

Université de Montréal

**Sélection et étude de peptides inhibiteurs multi-cibles
visant les Mur ligases chez *Pseudomonas aeruginosa***

par Larbi Mokhtari

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)
en microbiologie et immunologie

Décembre, 2017

© Larbi Mokhtari, 2017

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales dans le monde. Chez les personnes atteintes de fibrose kystique les infections pulmonaires causées par cette bactérie sont la principale cause de morbidité et de mortalité, et développer de nouveaux agents anti-pyocyaniques, capables de combattre efficacement et durablement ce pathogène, est aujourd'hui une nécessité si l'on veut améliorer la qualité et l'espérance de vie de ces personnes. Pour cela, le peptidoglycane fait partie des cibles privilégiées dans le développement d'agents antibactériens, étant donné le rôle essentiel de ce polymère dans la survie bactérienne. Les Mur ligases (MurC, MurD, MurE et MurF), une famille d'enzymes très similaires ayant un rôle essentiel dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane, ne sont aujourd'hui ciblées par aucun antibiotique et constituent des cibles prometteuses pour le développement d'agents antibactériens performants et durables qui cibleraient plusieurs d'entre elles. Dans cette étude, les Mur ligases de *Pseudomonas aeruginosa* ont été purifiées et utilisées comme cibles dans une stratégie innovante permettant de sélectionner des peptides ayant une affinité pour les 4 Mur ligases. Pour cela, deux banques peptidiques ont été criblées à l'aide d'une version optimisée de la technique de présentation phagique et 6 peptides sélectionnés ont été évalués pour leur affinité spécifique aux Mur ligases.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, fibrose kystique, peptidoglycane, Mur ligase, présentation phagique, peptides inhibiteurs, multi-cibles.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible of many nosocomial infections around the world. Among cystic fibrosis patients, lung infections caused by this bacterium are the major cause of morbidity and mortality and thus developing new antipyocyanic agents, capable to fight this pathogen in an efficient and sustainable manner, is now a necessity to improve the quality and the life expectancy of these patients. To realize this, the peptidoglycan is one of the best targets for the development of antibacterial agents given the essential role of this polymer in bacterial survival. The Mur ligases (MurC, MurD, MurE and MurF), a family of very similar enzymes that have an essential role in the peptidoglycan biosynthesis pathway, are today not targeted by any antibiotic and are promising targets for the development of effective and sustainable antibacterial agents that target several of them. In this study, the Mur ligases of *Pseudomonas aeruginosa* were purified and used as targets in an innovative strategy to select peptides with affinity for the four Mur ligases. For this purpose, two peptide libraries were screened using an optimized version of the phage display technique and six selected peptides were evaluated for their specific affinity for the Mur ligases.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, peptidoglycan, Mur ligase, phage display, antibacterial peptide, multi-target.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
1 Introduction.....	1
1.1 Revue de la littérature.....	2
1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.2 Fibrose kystique.....	9
1.1.3 Le Peptidoglycane.....	12
1.1.4 Les Mur ligases.....	21
1.1.5 Présentation phagique.....	27
1.2 Hypothèse et objectifs du projet.....	35
2. Matériel et méthodes.....	36
2.1 Construction des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4.....	37
2.2 Production des protéines recombinantes MurC-his10, MurD-his10, MurE-his10 et MurF-his10.....	51
2.3 Purification des protéines MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his.....	54
2.4 Sélection de peptides ayant une affinité pour les mur ligases par la technique de présentation phagique.....	58
2.5 Evaluation de l'affinité des peptides sélectionnés par ELISA.....	61
2.6 Statistiques.....	63
3. Résultats.....	64
3.1 Clonage des gènes <i>murC-his10</i> , <i>murD-his10</i> , <i>murE-his10</i> et <i>murF-his10</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1-l et PAO1-h dans un vecteur d'expression.....	65

3.1.1	Vérification de la transformation des produits de ligation par digestion analytique	65
3.1.2	Mutagenèse dirigée du plasmide pDL1	67
3.2	Surproduction des protéines MurF-his, MurE-his, MurD-his et MurC-his	69
3.2.1	Vérification de la surproduction	69
3.2.2	Optimisation des conditions de surproduction de MurC-his	71
3.3	Purification des Mur ligases.....	72
3.3.1	Purification de la protéine MurF-his.....	73
3.3.2	Purification de la protéines MurD-his.....	74
3.3.3	Purification de la protéine MurE-his.....	77
3.3.4	Purification de la protéine MurC-his	79
3.3.5	Vérification du taux de pureté et calcul de la concentration des 4 Mur ligases purifiées	81
3.4	Evaluation de l'efficacité et ajustement des conditions de la version optimisée de la technique de présentation phagique, dans le cadre de la sélection peptidique sur les Mur ligases.....	83
3.4.1	Pré élimination des peptides ayant une affinité avec le nickel	84
3.4.2	Évaluation de l'infectivité du phage M13 lié à plusieurs Mur ligases.....	86
3.4.3	Evaluation de l'efficacité des versions optimisées du tampon de lavage et de la méthode d'élution	89
3.4.4	Evaluation de l'effet du NaCl sur l'efficacité des lavages.....	91
3.4.5	Evaluation de la capacité de la méthode d'élution optimisée à éluer des peptides n'ayant pas pu être décrochés par la méthode d'élution classique	93
3.4.6	Evaluation de l'effet du tampon d'élution classique sur la viabilité du phage M13	95
3.5	Sélection de peptides ayant une affinité pour les protéines MurC, MurD, MurE et MurF à partir des banques peptidiques Ph.D.-12 et Ph.D.-C7C.....	96
3.6	Evaluation par ELISA de l'affinité des peptides sélectionnés pour les 4 Mur ligases ...	99
4.	Discussion.....	105
4.1	Clonage, production et purification des Mur ligases	107
4.2	Version optimisée de la technique de présentation phagique	108
4.3	Sélection et études de peptides ayant une affinité avec les Mur ligases.....	109

5. Conclusion et perspectives.....	111
Bibliographie.....	113

Liste des tableaux

Tableau I : Souches de <i>P. aeruginosa</i> utilisées pour ce projet.....	37
Tableau II : Conditions des PCR.....	38
Tableau III : Amorces utilisées (les sites de restrictions sont soulignées).....	39
Tableau V : Conditions de ligation.....	44
Tableau VI : Souches de <i>Escherichia coli</i> utilisées pour ce projet	45
Tableau VII : Milieux de culture et solutions utilisées	47
Tableau VIII : Plasmides utilisés et construits pour ce projet	49
Tableau IX : Banques peptidiques utilisées	59
Tableau X : Solutions de lavage et méthodes d'élution des phages.....	60

Liste des figures

Figure 1 : Représentation et observation au microscope des étapes de la formation d'un biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	5
Figure 2 : Résistance d'un biofilm aux antibiothérapies.	7
Figure 3 : Diagramme immunologique d'un biofilm.....	8
Figure 4 : Prévalence des infections respiratoires chez les patients fibrose-kystique en fonction de l'âge au Canada en 2013.	11
Figure 5 : Structure de l'enveloppe chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif.	13
Figure 6 : Structure et composition du peptidoglycane chez <i>P. aeruginosa</i>	14
Figure 7 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du PG chez <i>P. aeruginosa</i> ..	17
Figure 8 : Représentation schématique montrant les cibles de certains antibiotiques commerciaux sur la voie de biosynthèse du peptidoglycane bactérien.	20
Figure 9 : Assemblage du pentapeptide par les Mur ligases pour la formation du précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide.	21
Figure 10 : Représentation des structures tridimensionnelles de MurC, MurD, MurE et MurF	22
Figure 11 : Sélection de peptides par la technique de présentation phagique.	29
Figure 12 : Représentation de la structure protéique du phage M13.	32
Figure 13 : Cycle de vie des phages filamenteux.	34
Figure 14 : Carte du plasmide pTB345.....	42
Figure 15 : Principe de la technique ELISA pour évaluer l'affinité des peptides pour les 4 Mur ligases.....	63
Figure 16 : Sélection par digestion analytique des plasmides issus de la transformation des produits de ligation dans <i>Escherichia coli</i> DH5(α pir).	66
Figure 17 : Migration sur gel d'agarose des produits de PCR pour la mutagenèse dirigée de pDL1.	68
Figure 18 : Analyse par SDS-PAGE de la quantité relative de surproduction des 4 Mur ligases par les plasmides sélectionnés.	70
Figure 19 : Analyse par SDS-PAGE de la surproduction de la protéine MurC-his selon différentes conditions d'incubation et d'induction de la surproduction.	72

Figure 20 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine MurF-his.	74
Figure 21 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élutions obtenues lors de la purification de la protéine MurD-his.	76
Figure 22 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine MurE-his.	78_Toc506731051
Figure 23 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine MurC-his.	80
Figure 24 : Taux de pureté et concentrations des Mur ligases.....	82
Figure 25 : Principe de la méthode d'élution classique et de la méthode d'élution optimisée.	84
Figure 26 : Essai de pré élimination des peptides ayant une affinité avec le nickel.....	85
Figure 27 : Schéma explicatif résumant la problématique de l'infectivité du phage M13 lié à plusieurs Mur ligases.	87
Figure 28 : Infectivité du phage M13 selon le nombre de protéines MurF liées aux peptides.	88
Figure 29 : Evaluation de l'efficacité du tampon de lavage et d'élution optimisé.	90
Figure 30 : Evaluation de l'effet de la concentration en NaCl du tampon de lavage sur le nombre de phages élués.	92
Figure 31 : Evaluation de la capacité de la méthode d'élution optimisée à récupérer des peptides n'ayant pas pu l'être par la méthode d'élution classique.	94
Figure 32 : Evaluation de l'effet des tampons d'élution classique et optimisé sur la viabilité des phages M13.	96
Figure 33 : Stratégie utilisée pour l'isolation de peptides inhibiteurs multi-cibles qui visent les Mur ligases.....	97
Figure 34 : Titre phagique des éluats des rondes de présentation phagique sur les 4 Mur ligases.	98
Figure 35 : Evaluation par ELISA de l'affinité de 4 peptides sur les Mur ligases.	101
Figure 36 : Evaluation par ELISA de l'affinité des peptides 5 et 6 pour les Mur ligases.. ...	103

Liste des abréviations

% : pourcent

°C : degré Celsius

µl : microlitre

µM : micromolaire

5',3' : extrémité 5 prime, extrémité 3 prime

A : adénine

ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA : « ANalysis Of Variance »

ATP : adénosine triphosphate

BET : bromure d'éthidium

BSA : « Bovine Serum Albumin »

C : cytosine

CaCl₂ : chlorure de calcium

Da : Dalton

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ELISA : « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »

FK : fibrose kystique

Fwd : « forward »

G : guanine

Gram + : Gram-positif

Gram - : Gram-négatif

g : gramme, accélération de la pesanteur

GlcNAc : acide N-acétylglucosamique

H₂O : eau

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HCl : acide chlorhydrique

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

His : histidine

HRP : « horseradish peroxydase »

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

KCl : chlorure de potassium

KDa : kiloDalton

KH₂PO₄ : phosphate de monopotassium

L : litre

LB : Lysogeny Broth

LBamp : Lysogeny Broth contenant de l'ampicilline

M : molaire

Mg²⁺ : ion magnésium

MgCl₂ : chlorure de magnésium

ml : millilitre

mM : milli molaire

NaCl : chlorure de sodium

Na_2HPO_4 : hydrogénophosphate de sodium

NEB : « New England Biolabs »

ng : nanogramme

nm : nanomètre

pb : paire de base

PBS : « Phosphate-Buffered Saline »

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

PEG : polyéthylène glycol

pfu : « plaque-forming unit »

PG : peptidoglycane

pH : potentiel hydrogène

RBS : « Ribosome Binding Site »

SDS : « Sodium Dodecyl Sulfate »

SDS-PAGE : « Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis »

Sp. : espèce

T : thymine

TBE : Tris, Borate, EDTA

TBS : « Tris Buffered Saline »

TBST : « Tris Buffered Saline Tween20 »

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

Tris-HCl : Tris hydrochloryde

TSB : « Transformation Storage Buffer »

Und-P : undécaprényl-phosphate

Und-PP : Undécaprényl-pyrophosphate

UV : ultraviolet

V : Volt

WT : « Wild Type »

Xgal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

α : alpha

β : bêta

γ : gamma

λ : lambda

Pour ma mère qui m'a toujours soutenu et cru en moi.

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements aux personnes suivantes :

Au Dr. Catherine Paradis-Bleau qui m'a fait confiance et m'a accepté dans son laboratoire où j'ai bénéficié de tous les moyens nécessaires ainsi que de l'encadrement scientifique approprié pour la réalisation de ce travail de recherche.

Au Dr. Marc Drolet d'avoir co-dirigé ce travail et pour le soutien qu'il m'a prodigué lors de mes demandes de bourses et tout au long de la rédaction de ce mémoire.

Aux membres du jury, le Dr. Marylise Duperthuy et le Dr. Éric Déziel, d'avoir évalué et corrigé mon travail de manière pertinente.

A mon amie Imene pour son aide et ses conseils toujours pleins de sagesse.

A mes amis Sean, Rim, Marion et Nadia avec lesquels j'ai passé d'excellents moments et qui m'ont apporté, chacun à sa façon, beaucoup de soutien, d'encouragement et d'enjaillement.

A ma tante Hamida qui m'a accueilli les bras ouverts et sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

1 Introduction

1.1 Revue de la littérature

1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif, aérobie strict faisant partie du genre *Pseudomonas*. C'est un pathogène opportuniste possédant une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et qui est à l'origine d'un grand nombre d'infections chez l'homme [1, 2]. Ces infections sont particulièrement importantes en milieu hospitalier chez les patients immunodéprimés où *P. aeruginosa* représente une des causes majeures d'infections nosocomiales [3, 4]. En effet, ce microorganisme ubiquitaire, présent dans divers milieux environnementaux tel que les sols et les milieux aqueux, est capable de survivre dans des milieux nutritionnels minimaux et d'endurer de nombreuses conditions physicochimiques qui lui permettent de persister dans les milieux domestiques et hospitaliers. A l'hôpital, *P. aeruginosa* peut être isolé à partir de nombreuses sources incluant les équipements d'inhalothérapie, les antiseptiques, le savon ou même les médicaments [5]. Les réservoirs de cette bactérie dans la société sont divers et nombreux et peuvent être les piscines, les lave-linges, les bains à remous, les solutions de lentilles de contact, les humidificateurs d'air ou les légumes [5-7]. Ainsi, du fait de sa forte capacité d'adaptation et de survie dans des milieux hostiles et de sa résistance naturelle à de nombreux agents antibactériens, *P. aeruginosa* représente un défi thérapeutique majeur dans le soin des infections nosocomiales [8, 9].

