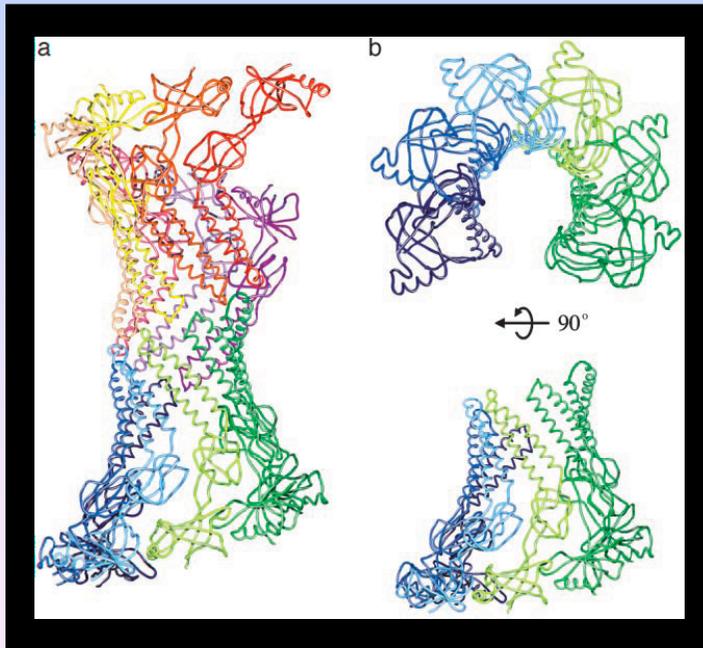
Yu *et al.*, *Science* 300, 2003

# Structure Cristalline de MexA(MFP) Protéine Périplasmique chez *P. aeruginosa*

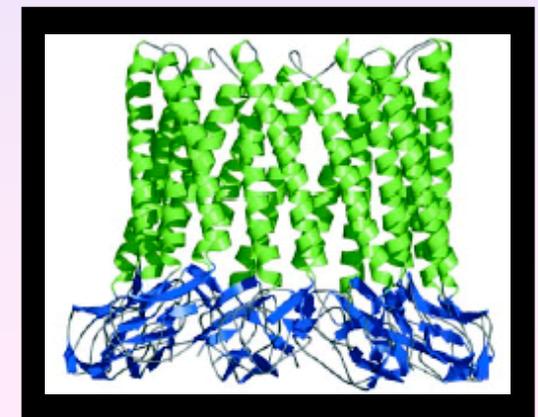
Higgins *et al.*, 2004, *PNAS* 101

Akama *et al.*, 2004, *JBC* 279

## Monomère MexA



↻ 90°

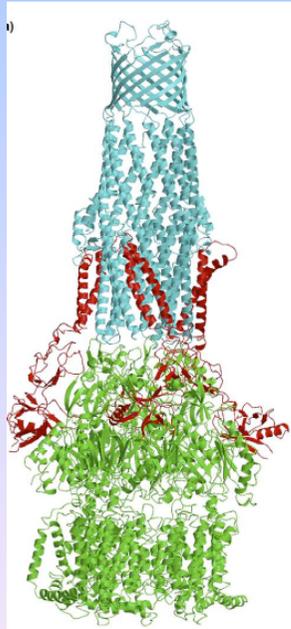


Arrangement des molécules de MexA  
dans le cristal

# Modèles *in silico* d'Assemblage du Système d'Efflux AcrAB-TolC chez *E. coli*

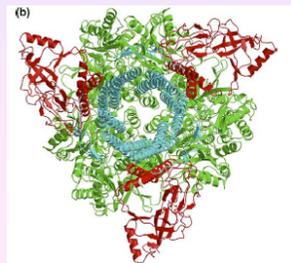
3:3:3

**TolC**  
Nature 405, 2000



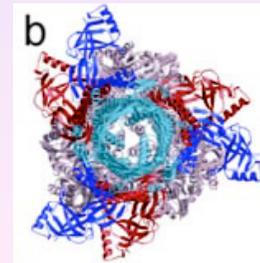
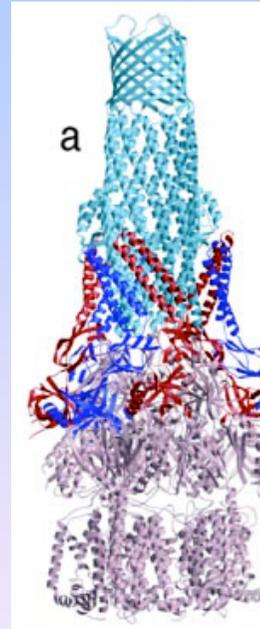
**MexA**  
PNAS 101, 2004  
JBC 279, 2004

**AcrB**  
Nature 419, 2002



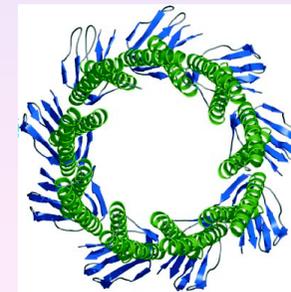
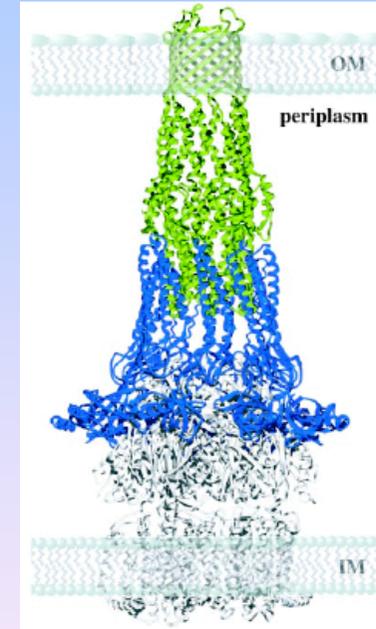
FEBS Letters 578, 2004