1.1.1.1 Infections nosocomiales par *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie qui fait rarement partie de la flore microbienne chez l'humain, même si de très faibles quantités peuvent être retrouvées sur la peau, la muqueuse nasale, la gorge ou dans des prélèvements fécaux [10]. Cependant, le taux de colonisation peut dépasser les 50% durant une hospitalisation [5] et cela en particulier chez les patients immunodéficients [5, 10] ou les patients dont la barrière cutanée a été rompue par un respirateur artificiel, une trachéotomie, un cathéter, une chirurgie ou des brûlures sévères [1, 11-15]. Parmi les nombreuses infections en milieu hospitalier causées par ce pathogène opportuniste, les infections au niveau des voies respiratoires représentent la plus grande menace de santé publique avec de forts taux de morbidité et de mortalité associés. En effet, *P. aeruginosa* est une des

causes principales de pneumonies nosocomiales [3, 4] et d'infection des poumons chez les patients atteints de fibrose kystique [16].

1.1.1.2 Résistance intrinsèque de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie naturellement résistante à plusieurs classes d'antibiotiques [1, 2]. En effet, au-delà des résistances acquises par des éléments génétiques mobiles, ce pathogène opportuniste possède une résistance intrinsèque à plusieurs agents antibactériens, cela grâce à la présence d'une membrane externe peu perméable à l'entrée de plusieurs antibiotiques, la production d'enzymes d'inactivation et un système d'efflux performant [17]. Ces résistances intrinsèques rendent la sélection de l'antibiotique à utiliser une étape essentielle dans le traitement des infections par *P. aeruginosa* [18], même si cette sélection ne permet pas toujours de combattre efficacement ce pathogène. En effet, il n'est pas rare que cette bactérie acquière de nouvelles résistances au cours du traitement d'une infection [19, 20].

- Perméabilité de la membrane externe

La membrane externe de *P. aeruginosa* est une barrière imperméable à l'entrée de nombreux antibiotiques. En effet, sa membrane externe est 100 fois moins perméable à l'entrée d'agents antibactériens comparé à celle de *Escherichia coli* [21]. Cette faible perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* est le résultat combiné de porines non totalement ouvertes et/ou fonctionnelles, limitant l'entrée des petites molécules hydrophiles tel que les β -lactamines et les quinolones [22, 23], et de LPS qui bloquent l'entrée de nombreux antibiotiques incluant les β -lactamines [24], les quinolones [25] ou les aminosides [26-28].

- Pompes à efflux

P. aeruginosa possède un système d'efflux efficace caractérisé par l'expression constitutive et inductible de pompes à efflux capables d'expulser un nombre important d'agents antibactériens entrés dans la cellule. Ces pompes à efflux énergie-dépendantes sont un élément important de la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* car une fois surexprimées, elles permettent d'expulser de nombreuses classes d'antibiotiques à partir du cytoplasme ou du périplasme vers l'extérieur de la cellule bactérienne, lui conférant ainsi une résistance à ces derniers [29-32].

- Enzymes d'inactivation

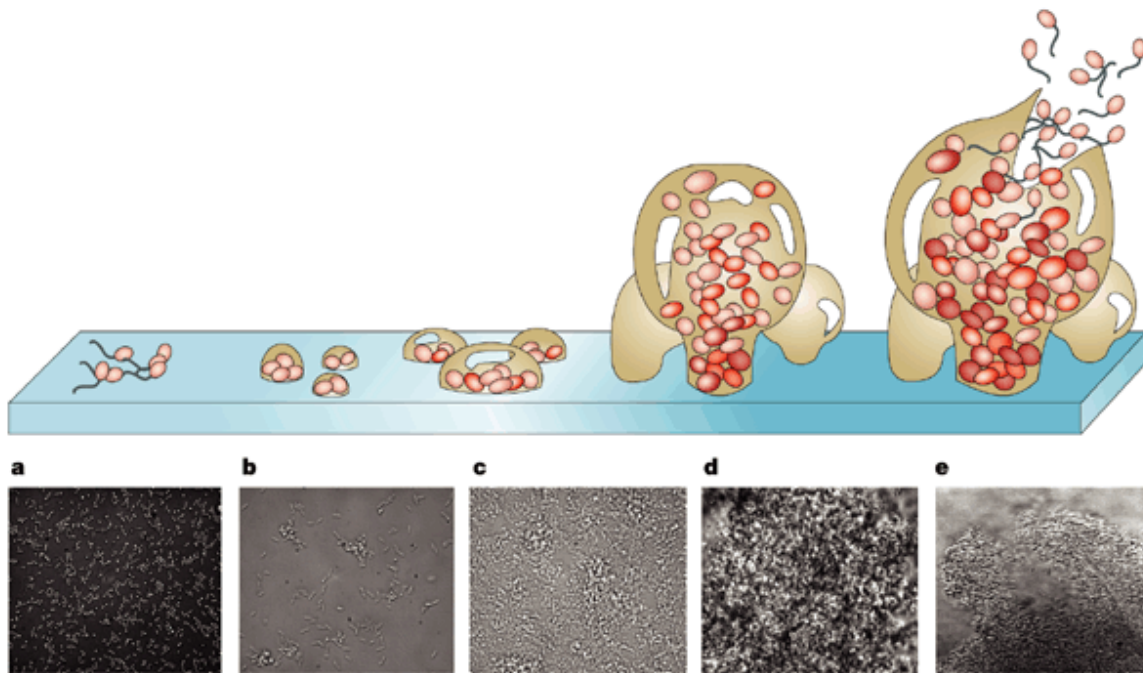
P. aeruginosa produit plusieurs enzymes d'inactivation d'agents antibactériens. Ce sont principalement des β -lactamases, enzymes qui hydrolysent les β -lactamines, dont au moins 120 types ont été observés chez ce pathogène [33, 34].

1.1.1.3 Organisation en biofilm

La persistance et les difficultés rencontrées lors du traitement d'infections causées par *P. aeruginosa* est en grande partie due à sa capacité à former et à s'organiser en biofilms [35]. Les biofilms sont des communautés structurées de microorganismes formant des colonies sur une surface biologique ou non biologique et entourées d'une matrice extracellulaire. Cette matrice autoproduite par les cellules est composée de biopolymères (protéines, polysaccharides et ADN extracellulaire) et est traversée par des canaux hydrauliques qui assurent la diffusion de l'oxygène, des nutriments et des métabolites secondaires [36-38]. Sous cette forme, ces microorganismes possèdent des caractéristiques physiologiques particulières ; ils deviennent moins sensibles aux réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte infecté, et montrent une plus grande tolérance aux antibiotiques que les cellules sous forme planctoniques [39, 40].

- Etapes de la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa*

La formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* est initiée par l'attachement réversible de cellules sous forme planctonique à une surface biologique ou non biologique (Figure 1). Les bactéries se multiplient alors et forment des micro colonies qui s'entourent entièrement d'une matrice extracellulaire composée de polysaccharides ce qui rend leur attachement à la surface irréversible. A partir de là, les colonies vont continuer à se multiplier et fusionner pour former une couche de plus en plus épaisse jusqu'à la formation d'un biofilm « mature ». A ce stade, des cellules planctoniques sont libérées du biofilm et propagent l'infection en s'attachant à d'autres surfaces afin de former de nouveaux biofilms, un phénomène appelé auto-dispersion [41].



Nature Reviews | Drug Discovery

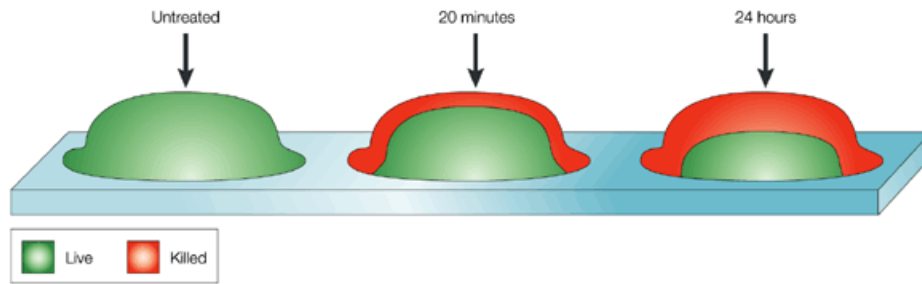
Figure 1 : Représentation et observation au microscope des étapes de la formation d'un biofilm par *P. aeruginosa*. La formation et la maturation d'un biofilm est un processus en plusieurs étapes. (A) Attachement réversible de quelques cellules planctoniques à une surface. (B) Formation de micro colonies qui s'entourent d'une matrice extracellulaire dont l'attachement à la surface devient irréversible. (C) Les micro colonies grandissent et continuent de s'entourer d'alginate. (D) Fusion des micro colonies et formation d'un jeune biofilm. (E) Formation d'un biofilm mature qui relâche des cellules planctoniques capables de former des biofilms sur d'autres surfaces. Figure tirée de de Davies, D. 2003. [42] avec l'autorisation de l'éditeur (licence d'exploitation n° 4224990186384).

- Caractéristiques cliniques des infections par les biofilms et les mécanismes associés

Les cellules faisant partie d'un biofilm sont capables de communiquer entre elles au moyen de molécules de signalisation (quorumones), phénomène appelé *quorum sensing*. C'est un système qui permet aux bactéries de communiquer entre elles afin d'estimer leur densité de population et de s'adapter à leur microenvironnement selon leur nombre et la diversité d'espèces présentes. Cela passe par l'activation de certains gènes tels que ceux codants pour des facteurs de virulence, des hydrolases spécifiques à certains agents antibactériens ou des pompes à efflux [43-47]. Les biofilms représentent également une barrière physique aux agents antimicrobiens qui sont alors

incapables de pénétrer l'ensemble de l'épaisseur du biofilm. En effet, la matrice polymérique autour des cellules empêche la diffusion complète des antibiotiques (Figure 2) ce qui rend extrêmement difficile l'élimination totale de biofilms lors d'infections [48-51]. De plus, les cellules composant le biofilm se développent lentement ce qui diminue davantage l'efficacité des agents antibactériens du fait de la faible activité métabolique de ces cellules, activité qui décroît graduellement de l'extérieur vers l'intérieur du biofilm [52-54]. Les antibiothérapies permettent généralement de combattre les cellules planctoniques relâchées des biofilms et donc leur dissémination mais ne permettent pas leur élimination totale [55]. Pour cette raison, les symptômes faisant suite aux infections par les biofilms apparaissent de manière récurrente après chaque cycle d'antibiothérapie, et les biofilms ne sont éliminés qu'après leur ablation par chirurgie [56]. Au niveau immunitaire, les infections par des biofilms sont rarement éliminées par les mécanismes de défense de l'hôte, et cela malgré la force des réponses humorales et cellulaires [57]. De plus, les bactéries immobiles au sein d'un biofilm relâchent des antigènes qui stimulent la production d'anticorps inefficaces contre eux et qui endommagent les tissus environnants en créant un complexe immunitaire (Figure 3) [46, 58].

Chez *P. aeruginosa*, la formation de biofilms est la cause majeure de la persistance des infections et de morbidité chez les patients [59] et cela est particulièrement vrai dans le cas des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de fibrose kystique [60].



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 2 : Résistance d'un biofilm aux antibiothérapies. Cette représentation montre que le traitement aux antibiotiques ne permet d'éliminer que la partie supérieure du biofilm, laissant les bactéries en profondeur agir comme un noyau pour la dissémination de l'infection après une antibiothérapie. Figure tirée de Davies, D. 2003. [42] avec l'autorisation de l'éditeur (licence d'exploitation n° 4224990186384).

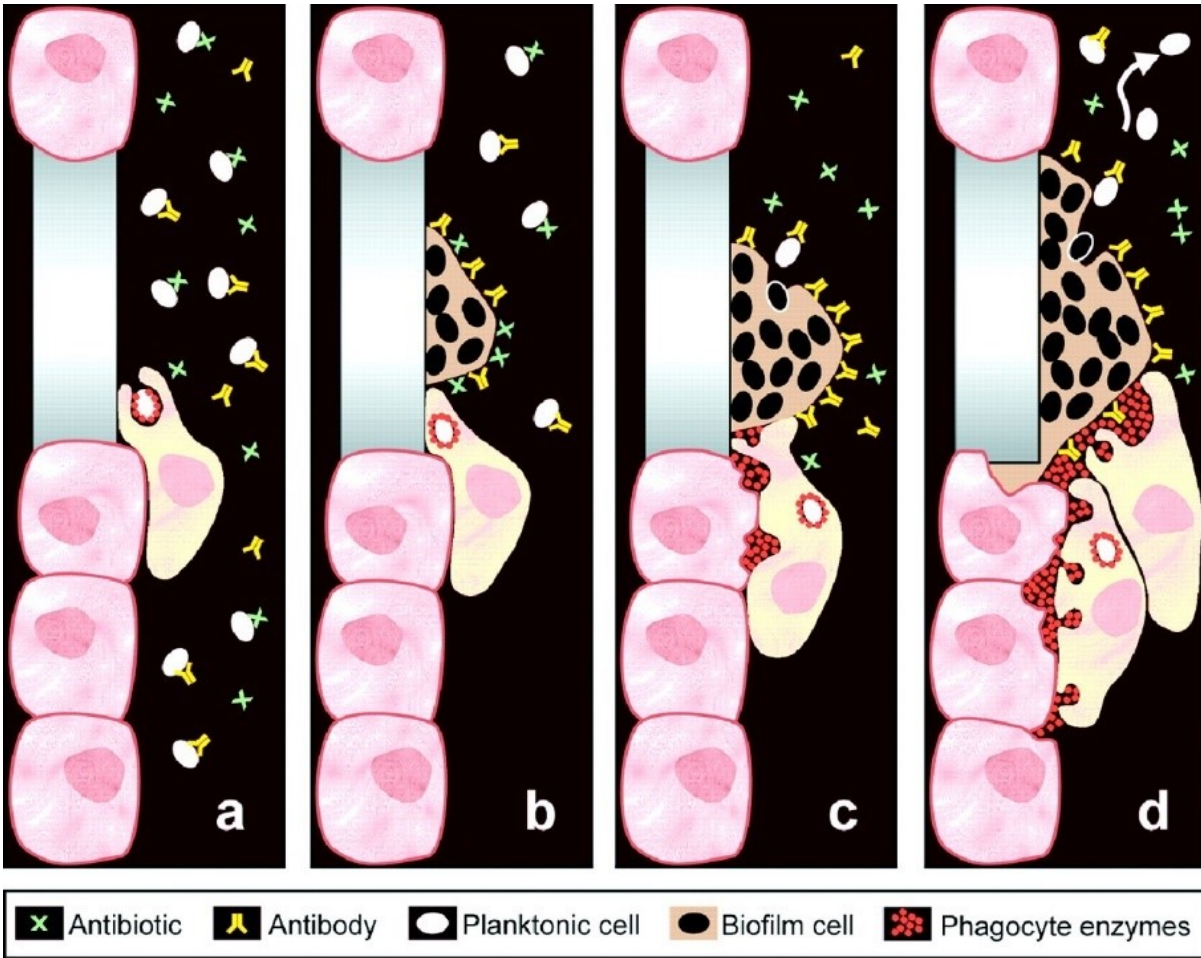


Figure 3 : Diagramme immunologique d'un biofilm. (A) Les bactéries sous forme planctonique sont sensibles aux antibiotiques et peuvent être éliminées par phagocytose et attachement d'anticorps. (B) Les bactéries adhèrent et forment des biofilms préférentiellement sur des surfaces inertes. Ces communautés à l'état sessile sont résistantes à la phagocytose, aux anticorps et aux antibiotiques. (C) Les cellules phagocytaires sont attirées vers les biofilms sans pouvoir phagocyter les bactéries, mais relâchent quand même des enzymes de phagocytose. (D) Les enzymes de phagocytose dégradent les tissus aux alentours du biofilm résultant en la libération de bactéries planctoniques, qui disséminent l'infection. Figure tirée de Costerton, JW. et al, 1999. [61] avec l'autorisation de l'éditeur (licence d'exploitation n° 4233290624006)