3:6:3



JBC 279, 2004

3:9:3



PNAS 101, 2004

# Rôle de la Protéine Périplasmique « Adaptateur » dans l'Assemblage de la Pompe: question contre-versée

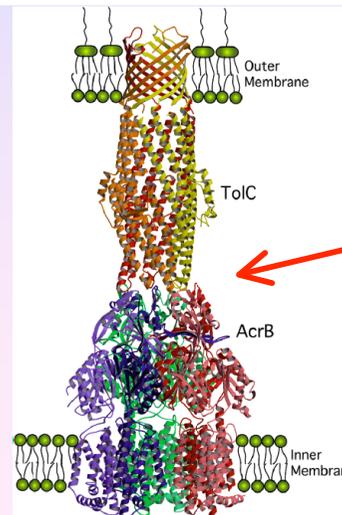
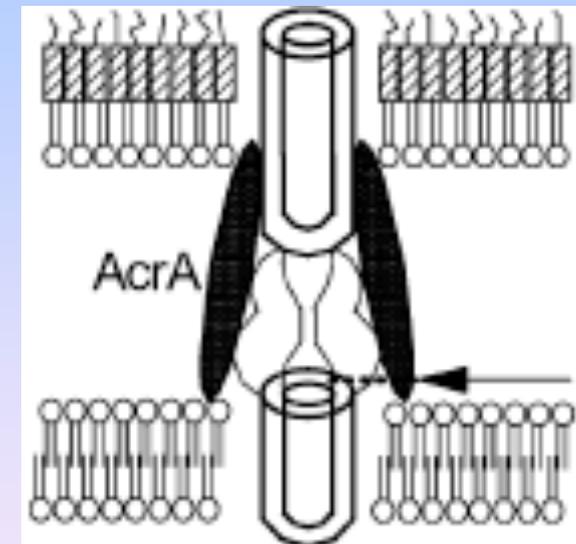
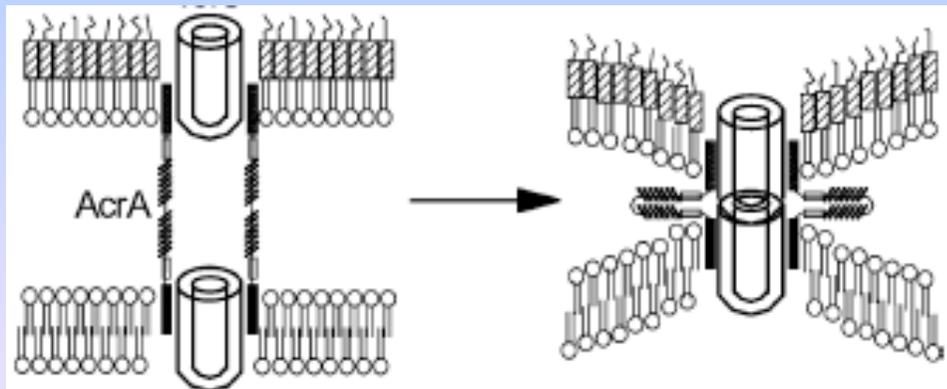
## Modèle 1

## Modèle 2

OMF

MFP

RND

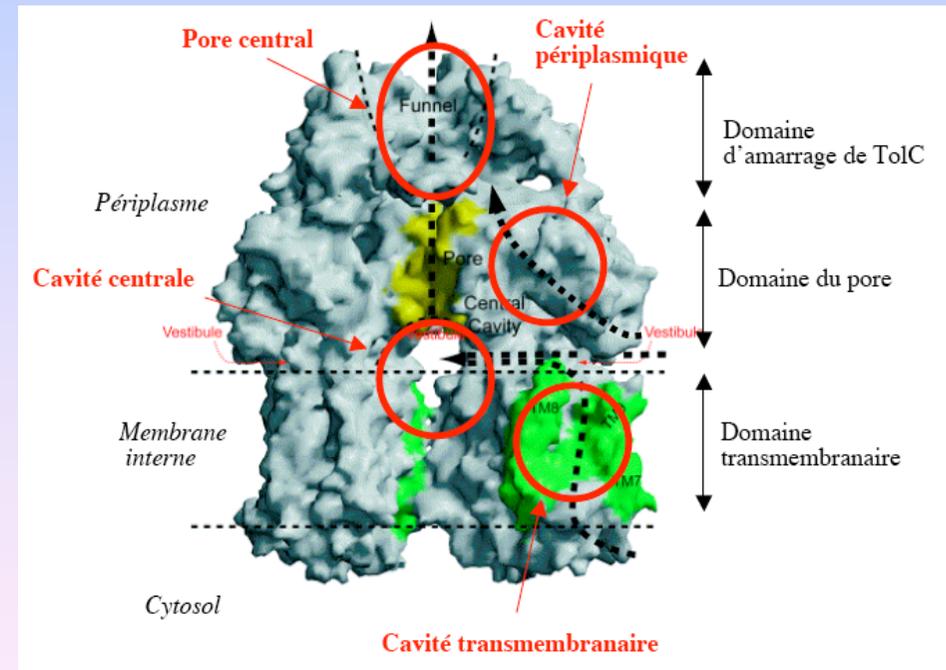
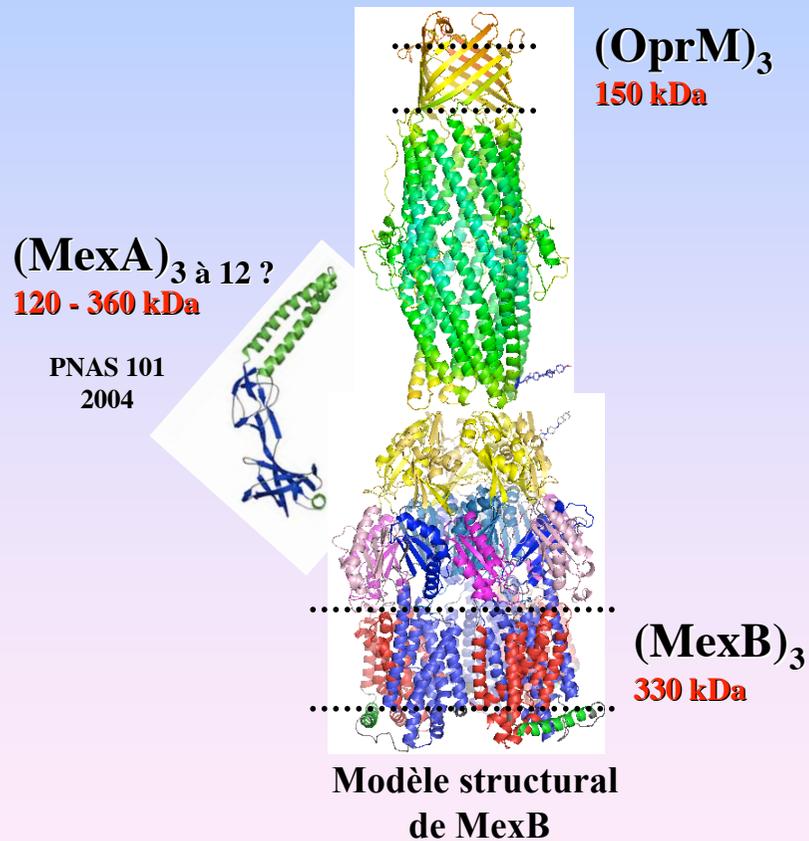


Tamura *et al.*, 2005  
*Biochemistry* 44

# Système d'efflux MexAB-OprM de *P. aeruginosa*

Modèle d'assemblage *in silico*  
Complexe protéique de 600 à 840 kDa

AcrB d'*E. coli* (AcrAB-TolC)  
Voies de passage des substrats ?



# Infections Nosocomiales

## Problème Majeur de Santé Public

---

- ➔ *P. aeruginosa*, Bacille Gram (-), mobile, ubiquitaire-aquaphile, produit des pigments & forme des biofilms
- ➔ Pathogène opportuniste (patients immuno-déprimés)
- ➔ Responsable à plus de 13% des infections nosocomiales
- ➔ 3<sup>ème</sup> rang après *Escherichia coli* (22 %) et *Staphylococcus aureus* (19%)

**En France, les infections nosocomiales toucheraient 5 à 10 %  
des personnes hospitalisée, avec plus de 4000 décès par an**

Magazine La Recherche Septembre 2005

# Expression Hétérologue chez *E. coli* d'une Nouvelle Pompe d'Efflux MexXY de *P. aeruginosa*

Mine *et al.*, 1999, AAC 43

## Résumés:

- -Les auteurs décrivent la mise en évidence de deux gènes, isolés du génome de *P. aeruginosa*, impliqués dans la résistance à de multiples drogues-antibiotiques.
- -Les gènes clonés *mexXY* homologues aux gènes des systèmes d'efflux MexAB, MexCD & MexEF de *P. aeruginosa* sont capables d'effluer des composés toxiques (comme bromure d'ethidium) et ceci après expression hétérologue chez *E. coli*.
- -Le système d'efflux MexXY confère une résistance prononcée aux fluoroquinolones en comparaison aux systèmes d'efflux MexAB-OprM & MexCD-OprJ
- -Le fonctionnement du système d'efflux MexXY nécessite la présence d'une troisième protéine TolC d'*E. coli* ou OprM de *P. aeruginosa*.