1.1.2 Fibrose kystique

1.1.2.1 Physiopathologie de la fibrose kystique

La fibrose kystique (FK), également appelée mucoviscidose, est une maladie monogénique à transmission autosomique récessive caractérisée par une hyperviscosité des sécrétions épithéliales dans de nombreux organes causant des dysfonctionnements dans ces derniers. Cette maladie est causée par des mutations dans le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) sur le chromosome 7 résultant en une altération du fonctionnement de la protéine du même nom [62]. CFTR est un canal ionique qui régule l'excrétion des ions chlorure et bicarbonate dans les cellules épithéliales [63]. En régulant la sécrétion de ces deux anions ainsi que celle d'autres canaux ioniques associés, CFTR hydrate et tamponne les sécrétions liquides des cellules épithéliales de plusieurs organes incluant les intestins, le pancréas, les poumons, les reins et les glandes sudoripares [64]. C'est l'altération ou la perte de la fonction de cette protéine qui cause la FK [65]. Les personnes atteintes de fibrose kystique sont souvent victimes d'une insuffisance pancréatique exocrine [66], d'une augmentation de la concentration de NaCl dans la sueur [67], d'infertilité masculine [68] mais surtout de problèmes au niveau des voies respiratoires accompagnés d'infections chroniques bactériennes pulmonaires, qui sont la cause majoritaire de morbidité et de mortalité chez ces personnes [69]. Bien que l'espérance de vie des individus atteints de FK ait considérablement augmenté au cours des trente dernières années, à terme les patients succombent à la suite des nombreuses complications liées à cette pathologie [70, 71].

1.1.2.2 Infections pulmonaires chez les personnes atteintes de FK

Les troubles respiratoires sont la cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de FK dans 80 à 95% des cas [72]. Ces troubles sont le résultat d'un cercle vicieux d'infections bactériennes chroniques au niveau des poumons qui engendrent des réponses immunitaires inflammatoires, dominées par les neutrophiles, qui dégradent alors les cellules épithéliales pulmonaires. Cette dégradation engendre alors une obstruction progressive des poumons chez les malades qui au bout du compte meurent d'insuffisance respiratoire [73, 74]. Ces infections bactériennes pulmonaires apparaissent dès l'enfance chez les patients fibrose kystique (PFK).

Si au début ces infections arrivent à être combattues par des antibiothérapies, plus tard cependant, les bactéries colonisent de manière permanente les voies respiratoires. Cette colonisation est probablement le résultat de la baisse de sécrétion des ions chlorure par la protéine CFTR et de l'augmentation de la réabsorption de sodium dans les épithéliums des voies respiratoires. Cela mène à une réduction de la teneur en eau des sécrétions ainsi qu'une diminution de liquides péri-ciliaires facilitant alors l'adhérence des bactéries inhalées, ce qui ralentit leur élimination [75-78].

- Chronologie des infections pulmonaires chez les patients FK

Pendant l'enfance, les PFK sont principalement infectés par les pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* [79] (Figure 4). Avec l'âge cependant, et suite à la dégradation des cellules épithéliales pulmonaires consécutive aux réponses immunitaires inflammatoires répétées, *P. aeruginosa* devient la principale cause d'infections pulmonaires chez ces patients (Figure 4). Ce pathogène va alors persister et s'organiser en formant des biofilms, un évènement qui marque l'accélération du déclin des fonctions pulmonaires chez les PFK.

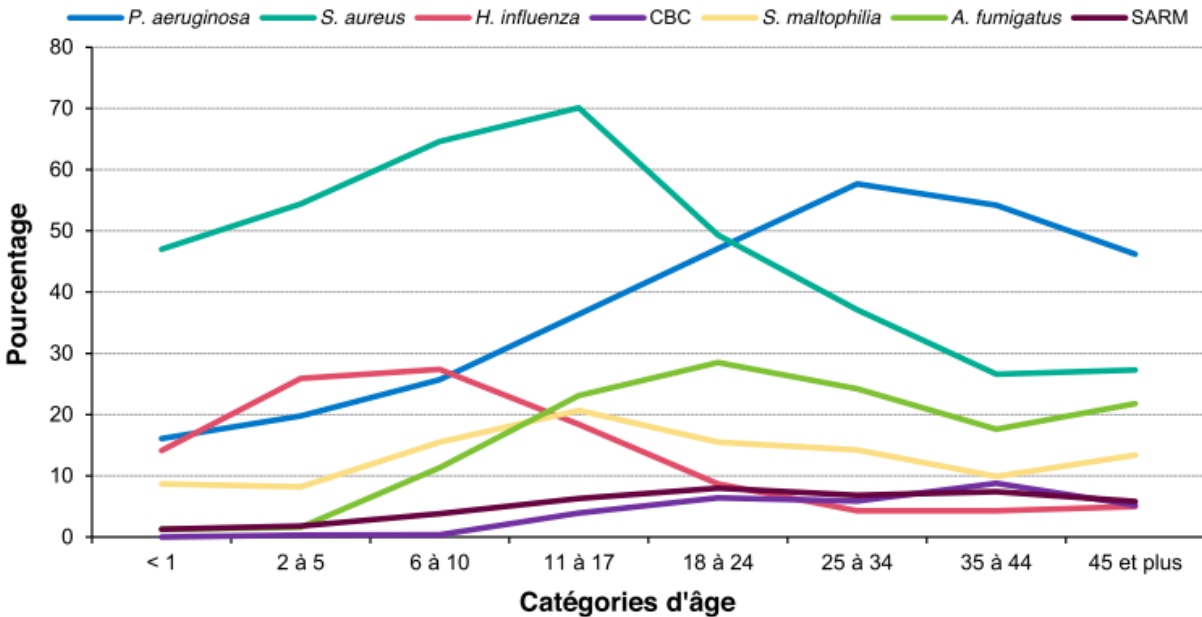


Figure 4 : Prévalence des infections respiratoires chez les patients fibrose-kystique en fonction de l'âge au Canada en 2013. De la petite enfance jusqu'à l'adolescence, le profil des pathogènes qui infectent les poumons des PFK est largement dominé par *Staphylococcus aureus*. La proportion de *P. aeruginosa* augmente tout au long de la vie des patients jusqu'à devenir le principal agent infectieux à partir de la fin de l'adolescence et pour le reste de leur vie. Figure tirée du rapport annuel du Registre canadien sur la fibrose kystique, 2015. [80] avec l'autorisation de Fibrose kystique Canada.

- Caractéristiques cliniques de *P. aeruginosa* chez les PFK

Les premières infections par ce pathogène opportuniste sont détectables dès la première année de vie chez les patients, et ne cesse d'augmenter au cours du temps, jusqu'à devenir la cause principale d'infection (Figure 4). Si au début, sa progression arrive à être contenue grâce aux antibiotiques, avec le temps cependant la plasticité génétique et phénotypique de ce pathogène lui permet de s'adapter et de s'établir durablement résultant en une infection persistante [81]. Les souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK adultes sont phénotypiquement assez distinctes, et présentent des caractéristiques différentes de celles qui colonisent les poumons des patients plus jeunes. Alors que les souches isolées chez les enfants sont assez similaires à celles isolées dans l'environnement, les souches isolées chez les patients adultes présentent une résistance accrue aux antibiotiques et sont souvent de type mucoïde et donc plus aptes à former des biofilms [82, 83]. D'autres changements phénotypiques ont également été observés dans les

isolats des patients adultes tel que la perte de l'antigène O du LPS rendant la souche indétectable par sérotypage [84], une modification dans l'acylation de LPS [85] augmentant la réponse immunitaire inflammatoire [86], une augmentation de l'auxotrophie [87], une mobilité flagellaire réduite ainsi qu'une résistance accrue à la phagocytose par les macrophages [88]. Tous ces changements phénotypiques sont le résultat de la forte capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* et de son organisation en biofilms qui permet à ces bactéries de coloniser les poumons durablement en résistant davantage aux antibiotiques et aux mécanismes de défense immunitaire. Ainsi, *P. aeruginosa* représente la plus grande menace pour patients atteints de FK. Trouver un moyen de combattre ce pathogène plus efficacement est donc devenue une nécessité.

1.1.3 Le Peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est un polymère biologique formant une couche protectrice et fonctionnelle autour de la plupart des bactéries. Cette couche qui entoure l'ensemble de la cellule est le principal composant structurel de l'enveloppe bactérienne. Elle lui offre la rigidité, la flexibilité et la force mécanique nécessaire afin de croître et de se diviser tout en maintenant sa forme et sa résistance à la pression osmotique [89, 90]. En effet, une perturbation lors de son assemblage provoque l'affaiblissement de la paroi bactérienne et la lyse subséquente de la bactérie [91]. Chez les bactéries à Gram positif, cette couche est épaisse et se situe au-dessus de la membrane plasmique, en contact direct avec le milieu extra cellulaire, alors que chez les bactéries à Gram négatif cette couche est plus fine et se situe dans l'espace périplasmique entre la membrane interne et la membrane externe de la cellule (Figure 5) [92].

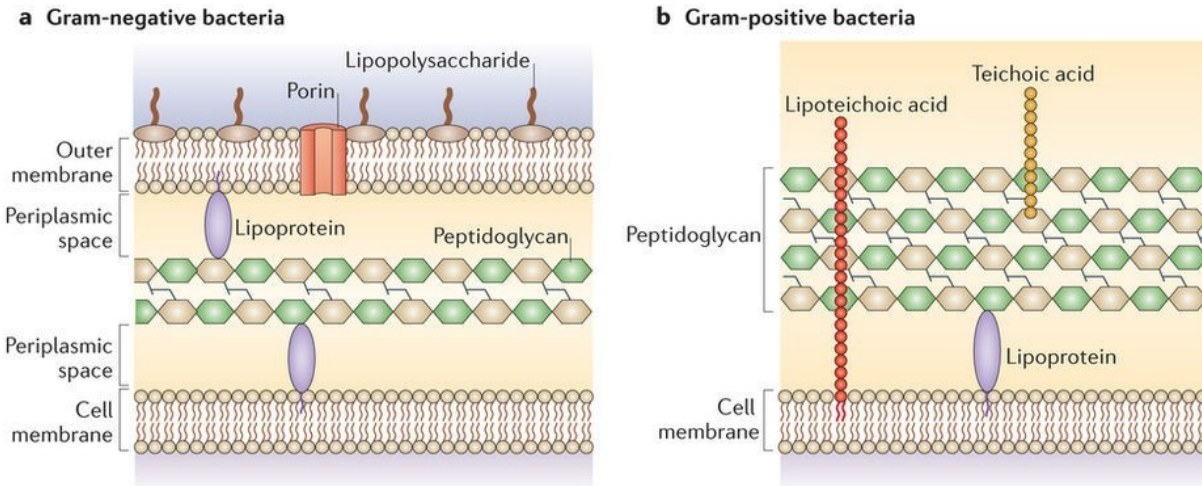


Figure 5 : Structure de l’enveloppe chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif. (A) Le peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif forme une couche mince dans l’espace périplasmique entre la membrane interne et la membrane externe de la bactérie. (B) La couche de peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif est épaisse et exposée à l’espace extracellulaire au-dessus de la membrane plasmique. Figure adaptée Brown, L. et al, 2015. [93] avec l’autorisation de l’éditeur (licence d’exploitation n° 4226031126877)

1.1.3.1 Structure et composition du peptidoglycane chez *P. aeruginosa*

Chez la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa*, le peptidoglycane est un hétéropolymère complexe composé de longues chaînes de glycane reliées entre elles par des tétrapeptides et formant un réseau dense et réticulé au niveau de l’espace périplasmique. Ces chaînes de glycane sont formées par l’alternance de deux sucres : l’acide N-acetylglucosamine (GlcNAc) et l’acide N-acetylmuramique (MurNAc), reliés entre eux par des liaisons osidiques de type $\beta 1 \rightarrow 4$. Chaque résidu MurNAc est relié à un tétrapeptide composé des acides aminés L-alanine, D-glutamate, acide diaminopimélique (mA2pm) et D-alanine, qui se lie au tétrapeptide d’un autre résidu MurNAc par liaison peptidique entre l’acide aminé D-alanine du premier peptide et l’acide diaminopimélique du deuxième peptide (Figure 6) [90, 94].