# Thème I

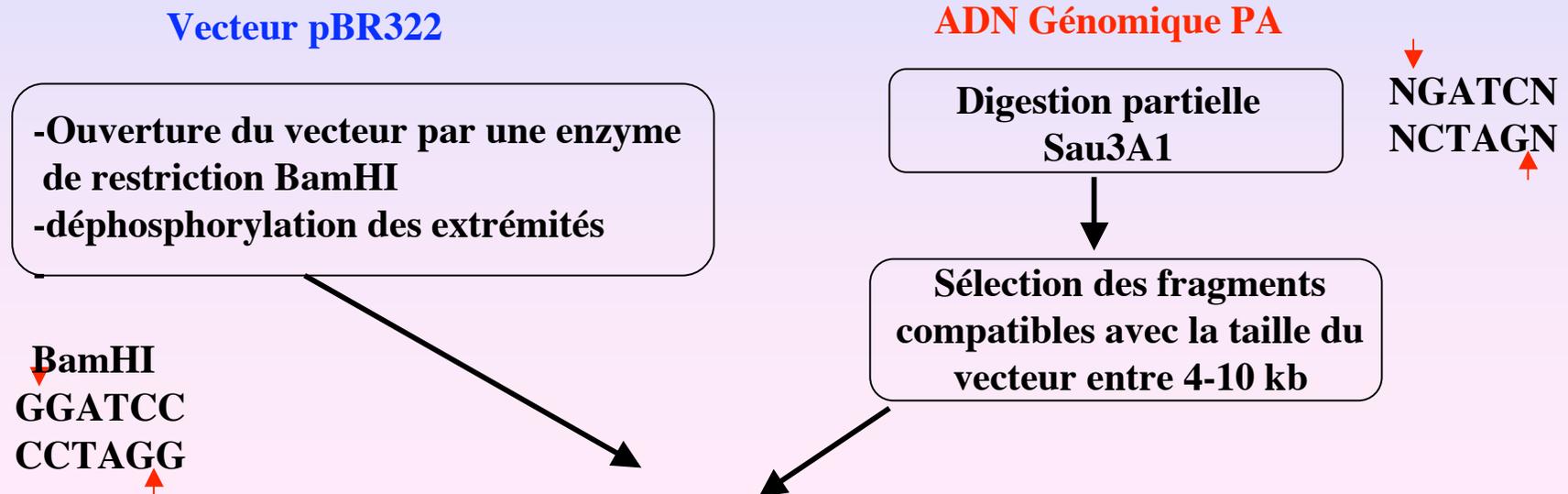
## Clonage des gènes *mexXY* de *P. aeruginosa*

Mine *et al.*, 1999, AAC 43

Question: par quelle approche les auteurs ont mis en évidence la présence d'un nouveau système d'efflux ?

### Approche de génétique moléculaire

● Préparation d'une banque d'ADN génomique à partir de *P. aeruginosa*

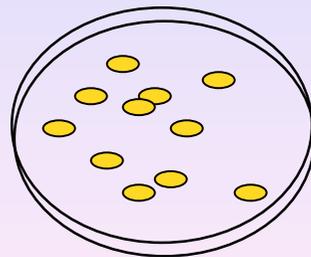


**Ligation**

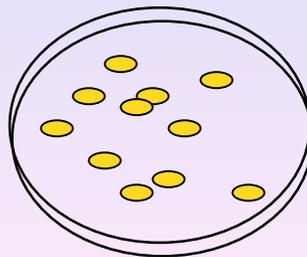
**Vecteurs recombinants  
(banque d'ADN de PA)**

**Transformation *E. coli* compétente  
KAM3 ( $\Delta$ acrAB)**

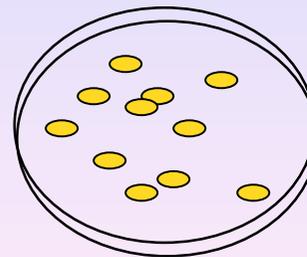
**Étalement sur Boîtes de pétri contenant  
des milieux sélectifs**



**BET  
12  $\mu$ g/ml**



**Eryth  
10  $\mu$ g/ml**



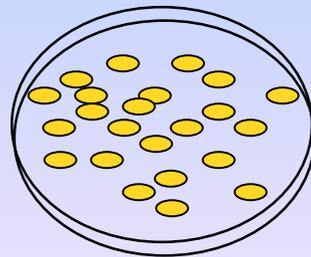
**Cm  
1  $\mu$ g/ml**

**1 jour/37 C°**

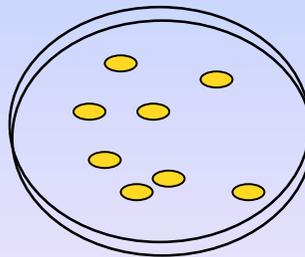
↓  
Récupération des colonies survivantes

↓  
Extraction ADN plasmidiques puis  
2<sup>ème</sup> Transformation *E. coli* compétente KAM3 ( $\Delta$ acrAB)

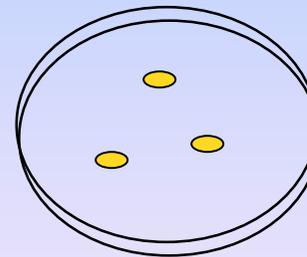
↓  
Etalement sur Boites de pétri contenant  
des milieux sélectifs



BET  
12  $\mu$ g/ml  
(43 candidats)



Eryth  
10  $\mu$ g/ml  
(8 candidats)



Cm  
1  $\mu$ g/ml  
(3 candidats)

2 jour/37 C°

↓  
Extraction des plasmides individuels  
& analyse des profils de restriction enzymatiques

Sur gel d'électrophorèse d'agarose-ADN  
par rapport à des expériences contrôles



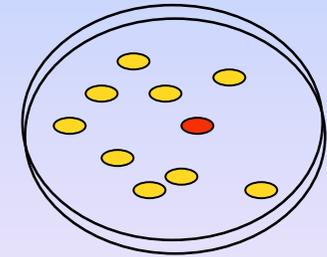
Trois profils de restriction enzymatique obtenus

1<sup>er</sup> profil similaires à celui de *mexAB*

2<sup>ème</sup> profil similaire à celui de *mexCD*

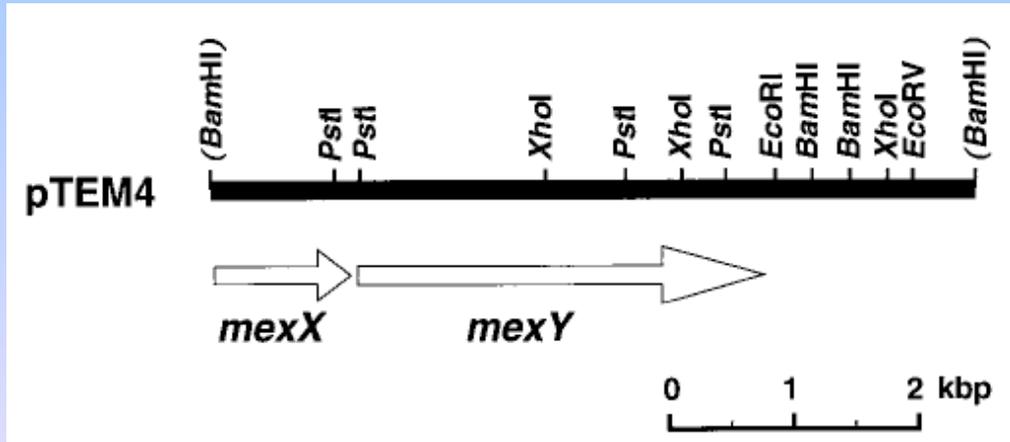
**3<sup>ème</sup> profil est nouveau**

***Nommé (plasmide pTEM4)***



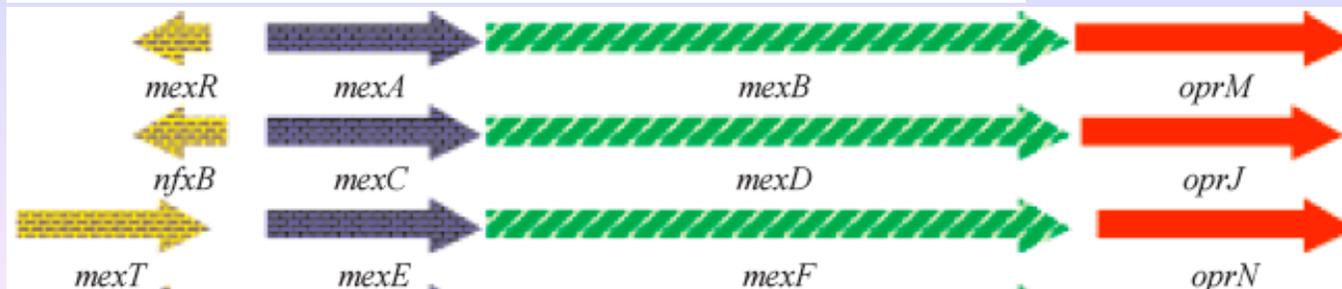
## ● Séquençage de l'insert porté par le plasmide pTEM4

### Méthode par terminaison de synthèse prématurée (Méthode de Sanger)



	MexX	MexY
ADN (pb)	1170	3141
Protéine (aa)	389	1046

Les 2 gènes *mexXY* forment vraisemblablement un opéron avec un promoteur commun



D'après Schweizer HP 2003  
*Genet.Mol.Res*, 2

### Caractéristiques des protéines MexX & MexY

- Pourcentage élevé d'identité (+40 %) séquence avec d'autres protéines homologues chez PA (MexAB, MexCD & MexEF et *E. coli* « AcrAB & AcrEF »)
- MexX lipoprotéine avec un ancre lipidique du côté N-terminal
- MexY protéine intégrale de la membrane interne (poly-topique)

# Thème I

## Clonage des gènes *mexXY* de *P. aeruginosa*

---

Mine *et al.*, 1999, AAC 43

### Conclusion 1:

**Nous sommes probablement en présence de deux gènes potentiellement impliqués dans un mécanisme d'efflux. Mais d'autres preuves formelles seront encore nécessaires**

# Thème II

## Caractérisation du Système d'Efflux MexXY

- Par mesure des Concentrations Minimales d'Inhibition (CMI) vis-à-vis différents composés chimiques y compris des agents anti-microbiens

### Expériences contrôles

Compound	KAM3	KAM3/pTEM4 ( <i>mexXY</i> ) <sup>a</sup>	KAM3/pTUM3 ( <i>mexAB-oprM</i> )	KAM3/pTEM31 ( <i>mexCD-oprJ</i> )
Acriflavine	2	16	>	<
Ethidium bromide	1	32	>	<
Erythromycin	1	32	>	<
Norfloxacin	0.016	0.13	>	>
Ofloxacin	0.016	0.13	>	>
Tetraphenyl phosphonium	NT <sup>b</sup>	NT		

<sup>a</sup> Genes carried on the plasmids are shown in parentheses.

<sup>b</sup> NT, not tested.

**Fluoroquinolones**

### Conclusion 2:

Le système MexXY confère une résistance prononcée aux fluoroquinolones en comparaison aux autres systèmes Mex

# Quantification d'efflux du BET par des cellules exprimant la pompe MexXY

## Principe de la Mesure

Les cellules d'*E. coli* KAM3 en croissance

Exprimant

pTEM4  
(*mexXY*)

pBR322  
(parental)

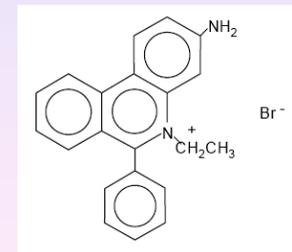
Expérience contrôle

Incubation en présence du BET 10  $\mu\text{M}$

Diffusion spontanée  
ce qui conduit à son accumulation  
à l'intérieur des cellules.



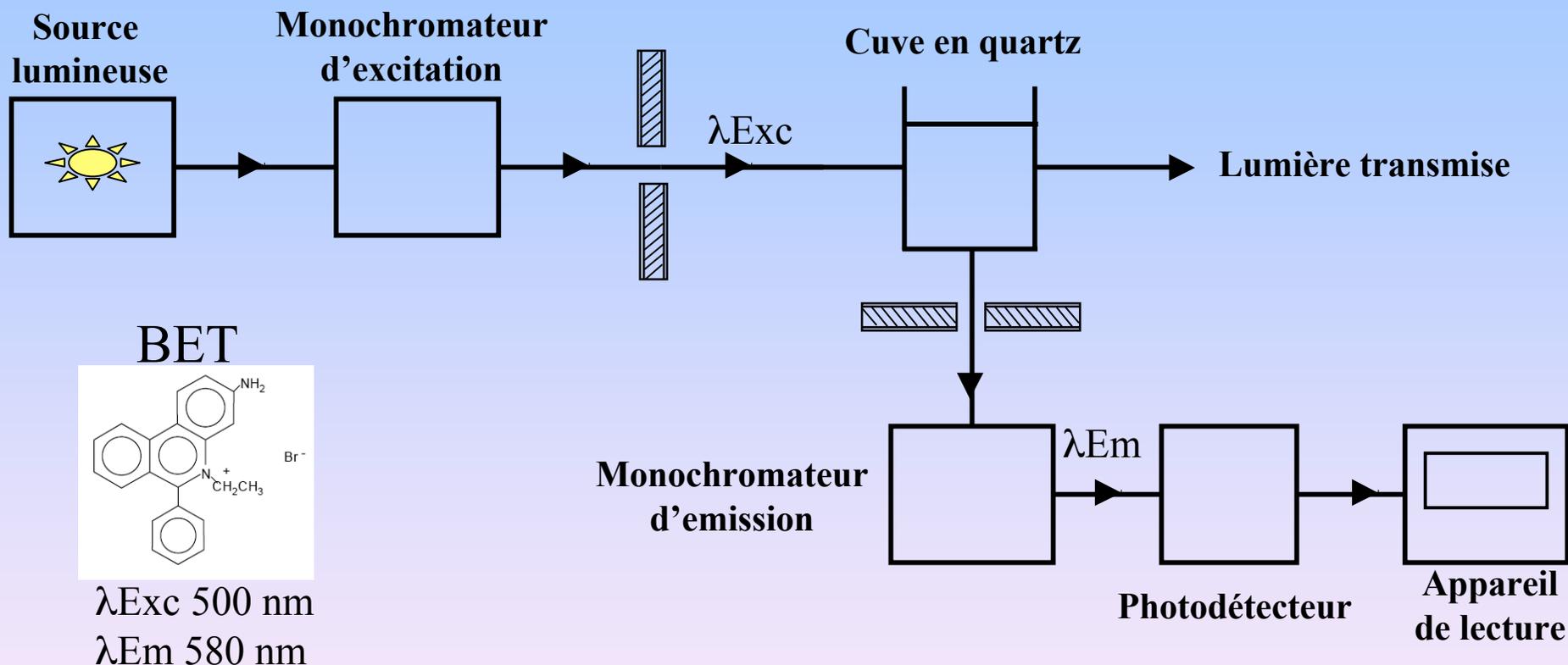
L'activité de transport (ici l'efflux)  
sera quantifiée par mesure de la fluorescence  
intracellulaire résiduelle