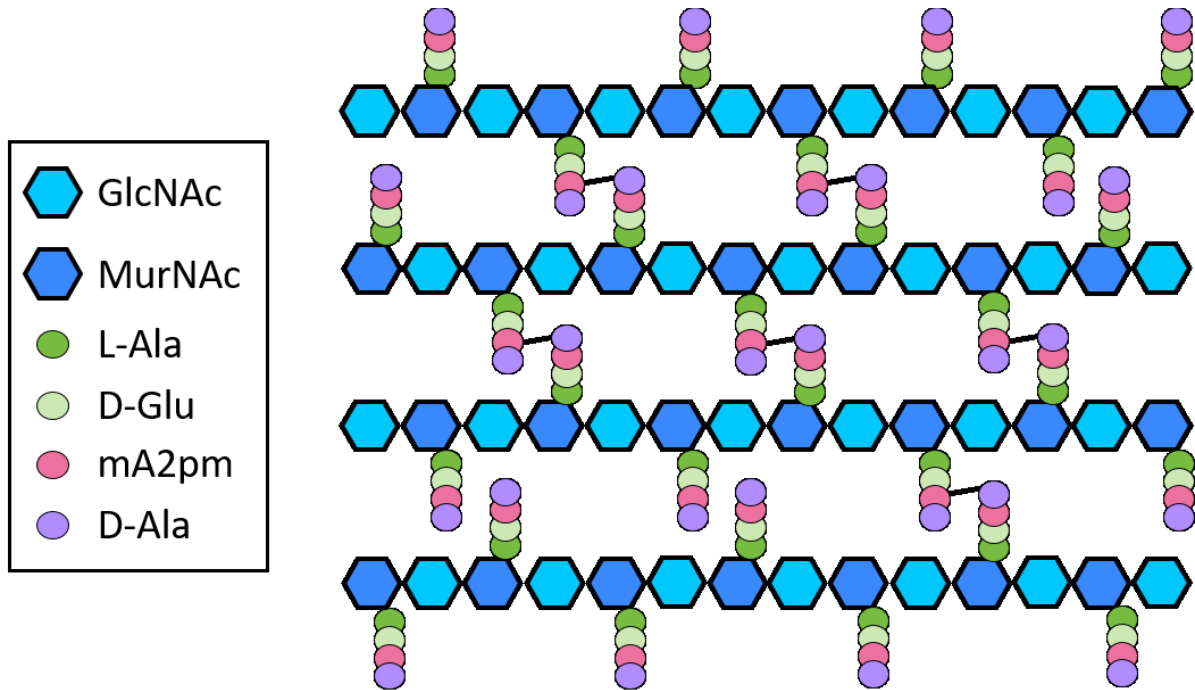


Figure 6 : Structure et composition du peptidoglycane chez *P. aeruginosa*. La couche de peptidoglycane est un réseau de chaînes de glycane reliées entre elles par des liens peptidiques formés entre deux tétrapeptides portés par deux résidus MurNAc de deux chaînes différentes. La liaison peptidique est formée entre l'acide diaminopimélique et la D-alanine. Figure inspirée de Kouidmi, I. et al, 2014. [95].

1.1.3.2 Biosynthèse du peptidoglycane chez *P. aeruginosa*

La biosynthèse du peptidoglycane chez *P. aeruginosa* est un processus complexe et peut être subdivisée en trois étapes selon le compartiment cellulaire où elle se déroule : une étape cytoplasmique, une étape membranaire et une étape périplasmique [89].

- Etape cytoplasmique

La biosynthèse du peptidoglycane au niveau cytoplasmique implique l'intervention de plusieurs enzymes et aboutit à la formation du monomère UDP-MurNAc-pentapeptide. Cela commence par la synthèse du nucléotide UDP-GlcNAc qui fait suite à la transformation du fructose-6-phosphate par quatre réactions enzymatiques successives. Une fois le nucléotide UDP-GlcNAc synthétisé, ce dernier est alors transformé en UDP-MurNAc suite au transfert d'un résidu énolpyruvate sur son groupement 3'OH par la transférase MurA et la réduction de ce résidu en

D-lactate par la réductase MurB. Aussitôt le nucléotide UDP-MurNAc formé, cinq acides aminés sont ajoutés de manière séquentielle par quatre enzymes (MurC, MurD, MurE et MurF) appelées muramyl ligases (Mur ligases). Les ligases, MurC, MurD et MurE ajoutent respectivement dans l'ordre les acides aminés L-alanine, D-glutamate et l'acide diaminopimélique en formant des liaisons peptidiques entre eux. Enfin, le dipeptide D-alanine – D-alanine, formé par une D,D-ligase (Ddl), est ajouté au tripeptide par la ligase MurF en formant une liaison peptidique. [94, 96-100] (Figure 7).

- Etape membranaire

La deuxième étape de la biosynthèse du peptidoglycane est réalisée au niveau de la face interne de la membrane plasmique et va aboutir à la formation du lipide II, monomère constitutif du peptidoglycane. Ainsi, suite à la formation du précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide dans le cytoplasme, son groupement phosphate est transféré par la translocase MraY au transporteur lipidique undécaprényl-phosphate (Und-P) situé sur la face interne de la membrane plasmique ce qui aboutit à la formation du groupement phospho-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprényl appelé lipide I. Par la suite, la glycosyltransférase MurG lie un résidu GlcNAc en formant une liaison osidique avec le résidu MurNAc du lipide I pour former le lipide II (GlcNAc-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprényl). A ce moment, le lipide II est transloqué de la face interne vers la face externe de la membrane plasmique par une flippase et va constituer à cet emplacement l'unité de base pour l'assemblage du peptidoglycane.[90, 94, 96, 98, 101-103] (Figure 7).

- Etape périplasmique

Le périplasme est le compartiment cellulaire où se situe la couche de PG et où se déroule la dernière étape de sa biosynthèse. En effet, après que le lipide II soit transloqué vers le périplasme, les chaînes de glycane sont formées par des réactions de transglycosylation entre les lipides II, réactions catalysées par les *Penicillin Binding Protein* (PBP) qui assurent l'élongation de la chaîne de glycane. Pour cela, les PBP clivent le pont phosphodiester-MurNAc d'un lipide II afin de former un pont glycosidique avec le C-4 du résidu GlcNAc d'un autre lipide II nouvellement synthétisé. Subséquemment, afin de former le réseau de PG, les chaînes de glycane sont reliées entre elles par des réactions de transpeptidation catalysées également par

les PBP. Ces réactions de transpeptidation qui vont lier entre eux les pentapeptides de chaque chaîne de glycane, commencent par la rupture de la liaison peptidique D-alanine–D-alanine d’un pentapeptide donneur d’une chaîne de glycane. L’énergie dégagée par cette rupture est alors utilisée pour lier le groupe carboxyle de l’acide aminé D-alanine en position 4 avec l’extrémité N-terminale de l’acide diaminopimélique en position 3 d’un peptide receveur d’une autre chaîne de glycane, formant ainsi une liaison peptidique de type non ribosomale entre ces deux acides aminés. [[90](#), [96](#), [102](#), [104-106](#)] (Figure 7).

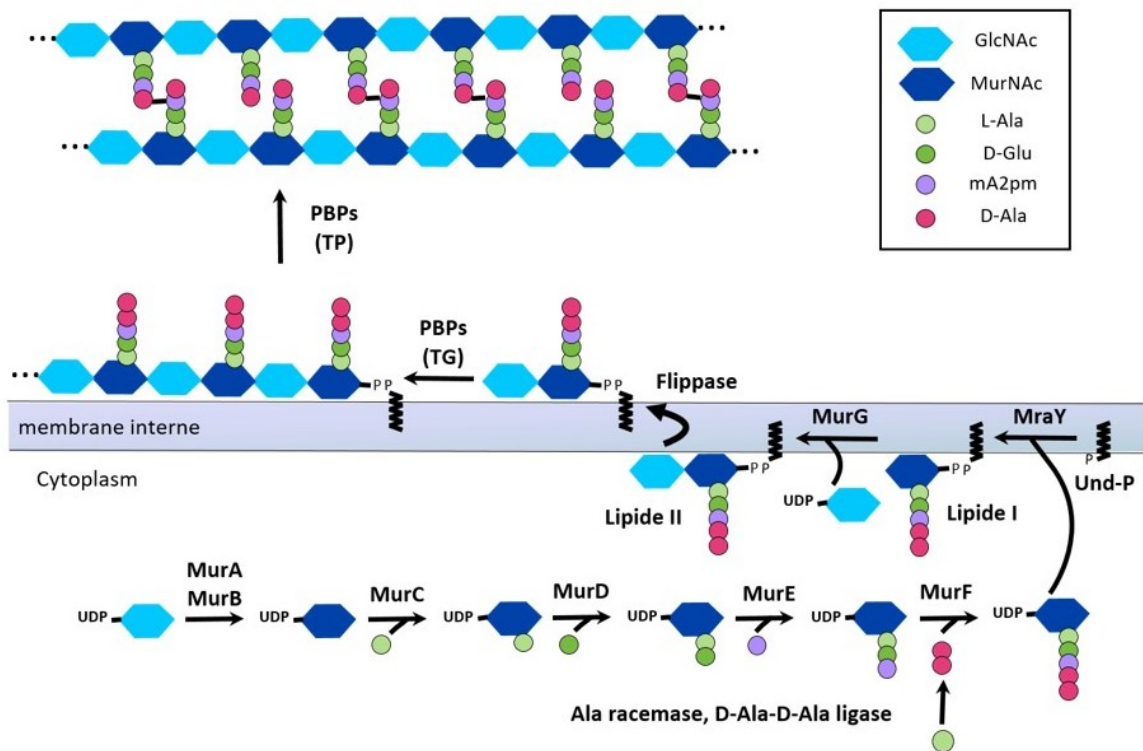


Figure 7 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du PG chez *P. aeruginosa*. La biosynthèse commence au niveau cytoplasmique avec la synthèse de MurNAc à partir de GlcNAc par les enzymes MurA et MurB. Les ligases MurC, MurD, MurE et MurF assemblent alors le pentapeptide afin de produire le précurseur cytoplasmique du PG en liant respectivement et de manière séquentielle les acides aminés L-Ala, D-Glu, mA2pm et un dipeptide D-Ala-D-Ala à MurNAc. A l'étape membranaire de la biosynthèse (membrane interne), MraY transfère le groupement phosphate du précurseur au transporteur lipidique Und-P pour former le lipide I. MurG lie alors un résidu GlcNAc au résidu MurNAc du lipide I pour former le lipide II. Ce monomère du peptidoglycane (lipide II) est alors transloqué du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane interne par une flippase. L'assemblage du PG est réalisé dans un premier temps par l'activité de transglycosylation (TG) des PBP qui polymérisent les unités de lipide II en liant un résidu GlcNAc d'un lipide II au résidu MurNAc d'un autre lipide II pour former de longues chaînes de glycanes. Dans un deuxième temps, ces chaînes de glycanes sont reliées entre elles grâce à l'activité de transpeptidation (TP) des PBP qui hydrolyse les liaisons D-Ala-D-Ala des pentapeptides et qui forment des liaisons peptidiques entre les acides aminés mA2pm d'une chaîne donneuse et les acides aminés D-Ala en position 4 d'une chaîne receveuse. Figure adaptée de Kouidmi, I. et al, 2014. [95].

1.1.3.3 Agents antibactériens : le peptidoglycane comme cible

Le peptidoglycane joue un rôle essentiel dans la survie des bactéries en les protégeant de la pression osmotique et en maintenant leur forme cellulaire spécifique. Pour cette raison, la voie de biosynthèse du peptidoglycane est la cible de nombreux antibiotiques produits naturellement ou de manière synthétique, et reste aujourd'hui une cible de choix dans le développement de nouveaux agents antibactériens [107].

1.1.3.3.1 Les antibiotiques qui ciblent la voie de biosynthèse du peptidoglycane

La biosynthèse du peptidoglycane est un processus complexe où plus de 20 réactions enzymatiques sont impliquées ; ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques et la plupart n'ont pas d'homologues chez les mammifères [94]. De ce fait, ces enzymes constituent d'excellentes cibles pour le développement d'antibiotiques à large spectre et aujourd'hui il existe des antibiotiques qui ciblent presque chaque étape de la biosynthèse du PG (Figure 8).

- Fosfomycine

La fosfomycine est un antibiotique produit par certaines espèces de *Streptomyces* qui cible la biosynthèse du peptidoglycane. C'est un analogue de l'acide phosphoénolpyruvique qui inhibe l'enzyme MurA en se liant de manière covalente et irréversible à son site actif [108] (Figure 8).

- D-cyclosérine

La D-cyclosérine est un antibiotique produit par de nombreux *Streptomyces* qui inhibe la Ala racemase (modifie la conformation de l'acide aminé alanine de la forme lévogyre à la forme dextrogyre) et Ddl (établit une liaison peptidique entre deux acides aminés D-alanine). Cet antibiotique joue le rôle d'analogue de la D-alanine et inhibe ainsi l'activité de ces deux enzymes [109, 110] (Figure 8).

- Tunicamycine

Un autre antibiotique qui cible une enzyme de la voie de biosynthèse du peptidoglycane est la tunicamycine. Cet inhibiteur du peptidoglycane produit par certaines espèces de *Streptomyces*

agit chez les bactéries comme un analogue du précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide et inhibe ainsi la translocase MraY en se fixant sur son site actif [111] (Figure 8).

- Ramoplanine

La ramoplanine est un peptide produit par l'actinomycète *Actinoplanes* sp. ATCC33076. Ce peptide inhibe l'activité de la glycosyltransférase MurG en se liant à ses substrats qui sont le lipide I et le lipide II [112-114] (Figure 8).

- Moenomycine

La moenomycine est un glycolipide produit naturellement par une variété d'espèces de *Streptomyces* qui inhibe l'activité de transglycosylation des PBP et empêche ainsi la polymérisation de la chaîne de peptidoglycane [115] (Figure 8).

- β -lactamines

Les β -lactamines sont une grande famille d'antibiotiques d'origine naturelle, semi synthétique ou synthétique et comprenant un cycle β -lactame dans leur structure moléculaire. Ce sont les antibiotiques les plus largement diffusés et utilisés dans le monde. Ils inhibent l'activité de transpeptidation des PBP en se liant de manière covalente au site actif des PBP et cela du fait de leur similarité structurale avec le dipeptide D-Ala-D-Ala, substrat des PBP [116, 117] (Figure 8).

- Vancomycine

La Vancomycine est un glycopeptide produit par *Streptomyces orientalis* qui inhibe l'activité de transpeptidation des PBP en se liant aux deux acides aminés D-alanine-D-alanine du lipide II ce qui empêche les PBP de lier leur substrat [118, 119] (Figure 8).

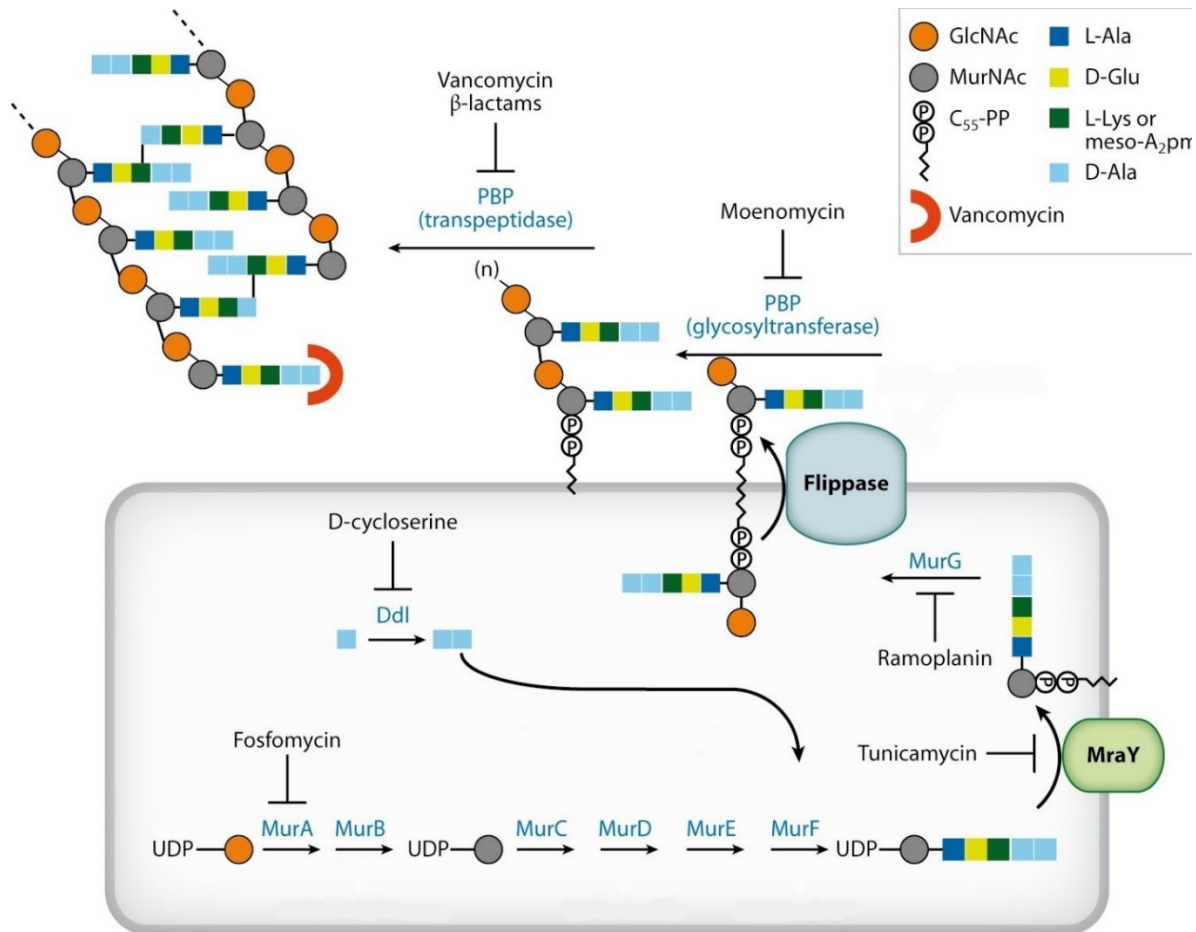


Figure 8 : Représentation schématique montrant les cibles de certains antibiotiques commerciaux sur la voie de biosynthèse du peptidoglycane bactérien. La voie de biosynthèse du peptidoglycane est la cible de nombreux antibiotiques commerciaux. La Fosfomycine inhibe MurA en se liant à son site actif. La D-cyclosérine inhibe la Ddl (D-Ala-D-ala ligase) en se liant à son site actif. La tunicamycine inhibe la translocase MraY en se liant à son site actif. La Ramnoplanine inhibe l'activité de MurG en se liant à ses substrats. La moenomycine inhibe l'activité de transglycosylation des PBP tandis que les β -lactamines tel que la vancomycine inhibent l'activité transpeptidation des PBP. Les enzymes sont représentées en bleu et les antibiotiques qui les inhibent sont représentés en noir. Figure adaptée de Lovering, A. L. et al, 2012. [120] avec l'autorisation de l'éditeur.

Ainsi la grande majorité des étapes de la voie de biosynthèse du PG sont aujourd'hui la cible d'antibiotiques utilisés dans le monde médical. Cependant, une étape essentielle à la formation du peptidoglycane n'est ciblée par aucun de ces antibiotiques. Cette étape est l'assemblage au niveau cytoplasmique du pentapeptide associé au nucléotide UDP-MurNAc, assemblage catalysé par les Mur ligases (Figures 7 et 8).

1.1.4 Les Mur ligases

Les Mur ligases sont une famille de quatre enzymes cytoplasmiques (MurC, MurD, MurE et MurF) ATP-dépendantes qui catalysent l'assemblage du pentapeptide du précurseur UDP-MurNac-pentapeptide lors de la biosynthèse du peptidoglycane (Figure 9).

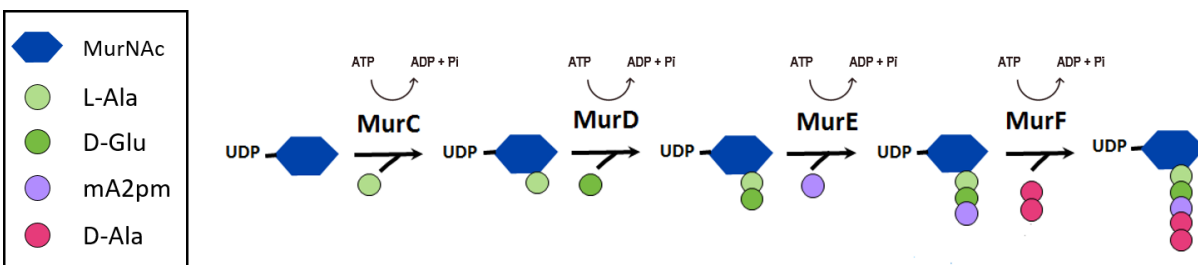


Figure 9 : Assemblage du pentapeptide par les Mur ligases pour la formation du précurseur UDP-MurNac-pentapeptide. L'assemblage du pentapeptide est réalisé de manière séquentielle par les ligases MurC, MurD, MurE et MurF qui ajoutent respectivement à un résidu MurNac les acides aminés L-Ala, D-Glu, mA2pm et le dipeptide D-Ala-D-Ala. L'énergie nécessaire à la catalyse de chaque réaction par les Mur ligases est obtenue en hydrolysant une molécule d'ATP en ADP et en phosphate inorganique (Pi). Figure adaptée de Kouidmi, I. et al, 2014. [95] avec l'autorisation de l'éditeur (licence d'exploitation n° 4225411042966).

1.1.4.1 Structure fonctionnelle et mécanisme catalytique des Mur ligases

Les mur ligases sont des enzymes ayant des structures tridimensionnelles composées de trois domaines fonctionnels, un domaine en N-terminal (domaine 1), un domaine central (domaine 2) et un domaine en C-terminal (domaine 3) (Figure 10). Chaque domaine va lier spécifiquement un des trois substrats de l'enzyme ; le domaine 1 s'attache au nucléotide UDP-MurNac, le domaine 2 va lier une molécule d'ATP et le domaine 3 va lier un acide aminé ou un dipeptide [121, 122]. Cette liaison aux substrats se fait de manière séquentielle et répond à un ordre précis. Dans un premier, temps la Mur ligase va lier une molécule d'ATP par son domaine central ce qui va permettre à l'enzyme d'adopter une conformation active dite « fermée » où les domaines en N-terminal et en C-terminal se rapprochent (Figure 10). L'adoption de cette conformation va permettre à l'enzyme de lier son substrat nucléotidique par son domaine en N-terminal puis un acide aminé ou un dipeptide spécifique par son domaine en C-terminal [123, 124]. A ce moment, deux ions Mg^{2+} viennent se fixer afin de faire un pont entre les deux groupements

chargés négativement situés sur l'ATP et le nucléotide [124]. La molécule d'ATP est alors hydrolysée et l'énergie dégagée est utilisée par l'enzyme afin de catalyser la formation d'une liaison peptidique non ribosomale entre la fonction acide carboxylique (COOH) du nucléotide ou du peptide en formation et la fonction amine (NH₂) de l'acide aminé [125, 126].

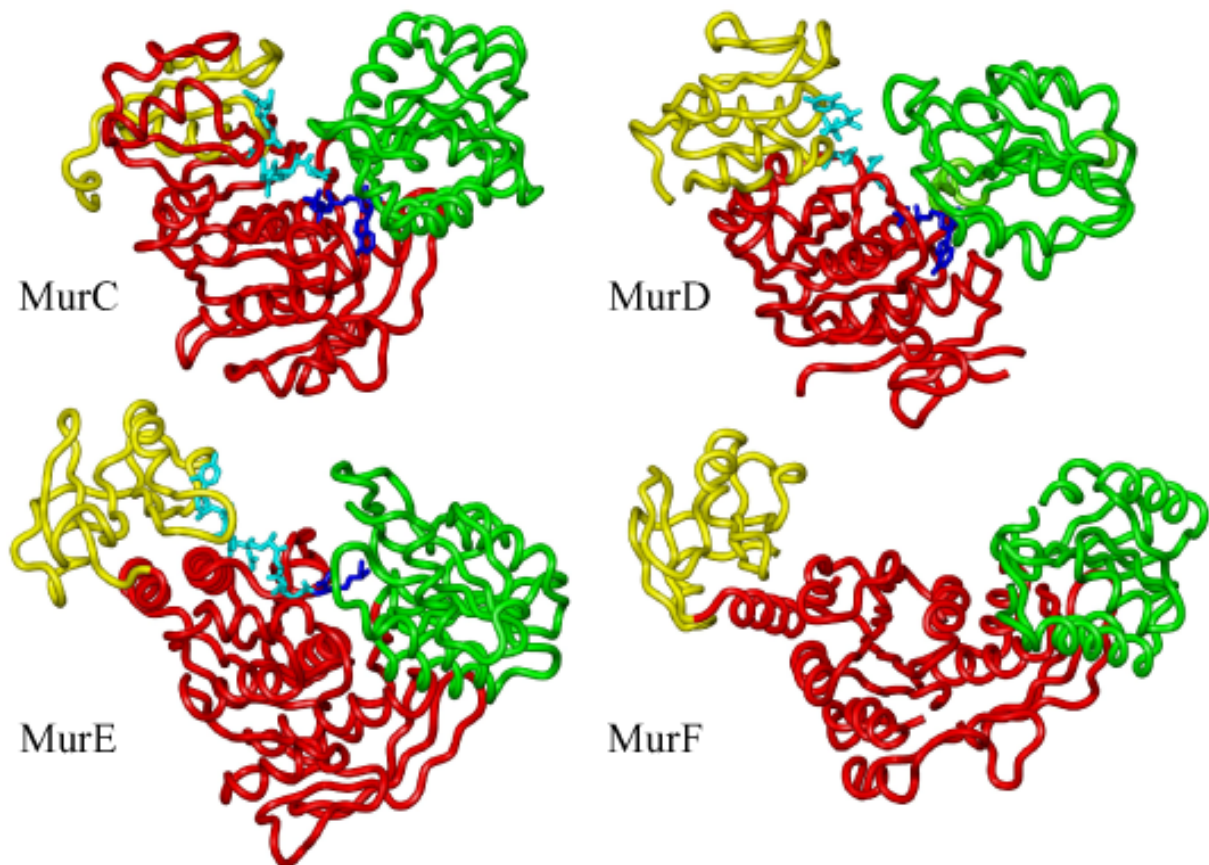


Figure 10 : Représentation des structures tridimensionnelles de MurC, MurD, MurE et MurF. La représentation tridimensionnelle des Mur ligases montre qu'elles sont toutes composées de 3 domaines. Un domaine en N-terminale représenté en jaune, un domaine central représenté en rouge et un domaine en C-terminale est représenté en vert. MurC, MurD et MurE adoptent une conformation active « fermée » liées à un analogue de l'ATP non hydrolysable représenté en indigo et au produit représenté en bleu clair. MurF adopte ou conformation inactive « ouverte » sans substrat. Figure tirée de Kouidmi I. et al, 2014. [95] avec l'autorisation de l'éditeur (licence d'exploitation n° 4225411042966).

1.1.4.2 Assemblage du pentapeptide par les Mur ligases

À la suite de la formation du nucléotide UDP-MurNAc dans le cytoplasme bactérien par la transférase MurA et la réductase MurB (Figure 7), les Mur ligases MurC, MurD, MurE et MurF vont catalyser de façon séquentielle l'ajout d'acides aminés au nucléotide afin d'assembler le pentapeptide et de former le précurseur cytoplasmique du PG (Figures 7 et 10). L'assemblage commence avec la ligase MurC qui après s'être liée au nucléotide UDP-MurNAc et à l'acide aminé L-alanine, catalyse la formation d'une liaison peptidique entre le groupement COOH du nucléotide et le groupement NH₂ de la L-alanine. La réaction qui suit est réalisée par la ligase MurD qui après avoir lié ses substrats, UDP-MurNAc-L-alanine et l'acide aminé D-glutamate, va former une liaison peptidique entre les deux acides aminés. Cela aboutit à la formation du complexe UDP-MurNAc-L-alanine-D-glutamate qui devient le substrat de la ligase MurE qui catalyse la formation d'une liaison peptidique entre le résidu D-glutamate du peptide en formation et l'acide diaminopimélique (mA2pm) chez les bactéries à Gram-négatif ou la L-lysine chez les bactéries à Gram positif [127]. Enfin, le produit de la réaction précédente est utilisé par la ligase MurF qui y ajoute le dipeptide D-alanine-D-alanine en catalysant la formation d'un lien peptidique. Ainsi, le produit de MurF est UDP-MurNAc-L-alanine-D-glutamate-mA2pm-D-alanine-D-alanine, précurseur du lipide I [94, 121].