$\lambda_{\text{Exc}}$  500 nm

$\lambda_{\text{Em}}$  580 nm

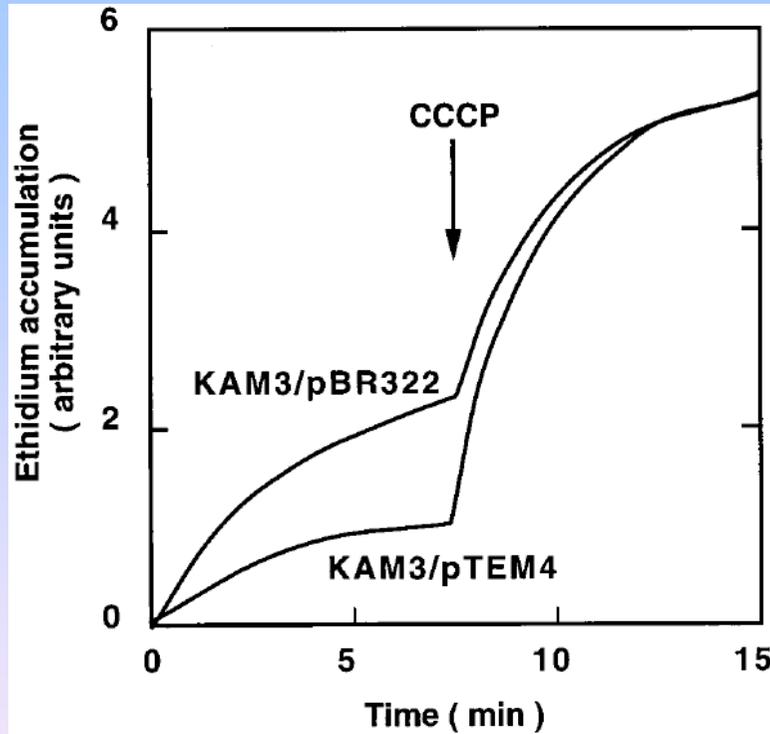
## Schéma de principe d'un spectrofluorimètre



Quand un rayonnement lumineux traverse une molécule organique. Une partie d'énergie de la lumière incidente est absorbée faisant passer un électron de son niveau fondamental à un niveau d'énergie supérieur instable (état excité). La molécule excitée perd cette énergie quand l'électron revient à son état fondamental. Ce retour s'accompagne d'émission de photon. Il se produit un phénomène appelé fluorescence qui dure quelques nanosecondes

# Résultat d'accumulation du BET

(Fig. 1)



## Expérience contrôle

1-Les cellules KAM3 exprimant le plasmide parental montrent un niveau d'accumulation du BET relativement faible en absence d'ionophore CCCP.

2-L'addition de l'ionophore (100  $\mu$ M, 7 min après) augmente le niveau d'accumulation du BET par les mêmes cellules.

**Cela indique que le potentiel électrochimique à  $H^+$  reste présent et fonctionnel dans les cellules KAM3**

3-En absence d'ionophore, Les cellules KAM3 exprimant le plasmide portant les gènes *mexXY* montrent un niveau d'accumulation du BET très faible en comparaison à l'expérience contrôle.

4-Après addition de CCCP l'accumulation du BET par les cellules exprimant *mexXY* augmente jusqu'à atteindre un niveau similaire à celui des cellules témoins (KAM/pBR322).

Protonophore CCCP (acide faible) est utilisé pour dissiper de manière sélective la différence du potentiel électrochimique créée de part et d'autre de la membrane par les ATPases à  $H^+$

## Conclusion 3:

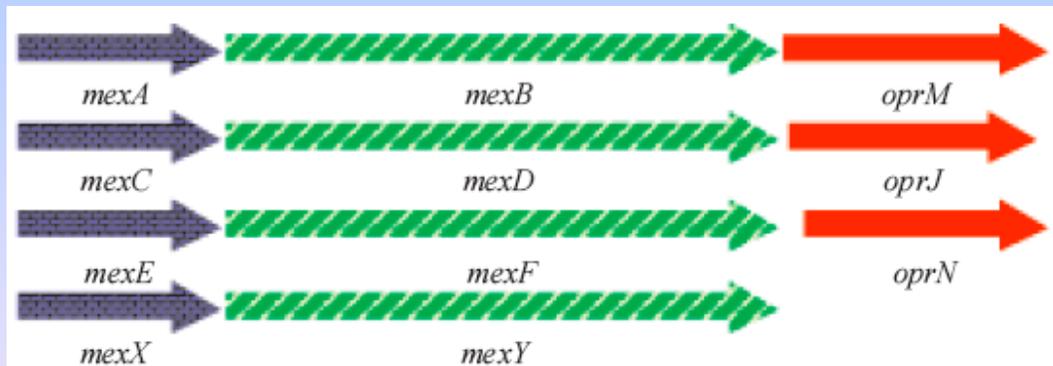
Les gènes *mexXY* confèrent aux cellules KAM3 la capacité d'efflux du BET dont l'énergie du transport dépend de la force proto-motrice.

## Thème III

### Reconstitution génique du système MexXY-TolC chez *E. coli*

Le système d'efflux MexXY possède une organisation génique particulière

Les systèmes homologues sont des systèmes d'efflux à trois composants (tripartite)



3<sup>ème</sup> partenaire des protéines MexXY ????

-Sachant que:

-En aval (1kb environ) des gènes *mexXY*, aucun autre gène n'a été identifié

-Système MexXY est fonctionnel chez *E. coli*.