1.1.4.3 Similarités structurelles et fonctionnelles entre les Mur ligases

Les Mur ligases sont des enzymes structurellement et fonctionnellement très similaires. Elles partagent un mécanisme catalytique commun, des structures tridimensionnelles proches et de nombreux résidus invariants ce qui permet de les classer dans la même famille. En effet, les membres de cette famille, MurC, MurD, MurE et MurF, sont toutes ATP dépendantes, fixent un substrat nucléotidique, un substrat peptidique, et sont capables de réaliser des liaisons peptidiques de type non ribosomales [128, 129].

- Régions hautement conservées en acides aminés

Les Mur ligases sont des enzymes très conservées chez de nombreuses espèces bactériennes. Malgré un taux d'homologie de 15 à 20% au niveau de leur structure primaire, il existe des

régions hautement conservées au niveau de leur sites actifs, dont 4 sont indispensables à leur activité. La région I est un motif GXXGK(T/S) - (T/S) hautement conservé proche de l'acide aminé 120 et qui forme un pli Rossmann ayant pour fonction de lier l'ATP. La région II située au milieu de la protéine, est un domaine étendu contenant notamment un acide aminé glutamate invariant et une région hydrophobe contenant une histidine hautement conservée située entre deux acides aminés acides. Il a été vu que la mutation d'un de ces deux résidus conduisait à une importante baisse de l'activité de la ligase MurF. La région III située plus en aval, est un ensemble concentré très conservé d'acides aminés acides en forme de dyade. Enfin, la région VI est une région hydrophobe proche de l'acide aminé 300 formée par la séquence consensus : GXXNXXNXXAAXA- 5X-G-18X-R. [[128](#), [129](#)].

- Structure et mécanisme catalytique commun

Les Mur ligases partagent la même structure tridimensionnelle et architecture du site actif, et possèdent des fonctions catalytiques très similaires. En effet, elles catalysent toutes la formation d'une liaison amide, une réaction concomitante à l'hydrolyse d'ATP en ADP et de phosphate inorganique. Leurs structures tridimensionnelles sont composées de 3 domaines fonctionnels ayant des fonctions similaires, sinon identiques (Figure 10), qui vont lier spécifiquement 3 substrats selon un ordre précis et commun à toutes les Mur ligases [[121](#), [122](#)].

1.1.4.4 Cibler les Mur ligases pour le développement de nouveaux agents antibactériens

Etant donné le rôle essentiel des Mur ligases dans la biosynthèse du peptidoglycane, ces enzymes constituent d'excellentes cibles pour le développement d'agents antibactériens. En effet, inhiber une ou plusieurs Mur ligases bloquerait de manière efficace la formation du peptidoglycane et cela au niveau cytoplasmique avant la formation du lipide I.

- Les Mur ligases comme cible

Depuis leur découverte, les Mur ligases sont le sujet de recherche d'un nombre de plus en plus important d'études. Si par le passé ces études étaient peu nombreuses et se concentraient essentiellement à identifier et comprendre les détails de leurs structures et de leurs mécanismes catalytiques, l'apparition de souches bactériennes multirésistantes durant cette dernière décennie et le besoin de cibler de nouveaux processus biologiques ont poussé les chercheurs à

s'intéresser à l'identification d'inhibiteurs qui pourraient limiter ou bloquer leur activité [95]. Ainsi un nombre important d'inhibiteurs de différentes composition moléculaires ayant une plus ou moins grande action inhibitrice sur l'activité d'une ou plusieurs Mur ligases ont été rapportés, cependant aucun d'eux n'est aujourd'hui commercialisé et souvent ces derniers présentent une cytotoxicité pour l'humain où montrent peu ou pas d'activité antibactérienne *in vivo* [130].

- Cibler plusieurs Mur ligases

Les antibiotiques utilisés pour traiter les infections cliniques sont souvent des composés qui ne ciblent qu'une seule protéine et l'utilisation de plusieurs antibiotiques est nécessaire afin d'éviter que le développement d'une résistance fasse échouer la thérapie. En effet, tous ces antibiotiques sont sujet à une haute probabilité de développement de résistance médiée par leur unique cible suite à une mutation ponctuelle au niveau du gène qui code la séquence ciblée [131]. De ce fait, l'utilisation d'agents antibactériens ciblant plusieurs protéines codées par différents gènes permet non seulement d'augmenter l'efficacité de l'action bactéricide ou bactériostatique de l'antibiotique mais surtout de limiter considérablement les probabilités de développement de résistances médiées par les cibles. En effet, pour qu'une bactérie puisse développer une résistance médiée par la cible envers un agent antibactérien multi-cibles, il faudrait que des mutations conférant une résistance se produisent au niveau des gènes de chacune de ces cibles (événements indépendants) et au sein de la même génération cellulaire étant donné que l'action inhibitrice de cet agent sera toujours effective tant qu'il inhibe au moins une des protéines visées [132-134]. Certains antibiotiques utilisés aujourd'hui inhibent l'activité de plusieurs protéines tel que les β -lactamines qui ciblent plusieurs PBP [116]. Bien que certaines souches bactériennes aient développé des résistances envers ces antibiotiques, ce sont en très grande majorité des résistances non médiées par les cibles et résultent souvent de stratégies de résistances génétiquement transmises par quelques souches ayant coexisté depuis longtemps avec l'antibiotique. C'est le cas pour les β -lactamines [135], antibiotiques dérivés de la pénicilline produite naturellement par les champignons du genre *Penicillium*, dont les résistances sont majoritairement le résultats d'enzymes inactivatrices qui existaient chez certaines souches bactériennes avant l'utilisation clinique de la pénicilline [136].

Les agents antibactériens multi-cibles existants visent souvent des protéines de la même famille avec des structures et des fonctions catalytiques très similaires. Plus exactement, ils ciblent des

régions hautement conservées entre les protéines et indispensables à leur activité catalytique. Sachant cela, les Mur ligases peuvent constituer d'excellentes cibles pour le développement de nouveaux agents qui inhiberaient l'activité de plusieurs mur ligases à la fois. En effet, les Mur ligases sont des enzymes très similaires, partagent des structures et des mécanismes catalytiques semblables et il existe entre elles plusieurs régions hautement conservées et impliquées dans leur activité catalytique. En ce sens, plusieurs études évoquent et discutent de l'intérêt de cibler les Mur ligases pour le développement d'inhibiteurs multi-cible [95, 97, 130, 137].

1.1.4.5 Mécanismes de résistances médiés par la cible

Un des mécanismes les plus importants dans le développement d'une résistance envers un agent antibactérien est la résistance médiée par la cible. En effet, étant donné que l'agent antibactérien doit se fixer à une séquence spécifique afin d'inhiber une voie métabolique, une résistance envers cet agent est acquise si ce dernier ne peut plus s'y fixer. Cela peut se produire suite à l'apparition d'une mutation qui empêche l'accès de l'antibiotique à la cible [138, 139]. Dans la majorité des cas cependant, ce type de résistances se produit suite à l'apparition d'une ou plusieurs mutations qui modifient l'affinité de l'antibiotique avec la cible. Cela peut être le résultat de mutations ponctuelles dans le gène qui code pour la protéine cible, d'altérations enzymatiques du site de liaison de l'antibiotique ou de déviation de la cible par contournement ou remplacement.

- Modification de cible par mutation ponctuelle

La résistance par modification de la cible d'un antibiotique fait suite à l'apparition d'une ou plusieurs mutations dans la partie d'un gène qui code la séquence en acides aminés de la protéine ciblée par l'antibiotique. De ce fait, l'antibiotique perd une partie ou la totalité de son affinité avec la protéine cible ce qui résulte en une résistance partielle ou totale de la bactérie envers l'antibiotique. Ce mécanisme est à l'origine de mutations envers de nombreux antibiotiques tel que la rifampicine [140], les fluoroquinolones [141] ou les oxazolidinones [142].

- Altération enzymatique du site de liaison

La résistance par altération enzymatique de la cible d'un antibiotique est la modification par une enzyme des caractéristiques physicochimiques de la séquence ciblée qui aboutit en une baisse

de l'affinité de l'antibiotique avec cette séquence. Cette modification est généralement une phosphorylation, une méthylation ou une acétylation du site de fixation de l'antibiotique par une enzyme. Ce mécanisme est à l'origine du développement de résistances à plusieurs antibiotiques tel que les macrolides [143] ou le linézolide [144].

- Déviation de la cible par contournement ou remplacement

La déviation de la cible par remplacement est l'acquisition par la bactérie de nouvelles molécules capables d'accomplir des fonctions biochimiques similaires que celles ciblées par l'antibiotique sans pour autant être inhibées par ce dernier. Ces molécules sont souvent l'équivalent trouvé chez une autre espèce et acquises grâce à l'incorporation d'éléments génétiques mobiles. Cette stratégie est à l'origine de résistances envers la vancomycine [145] et la méticilline [146, 147].

La déviation de la cible par contournement consiste également à contourner l'effet de l'antibiotique sur la voie métabolique en surproduisant la cible de cet antibiotique pour ainsi limiter ou annuler l'action inhibitrice de cet antibiotique en créant une sur-disponibilité de la cible [148]. C'est par exemple le cas pour certaines résistances au triméthoprim et au sulfaméthoxazole [149, 150].

1.1.5 Présentation phagique

1.1.5.1 Description et déroulement de la technique de présentation phagique

Les bactériophages (appelés plus simplement phages) sont un large groupe de virus qui infectent les cellules procaryotes. Du fait de la simplicité de leur structure et de leur génétique, ainsi que de la capacité à les cultiver en laboratoire dans un hôte bactérien, les phages ont été largement utilisés dans différentes applications médicales et scientifiques depuis leur découverte à la fin des années 1910 [151-154]. La présentation phagique ou *phage display* en anglais est un terme décrivant l'expression ou « l'affichage » d'un polypeptide à la surface d'un phage. Cela est réalisé en fusionnant la séquence nucléotidique qui code pour ce polypeptide à un gène codant pour une protéine structurelle de la capsid du phage, sans que cela n'affecte néanmoins la

capacité du phage à infecter, s'amplifier et se libérer de la cellule hôte. Cette technologie a été réalisée la première fois en 1985 par Smith et son équipe avec des phages filamenteux [154]. De là a découlé la technique de présentation phagique, une méthode rapide et performante afin d'identifier des peptides ou des protéines ayant une affinité pour un ligand particulier et où le phage est utilisé comme vecteur de présentation de ces peptides ou de ces protéines. Pour cela, en utilisant la technologie de l'ADN recombinant, des banques de phages exprimant une variété de milliards de peptides ou de variantes d'une protéine peuvent être construites et utilisées pour étudier une activité ou une affinité spécifique [155, 156]. Le criblage d'une banque de peptides par la technique de présentation phagique est un processus en plusieurs étapes (Figure 11). Une première ronde de présentation est réalisée avec l'ensemble de la diversité peptidique de la banque et les peptides (fusionnés aux phages) ayant la plus forte affinité pour le ligand d'intérêt (aussi appelé cible) sont sélectionnés, amplifiés et utilisés pour une nouvelle ronde et ainsi de suite jusqu'à obtention d'une ou plusieurs séquences consensus. Cela est possible en augmentant la stringence de la solution de lavage après chaque ronde de telle manière à ce que les peptides ayant le plus d'affinité persistent tandis que ceux ayant moins d'affinité soient éliminés de la sélection. Ainsi, la technique permet de sélectionner les peptides ayant la plus forte affinité pour la cible. Les peptides sont par la suite identifiés par séquençage et testés pour leur affinité et leur activité [157, 158].

Depuis son introduction, la technique de présentation phagique a été utilisée dans différents domaines de recherche en raison de sa simplicité et de sa rapidité de mise en œuvre. C'est aujourd'hui une technique confirmée et largement utilisée qui a permis entre autre la découverte de médicaments [159, 160], le développement de vaccins [161, 162] ou l'isolation d'anticorps monoclonaux [163, 164] et de peptides antimicrobiens [165-167].

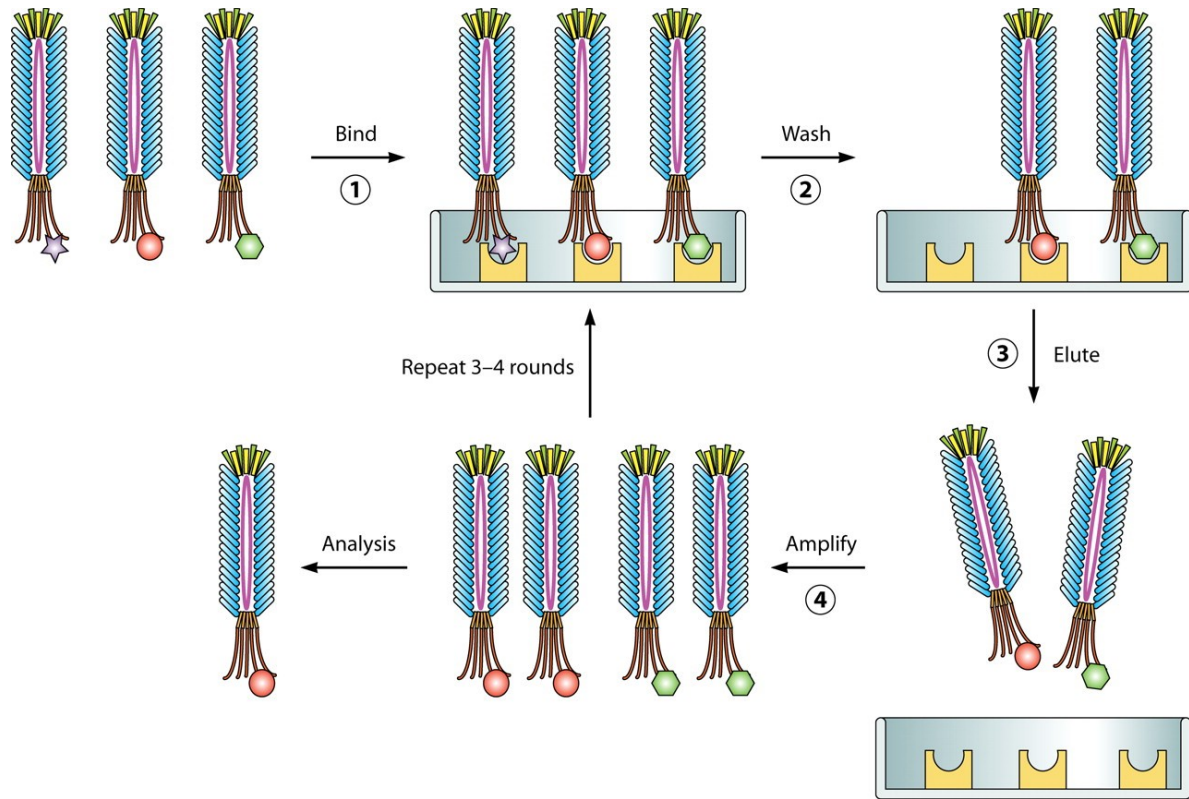


Figure 11 : Sélection de peptides par la technique de présentation phagique. (1) Des phages exprimant à leur surface une banque de peptides sont mis en contact avec une protéine cible fixée. (2) Après une étape de lavages, seuls les phages portant des peptides ayant une forte affinité (hexagone vert) et une très forte affinité (cercle rouge) pour la protéine cible restent accrochés tandis que les phages portant des peptides ayant une faible affinité pour cette dernière (étoile violette) sont éliminés. (3) Les peptides restés accrochés aux protéines cibles sont élués et les phages qui les portent récupérés. (4) Les phages élués sont amplifiés dans des hôtes bactériens et utilisés de nouveau dans 3 ou 4 rondes supplémentaires en augmentant progressivement la stringence des lavages ce qui va permettre d'éliminer les peptides à moins forte affinité (hexagone vert) et de ne récupérer que les peptides ayant une très forte affinité pour la protéine cible (cercle rouge). Enfin, ce peptide est alors identifié par séquençage et analysé. Figure tirée de Huang, J. X. et al, 2012 [158] avec l'autorisation de l'éditeur.