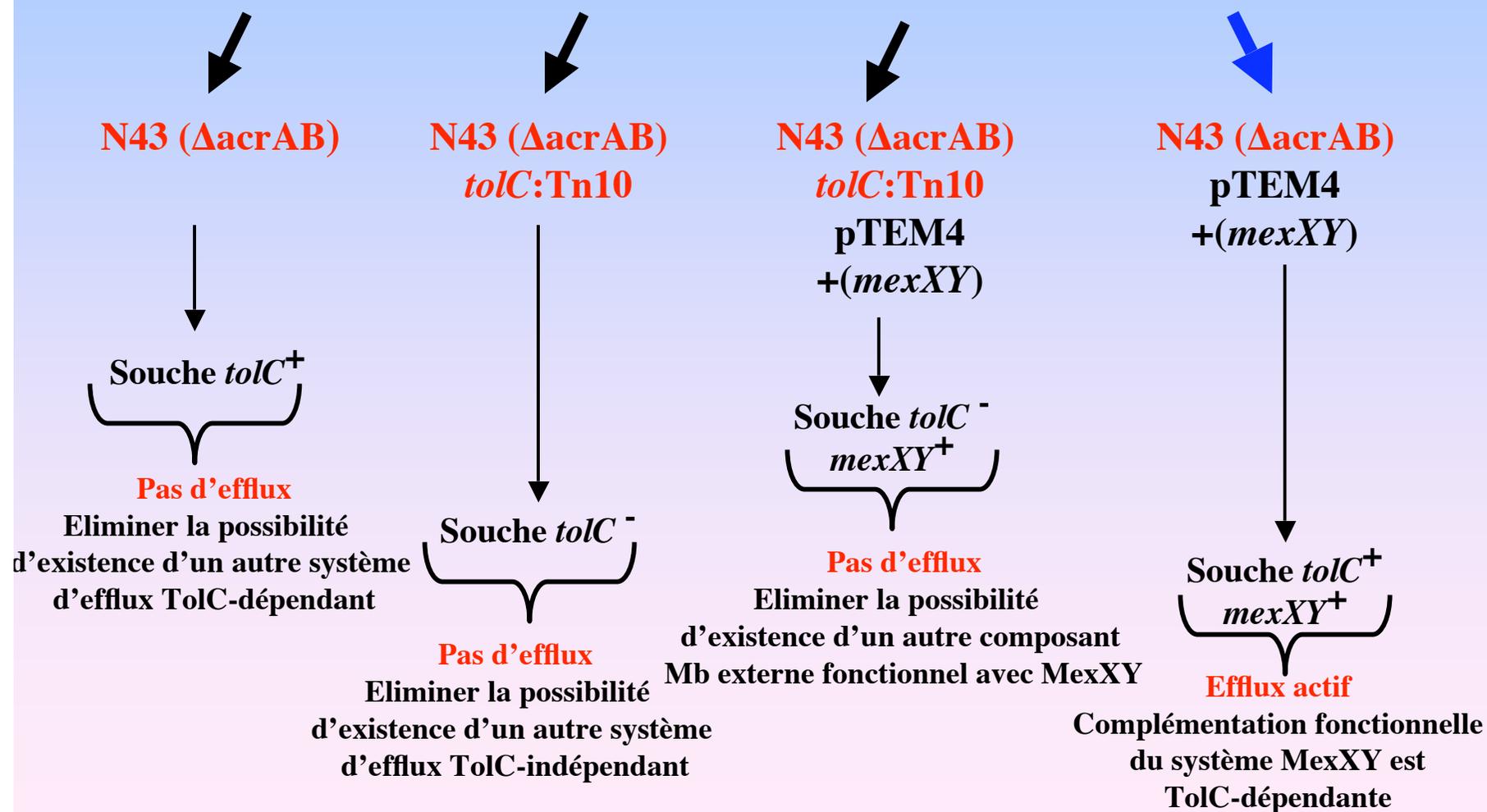
Question évidente: la protéine hétérologue TolC

(appartenant au système AcrAB-TolC) serait-elle 3<sup>ème</sup> partenaire ?

Si oui, comment peut-on vérifier notre hypothèse ??

● Reconstitution génique du système MexXY-TolC chez *E. coli*  
et mesure des CMI vis-à-vis différents agents anti-microbiens

Transformation des souches d'*E. coli*



↓  
**N43 ( $\Delta$ acrAB)**  
***tolC*:Tn10**  
pPMM2  
+(*oprM*)

↓  
Souche *tolC*<sup>-</sup>  
*oprM*<sup>+</sup>

**Pas d'efflux**  
Eliminer la possibilité  
d'existence d'un autre système  
d'efflux OprM-dépendant

↓  
**N43 ( $\Delta$ acrAB)**  
***tolC*:Tn10**  
pTEM4  
+(*mexXY*)

↓  
Souche *tolC*<sup>-</sup>  
*mexXY*<sup>+</sup>

**Pas d'efflux**  
Eliminer la possibilité  
d'existence d'un autre composant  
externe fonctionnel avec MexXY

**Co-transformation**  
**d'*E. coli***

↓  
**N43 ( $\Delta$ acrAB)**  
***tolC*:Tn10**  
pTEM4/pPMM2  
+(*mexXY*/*oprM*)

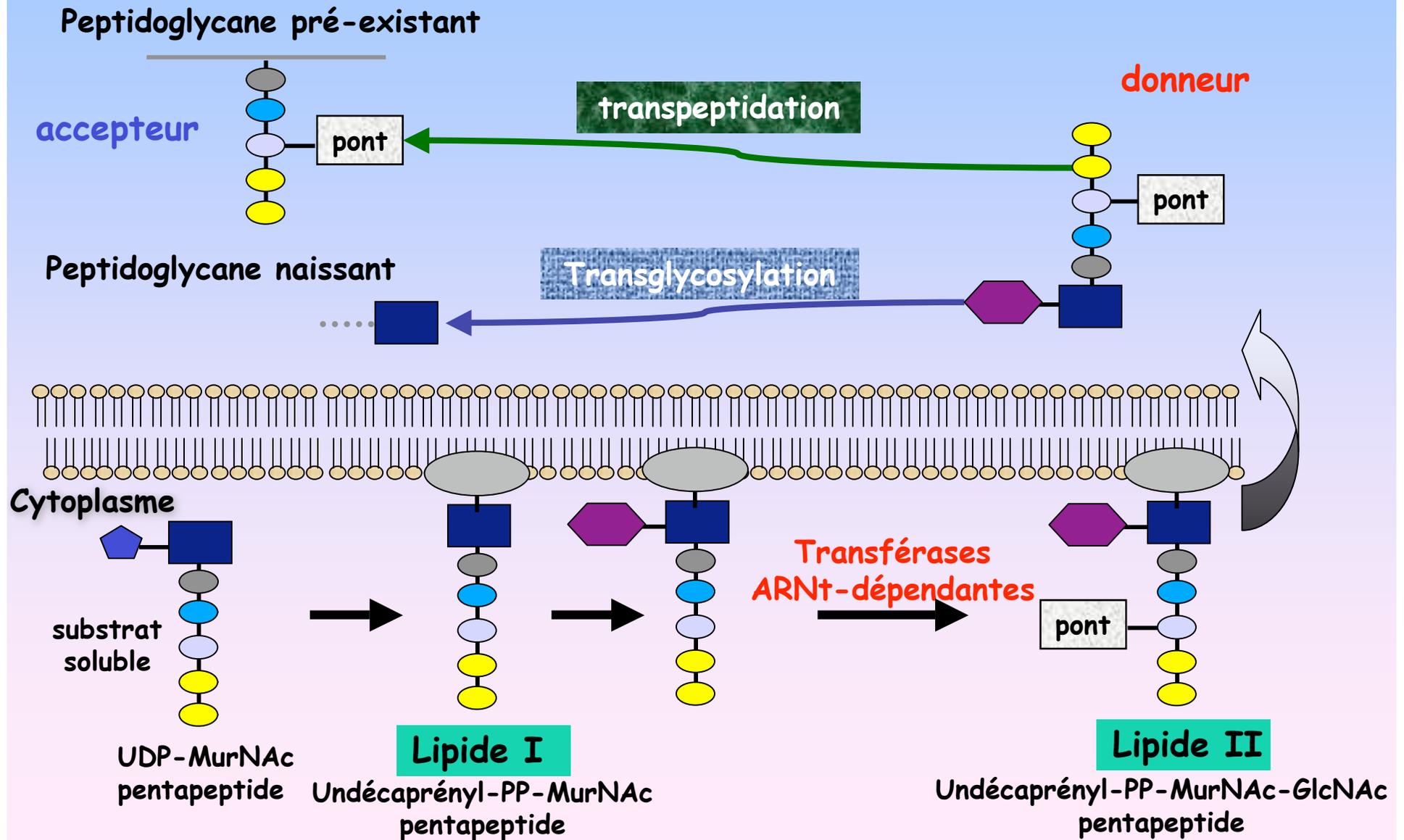
↓  
Souche *tolC*<sup>-</sup>  
*mexXY*<sup>+</sup> -*OprM*<sup>+</sup>

**Efflux actif**  
Complémentation fonctionnelle  
du système MexXY est  
OprM-dépendante

### Conclusion 5

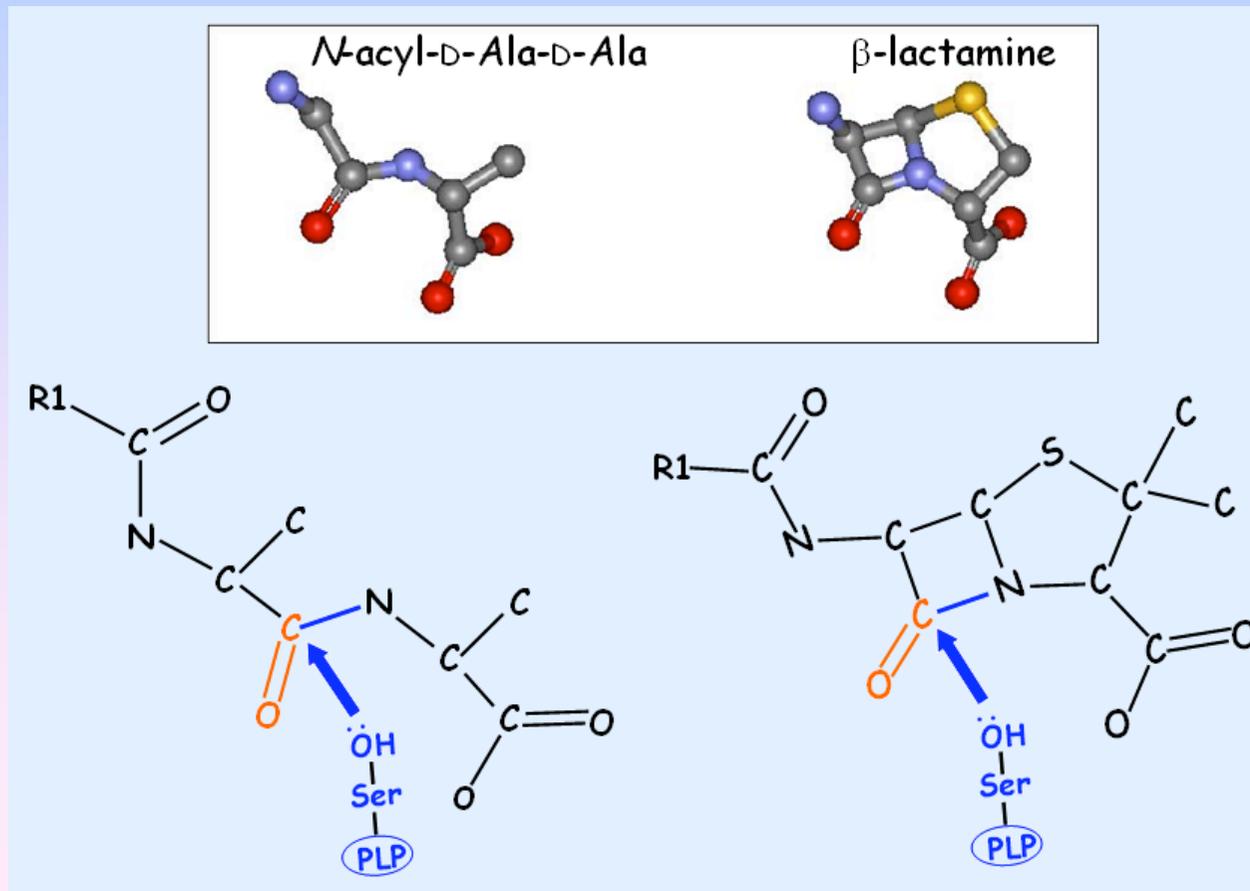
Le fonctionnement du système d'efflux MexXY nécessite la présence d'une troisième protéine TolC d'*E. coli* ou OprM de *P. aeruginosa*.

# Synthèse des précurseurs du peptidoglycane chez *Staphylococcus aureus*



# Cibles des $\beta$ -lactamines: Transpeptidases (Penicillin Binding Proteins= PBP)

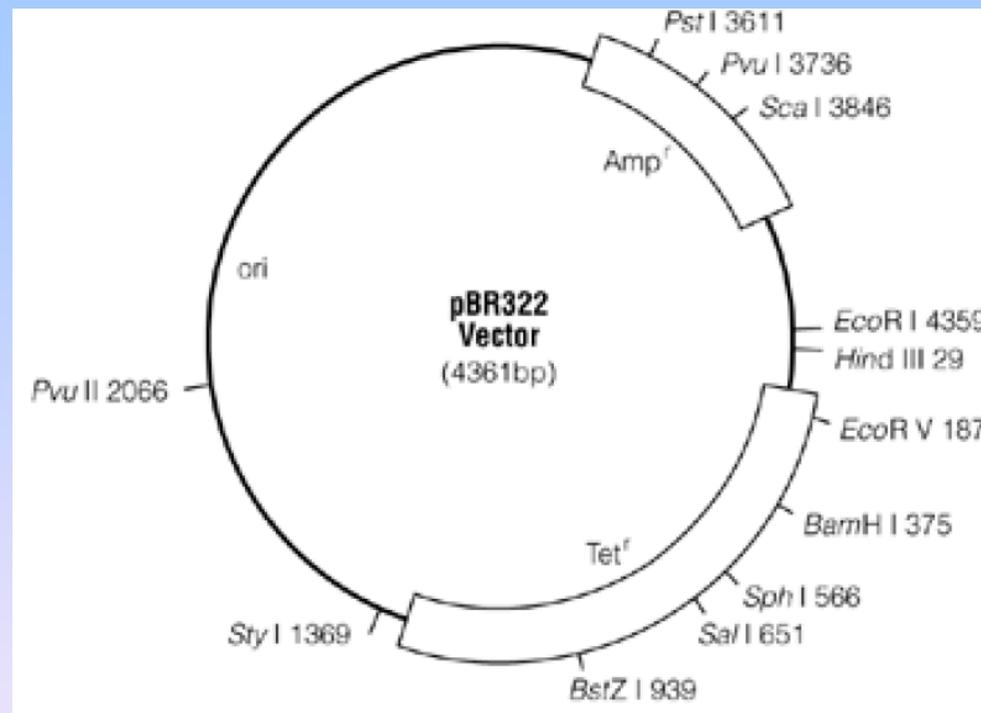
**Principe** : inhibition de la dernière étape de synthèse de la paroi bactérienne en mimant le substrat des PBP (