1.1.5.2 Phages utilisés dans la technique de présentation phagique

Depuis l'introduction de cette technologie en 1985 [154] avec les phages filamenteux, plusieurs autres phages ont été utilisés comme véhicules de présentation tel que les phages T4, T7 ou lambda. Le choix du phage va dépendre de plusieurs paramètres tels que la nature et la taille des polypeptides à exprimer à la surface du phage, le nombre de copies exprimées par particule

ou la concentration phagique à atteindre après une amplification. Souvent, lorsqu'il s'agit de banques commerciales, le type de phages utilisés est préalablement choisis par le manufacturier.

1.1.5.2.1 Présentation phagique avec le phage T4

Le phage T4 est un phage lytique qui infecte les cellules de *Escherichia coli*. Son génome est le plus conséquent parmi les phages cités et est fait de 168 895 pb. Structurellement, le phage T4 peut être subdivisé en deux parties, la tête et la queue. La tête en forme d'icosaèdre contient le génome du phage sous forme d'un ADN linéaire double brin, et est composée de trois protéines majeures : gp20, gp23 et gp24. La protéine gp 23 est entourée par deux protéines (SOC et HOC) non indispensable pour la viabilité du phage. La queue quant à elle a la forme de deux tubes concentriques par lesquels est injecté l'ADN du phage dans la cellule infectée. La queue se termine par une base de forme hexagonale qui sert à l'arrimage et à l'accrochage du phage sur la membrane de la bactérie. Lorsque utilisé dans la technique de présentation phagique, les peptides et protéines à « afficher » sont fusionnés aux protéines de surface SOC et HOC. Etant donné qu'il existe respectivement 155 et 810 copies de ces protéines par phage et que ces dernières ne sont pas essentielles à sa viabilité et à son infectivité, l'utilisation du phage T4 comme véhicule de présentation permet l'affichage de peptides et de protéines de grande taille et en grand nombre. En ce sens, l'assemblage du phage T4 est réalisé dans le cytoplasme et les protéines de sa capsid n'ont donc pas à être excrétées par la membrane cellulaire comme c'est le cas pour les phages filamenteux, ce qui facilite la fusion de protéines de grandes tailles [168, 169]. Ainsi la présentation phagique avec le phages T4 permet la présentation de protéines de très grande taille avec un grand nombre de copies, tel que la toxine de l'anthrax d'un poids moléculaire de 710kDa [170].

1.1.5.2.2 Présentation phagique avec le phage T7

Le phage T7 est un phage lytique qui infecte les cellules de *Escherichia coli*. Son génome d'une taille de 39 937 pb est porté sur un ADN linéaire double brin encapsidé dans une structure de forme icosaédrique qui est composée de 415 copies de la protéine gp 10. Comme pour le phage T4, l'assemblage du phage T7 se fait dans le cytoplasme de la cellule, ses protéines n'ont donc pas besoin d'être excrétées par l'enveloppe bactérienne. Le phage T7 possède des propriétés qui

en font un vecteur de présentation intéressant. En effet, la culture et l'amplification du phage T7 en laboratoire est plus facile et plus rapide qu'avec d'autres phages utilisés dans la présentation phagique tel que le phage lambda ou les phages filamenteux. Les plages de lyse se forment en moins de 3 heures à 37°C et les cultures lysent 1 à 2 heures après infection, ce qui diminue considérablement le temps nécessaire à la réalisation de plusieurs rondes de présentation phagique nécessaires à la sélection de peptides. La présentation phagique avec le phage T7 permet d'afficher à sa surface des peptides d'une taille allant jusqu'à 50 acides aminés en grand nombre (415 par phage) lorsque fusionnés à la protéine gp 10 mais seulement entre 0.1 et 1 copie par phage pour les protéines allant jusqu'à 1200 acides aminés [171], ce qui rend ce phage intéressant pour la sélection de peptides relativement petits. Le phage T7 est également très résistant et stable à différentes conditions de pH et de température ce qui laisse davantage de marge de manœuvre dans le choix des conditions de l'expérimentation [172]. De plus il a été observé que ce phage peut rester viable après 12 ans de conservation à 4°C [173].

1.1.5.2.3 Présentation phagique avec le phage Lambda

La structure du phage Lambda est similaire à celles des phages T4 et T7. Il est constitué d'une tête en forme d'icosaèdre composée de 415 copies de la protéine gpE et de 405 à 420 copies de la protéine gpD. Son génome est porté par un ADN double brin linéaire d'une taille de 48 490 pb. Lorsque le phage Lambda est utilisé en présentation phagique, les peptides à afficher peuvent être fusionnés aux deux protéines gpD et gpE, ce qui offre un grand nombre de copies par particule [174, 175]. Cette fusion à ces deux protéines peut aussi bien être réalisée en C-terminale qu'en N-terminale et cela sans affecter l'assemblage, la viabilité ou l'infectivité du phage. De plus, du fait de la petite taille de la protéine gpD (11,4 kDa), des protéines de plus grande taille peuvent y être coexprimées en N-terminale [176] tout en restant parfaitement exposées aux ligands utilisés lors de la présentation phagique [177].

1.1.5.2.4 Présentation phagique avec le phage M13

Le phage M13 fait partie de la famille des phages filamenteux, appelés ainsi du fait de leur forme longitudinale qui, au microscope, apparaît comme un filament. Son génome, composé d'un seul brin d'ADN monocaténaire et circulaire, a une taille approximative de 6400 nucléotides et est encapsulé dans une longue capsidie protéique de forme cylindrique. Le cylindre de 900 nm de longueur et 7 nm de diamètre est formé de 2700 protéines de surface (pVIII) et

est clos par une alternance de 10 protéines pVII et pIX d'un côté et l'alternance de 10 protéines pIII et pVI de l'autre (Figure 12) [178].

A



B






					
	pIII	pVI	pVIII	pVII	pIX
aa:	406	112	50	33	32
kDa:	42.5	12.4	5.2	3.6	3.7
Copies/virion:	~5	~5	2,700	~5	~5

Figure 12 : Représentation de la structure protéique du phage M13. La protéine pVIII est la protéine structurale majoritaire, présente en 2700 copies. A l'une des extrémités du cylindre on retrouve une alternance de 5 copies de chacune des protéines pIII et pVI. A l'autre extrémité on retrouve une alternance de 5 copies de chacune des protéines pVII et pIX. Figure tirée de Loset, G. A. et al, 2011. [179] avec l'autorisation de l'éditeur.

Les phages M13 infectent spécifiquement les cellules de *Escherichia coli* contenant le plasmide conjugatif F et exprimant des pili sexuels à leur surface. Chaque cellule de *Escherichia coli* ne peut être infectée que par un seul phage M13 qui, au moyen sa protéine de surface pIII, s'adsorbe sur un pilus F conjugatif de la bactérie, provoquant alors la rétractation du pilus, la dissolution des protéines de la capsid dans l'enveloppe bactérienne et la translocation de l'ADN viral dans le cytoplasme cellulaire [180, 181]. Contrairement aux phages lytiques dont l'assemblage est réalisé dans le cytoplasme bactérien et la libération entraîne la lyse cellulaire, les phages

filamenteux, dont le phage M13 fait partie, sont des virus non lytiques qui s'assemblent au niveau du périplasme de la bactérie infectée et sont libérés dans le milieu sans provoquer sa lyse (Figure 13). Cela résulte en une diminution de la vitesse de croissance de la bactérie et une libération en continu de nouveaux virions par cette dernière permettant d'atteindre des concentrations de 10^{13} phages par ml, ce qui, comparé aux phages lytiques, est considérablement supérieur [178]. En présentation phagique, les peptides sont fusionnés à la protéine pIII (5 copies), bien que des tentatives de fusion à la protéine pVIII (2700 copies) aient été réalisées [182-184]. Etant donné que les protéines du phage M13 doivent être excrétées à travers l'enveloppe bactérienne et que les peptides sont fusionnés à la protéine pIII utilisée par le phage pour infecter la bactérie, la taille des peptides à afficher doit être inférieure à 20 acides aminés, afin que l'infectivité du phage ne soit pas altérée [185]. Aussi, si l'on ajoute la capacité des phages filamenteux à résister à une large gamme de pH et de températures [186], les caractéristiques des phages filamenteux font d'eux des candidats adéquats et fiables afin d'être utilisés comme vecteurs de présentation de petits peptides dans le cadre de la technique de présentation phagique.

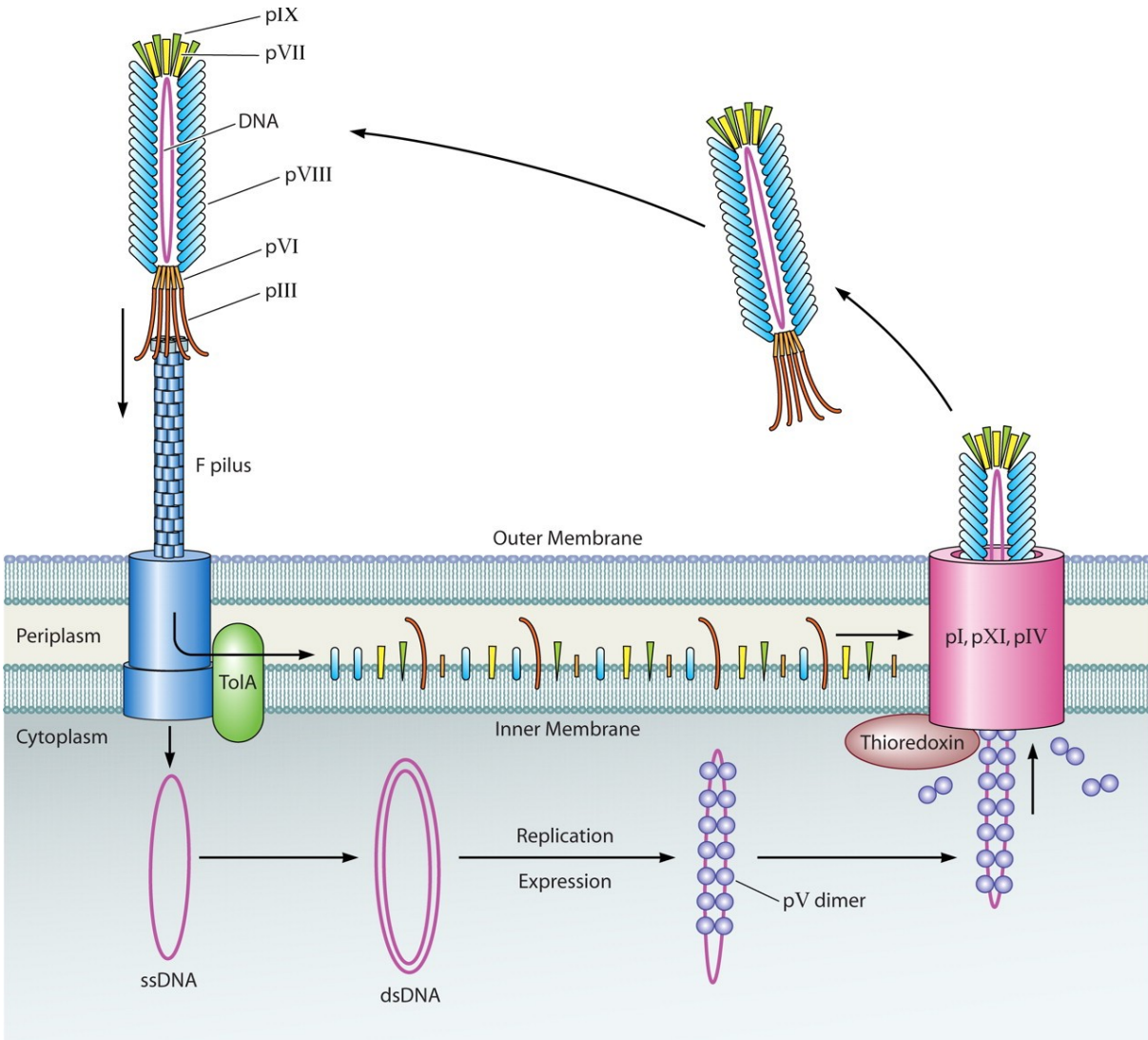


Figure 13 : Cycle de vie des phages filamenteux. Les phages filamenteux s'adsorbent au moyen de leur protéine pIII sur un pilus F d'une cellule de *Escherichia coli*. La protéine TolA de la cellule commence alors à dépolymériser les protéines de la capsid du phage qui demeurent au niveau de la membrane interne pour être recyclées. L'ADN simple brin du phage entre par la suite dans le cytoplasme de la bactérie, est convertit en ADN double brin et se réplique et s'exprime en utilisant les enzymes de l'hôte. L'ADN simple brin s'associe à la protéine pV du phage qui est par la suite remplacée par la protéine pVIII lors de l'assemblage du phage, assemblage réalisé dans un canal formé par les protéines phagiques pI, pXI et pIV et la thioresdoxine de la cellule hôte. Le phage mature est alors assemblé et libéré dans le milieu extracellulaire. Figure tirée de Huang, J. X. et al, 2012 [158] avec l'autorisation de l'éditeur.