**Similarité  
structurale de la  
pénicilline et du  
peptide du  
peptidoglycane**

Découverte en 1928 de la  
pénicilline

1<sup>ère</sup> utilisation en 1941  
pour traiter un patient  
atteint de septicémie à  
staphylocoque



**1- Question: quelle est la fréquence théorique des sites Sau3A (NGATCN) dans le génome de la bactérie *P. aeruginosa* ?**

Réponse: la fréquence de coupure de l'ADN par une enzyme de restriction dépend de la taille du site reconnu. Si on considère un ADN possédant le même pourcentage de paire de bases (pb) AT que GC, et dont les pb sont réparties de façon aléatoire, la probabilité de trouver une paire de base A:T, T:A, G:C, C:G à une position donnée est la même égale à 1/4

Exemple:

BamHI:                   GGATCC  
                                  CCTAGG

G...1/4; G...1/4; A...1/4 ; T...1/4; C...1/4; C...1/4

La probabilité de rencontrer un site BamHI est  $1/4 \times 1/4 \times 1/4 \times 1/4 \times 1/4 \times 1/4 = 1/4096$

En moyenne, l'enzyme BamHI coupe l'ADN tous les 4096 nucléotides.

**Cas Sau3A: (NGATCN) N...1; G...1/4; A...1/4; T...1/4; C...1/4; N...1**

**La probabilité de rencontrer un site Sau3A est  $1 \times 1/4 \times 1/4 \times 1/4 \times 1/4 \times 1 = 1/256$**

**En moyenne, l'enzyme Sau3A coupe l'ADN tous les 256 nucléotides.**

Après digestion partielle par Sau3A, si on admet que la taille moyenne, des fragments d'ADN obtenus est de 7000 pb

**2- Question: dans les conditions choisies, sur 100 sites Sau3A, combien sont potentiellement digérés par l'enzyme ?**

Réponse: perte d'activité enzymatique d'un facteur  $F = 7000/256$   $F = 27,34$

 soit:  $100 / 27,34 = 3,65$  sites sur 100

Sachant que la taille du génome de *P. aeruginosa* fait  $6,3 \cdot 10^6$  pb.

**3-Question: combien de clones indépendants N sont nécessaires pour obtenir avec une probabilité  $P = 0.99$  un clone particulier ?**

Le nombre de clones indépendants N: dépend de la taille du génome G représenté dans la banque et de la taille moyenne des fragments clonés L (inserts).

N peut être déterminé avec la formule suivante

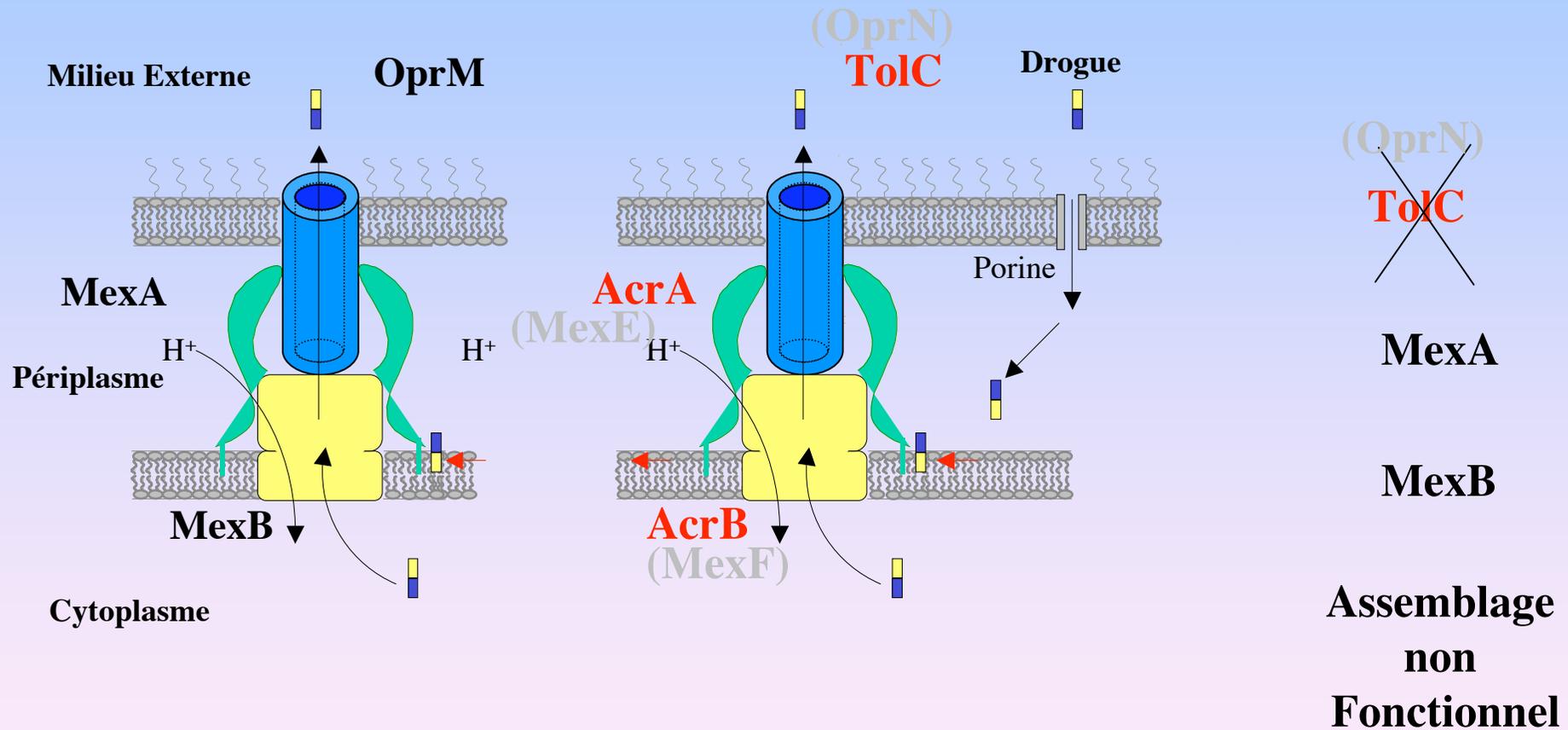
$$N = \frac{\log(1 - 0,99)}{\log(1 - L/G)}$$

$L = 7$  kpb

$G = 6,3 \cdot 10^3$  kpb

  $N = 4110$  clones

# Assemblage Fonctionnel et Spécificité d'Interaction Entre Composants de Pompes



**Mutagenèse Aléatoire sur TolC (OprN) & Recherche des Mutants de Gain de Fonction.**