1.2 Hypothèse et objectifs du projet

P. aeruginosa est la cause principale d'infections pulmonaires et de mortalité chez les personnes atteintes de fibrose kystique [187]. Les souches isolées chez ces patients sont résistantes à de nombreux antibiotiques et développent rapidement de nouvelles résistances [18, 20]. Ainsi, développer de nouveaux agents anti-pyocyaniques avec un faible risque de développement de résistances, est une nécessité si l'on veut améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients fibrose kystique.

Inhiber la formation de peptidoglycane est un moyen efficace pour lutter contre les bactéries pathogènes. Pour cette raison, plusieurs enzymes essentielles dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane sont la cible de plusieurs classes d'antibiotiques, cependant, aucun d'eux ne cible l'activité des Mur ligases. Cette famille d'enzymes catalyse l'assemblage de pentapeptides pour former le précurseur cytoplasmique du lipide I, une étape essentielle à la formation du peptidoglycane. Considérant le fort degré de similarité qui existe entre les sites actifs des Mur ligases et l'utilisation par ces enzymes de petits peptides comme substrats naturels pour leur activité biologique, les Mur ligases constituent d'excellentes cibles pour le développement de peptides inhibiteurs qui cibleraient plusieurs Mur ligases.

L'objectif général de mon projet de maîtrise est de sélectionner, par une version optimisée de la technique de présentation phagique, des peptides inhibiteurs multi-cibles qui visent plusieurs Mur ligases de *P. aeruginosa* et d'étudier l'affinité spécifique de ces peptides.

Mon premier objectif va être de surproduire et de purifier chacune des Mur ligases (MurC, MurD, MurE et MurF) de *P. aeruginosa*. La purification devra permettre d'obtenir des Mur ligases biologiquement actives avec des degrés de pureté et de concentration satisfaisants afin de permettre la sélection de peptides ayant une affinité spécifique pour ces enzymes.

Mon deuxième objectif va être d'évaluer l'efficacité et d'adapter les paramètres d'une version optimisée par le laboratoire de la technique de présentation phagique permettant de sélectionner des peptides de plus grande affinité pour les Mur ligases.

Mon dernier objectif va être dans un premier temps, et au moyen de la version optimisée de la technique de présentation phagique, d'isoler à partir de deux banques peptidiques, les peptides ayant une forte affinité pour les quatre Mur ligases à la fois. Dans un deuxième temps, il s'agira d'évaluer l'affinité relative de ces peptides pour les Mur ligases par ELISA afin de sélectionner les plus intéressants. Les peptides sélectionnés serviront à la réalisation d'une future étude, où ils seront synthétisés et testés pour leur activité inhibitrice *in vitro* sur les Mur ligases de même que pour leur activité antimicrobienne sur des souches de *P. aeruginosa*.

2. Matériel et méthodes

2.1 Construction des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4

2.1.1 Construction des fusions *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* par PCR

Les gènes de *P. aeruginosa*, *murC*, *murD*, *murE* et *murF* codant respectivement les protéines MurC, MurD, MurE et MurF ont été amplifiés par PCR à l'aide des ADN polymérases à haute-fidélité « *TranStart® KD Plus* », « *TranStart® HiFI* » et « *TranStart® Fly* » et en utilisant 1 µl de cellules de *P. aeruginosa* PAO1-l diluées dans de l'eau comme ADN matrice pour *murC*, *murD* et *murE* et 1 µl de cellules diluées de *P. aeruginosa* PAO1-h pour *murF* (Tableaux I et II).

Tableau I : Souches de *P. aeruginosa* utilisées pour ce projet

Souches	Espèce	Génotype	Source
PAO1-l	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Fournie par le laboratoire de Roger C. Levesque, Université Laval
PAO1-h	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Fournie par le laboratoire de Tom Bernhardt, Université Harvard

Tableau II : Conditions des PCR

ADN amplifié	ADN matrice	ADN polymérase	Température d'hybridation	Élément particulier ajouté
<i>murC-his10</i>	Cellules de PAO1-1	TranStart® FastPfu FLY #AP231	50°C	Transgene® GC enhancer #AG101-01
<i>murD-his10</i>	Cellules de PAO1-1	TranStart® KD Plus #AP301	55°C	Transgene® GC enhancer #AG101-01
<i>murE-his10</i>	Cellules de PAO1-1	TranStart® FastPfu FLY #AP231	50°C	Transgene® GC enhancer #AG101-01
<i>murF-his10</i>	Cellules de PAO1-h	TranStart® HiFi – #AP131	47°C	Transgene® GC enhancer #AG101-01
pLM3	pDL1	NewEnglandBiolabs® Q5 High-Fidelity M0491G	65°C	NewEnglandBiolabs® Q5 High GC Enhancer #B9028A

Des amorces spécifiques pour chaque gène ont été conçues (Tableau III) permettant d'ajouter des sites de restriction aux deux extrémités 3' et 5' des amplicons ainsi qu'une étiquette de 10 codons histidine à l'extrémité 3' des quatre gènes. À l'extrémité 5', le site de restriction NdeI est ajouté aux gènes *murC*, *murE* et *murF*, et le site de restriction XbaI est ajouté au gène *murD*. À l'extrémité 3', le site de restriction HindIII est ajouté gènes *murC*, *murD*, *murE* et *murF*. Il est à noter que du fait de la haute concentration en bases GC des 4 gènes (\geq à 65%), les PCR n'ont fonctionné qu'avec l'ajout d'un amplificateur GC (*GC enhancer*) fourni avec l'ADN polymérase FLY de la compagnie TranStart®. Une fois les amplifications confirmées sur gel d'agarose 1%, les produits de PCR *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* ont été purifiés avec le kit « *GeneJet PCR Purification #K0702* » de la compagnie « *Fermentas* » et la concentration d'ADN a été évaluée au NanoDrop.

Tableau III : Amorces utilisées (les sites de restrictions sont soulignés)

Utilisation	Nom	Séquence 5'-3'
Amplification du gène <i>murC</i>	<i>Fwd_MurC_(NdeI)</i>	5'GTCAC <u>ATATGGT</u> TAAAGAACCGAATG GCGTCA3'
	<i>Rev_MurC_(HindIII)</i>	5'TGACA <u>AAGCTT</u> TCAGTGATGGTGATGGT GATGGTGATGGTGATGAGAGCCACCGC CACCTGCGCCCTTCCCTCC3'
Amplification du gène <i>murD</i>	<i>Fwd_MurD_(XbaI_et_ séquence_RBS)</i>	5'GTCATCTAGAAATAATTTTGTTTAACT TTAAGAAGGAGATATACATATGAGCCT GATCGCCTCCG3'
	<i>Rev_MurD_(HindIII)</i>	5'TGACA <u>AAGCTT</u> TCAGTGATGGTGATGGT GATGGTGATGGTGATGAGAGCCACCGC CACCCGCTAGCTCCTCTACGGCTTTG3'
Amplification du gène <i>murE</i>	<i>Fwd_MurE_(NdeI)</i>	5'GTCAC <u>ATATGCCT</u> ATGAGCCTGAACC AACTG3'
	<i>Rev_MurE_(HindIII)</i>	5'TGACA <u>AAGCTT</u> TCAGTGATGGTGATGGT GATGGTGATGGTGATGAGAGCCACCGC CACCAGCATGCGGCACCTCC3'
Amplification du gène <i>murF</i>	<i>Fwd_MurF_(NdeI)</i>	5'GTCAC <u>ATA</u> TGCTTGAGCCTCTTCGCCT 3'
	<i>Rev_MurF_(HindIII)</i>	5'TGACA <u>AAGCTT</u> TCAGTGATGGTGATGGT GATGGTGATGGTGATGAGAGCCACCGC CACCGTGA

Mutagenèse dirigée (pDL1)	<i>Mut-correction-DL-FWD</i>	5'AGCGGGTGGCGGTGGCCATCACCATC ACCATCA3'
	<i>Mut-Correction-DL-Rev</i>	5'TGATGGTGATGGTGATGGCCACCGCC ACCCGCT3'
Séquençage insert pTB345	<i>NouvET21Fwd</i>	5' CGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAA3'
	<i>NouvET21Rev</i>	5' CCATCGGTGATGTTCGGCGATATA3'
Séquençage pLM1	<i>pET21aMurFFwd</i>	5'GAGTTCGCCCATGTCTCCGA3'
Séquençage pLM2	<i>pET21aMurEFwd</i>	5'AAGGTAACCTTGTCAGCGGCA3'
Séquençage pLM3	<i>pET21aMurDFwd</i>	5'GGACTGCTTCGTCCAGCGTT3'
Séquençage pLM4	<i>pET21aMurCFwd</i>	5'GATGCGGCTGGTAGACCATCA3'

2.1.2 Digestion du vecteur pTB345 et des inserts *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10*

Afin d'insérer chaque produit de PCR dans un vecteur pTB345 (Figure 14), le plasmide et le gène à insérer sont digérés par les mêmes enzymes de restriction afin de former des extrémités cohésives permettant l'insertion du gène dans le vecteur par ligation. Ainsi, le vecteur pTB345 et les produits de PCR *murC-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* ont été digérés avec les enzymes de restriction NdeI et HindIII, tandis que le vecteur pTB345 et l'insert *murD-his10* ont été digérés avec les enzymes de restriction XbaI et HindIII (Tableau IV). Toutes les digestions ont été incubées pendant 3h au bain marie à 37°C et les enzymes de restriction ont été inactivées par incubation à 65°C pendant 20 minutes. Des doubles digestions sont réalisées car les paires NdeI-HindIII et XbaI-HindIII coupent efficacement dans un même tampon (Tableau IV).

Tableau IV : Conditions de digestion

ADN digéré	Enzymes de restriction	Composition du mélange	Conditions d'incubation
<i>murC-his10</i> <i>murE-his10</i> <i>murF-his10</i> pTB345	NdeI + HindIII	0,5 µl NdeI + 0,5 µl HindIII + 2 µl tampon NEB 2.1 (10X) + 2 µl eau sigma +15 µl ADN	Incubation 3h au bain marie à 37°C et inactivation 20 minutes à 65°C
<i>murD-his</i> pTB345	XbaI + HindIII	0,5 µl XbaI + 0,5 µl HindIII + 2 µl tampon NEB 2.1 (10X) + 2 µl eau sigma + 15 µl ADN	3h au bain marie à 37°C

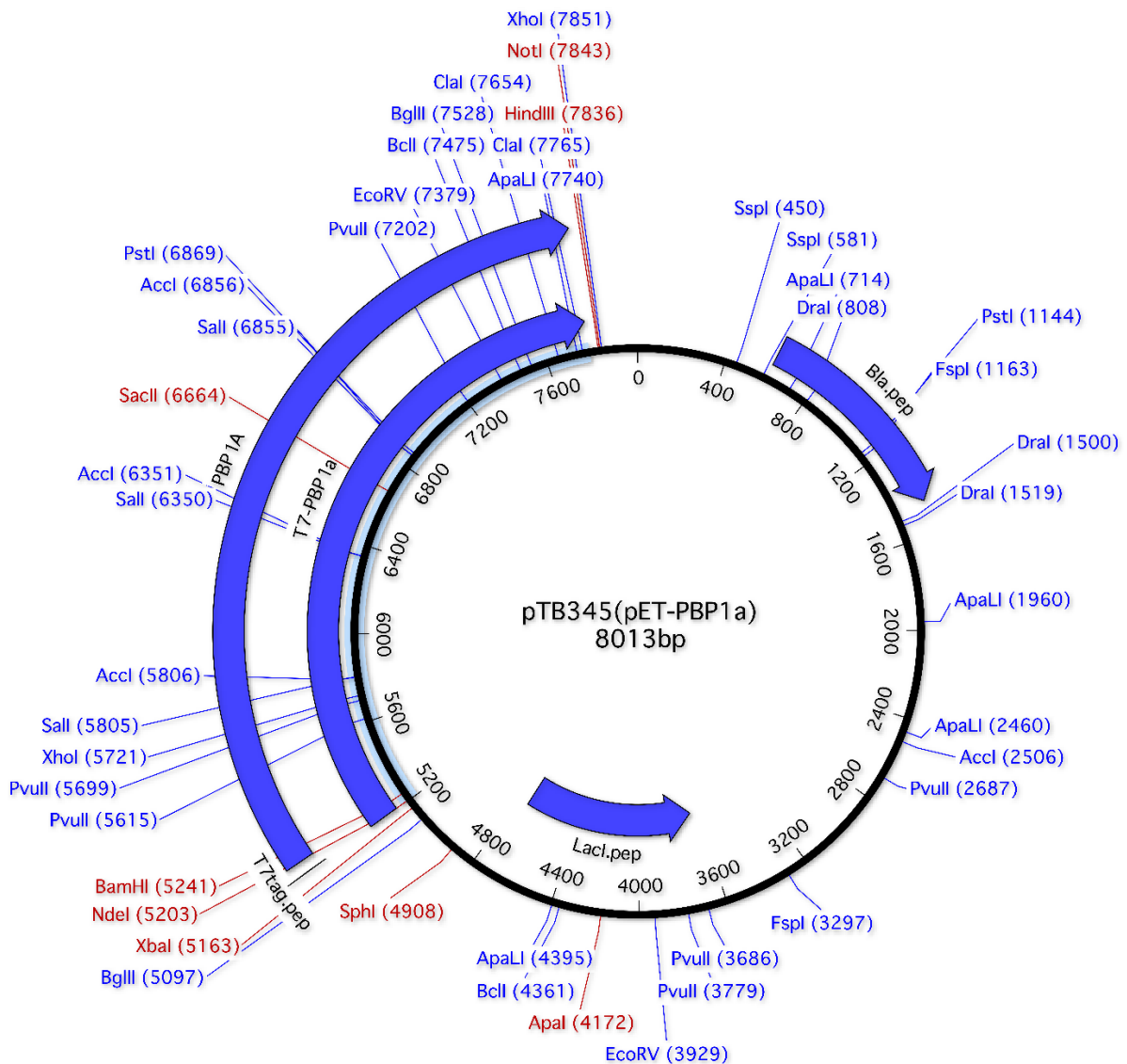


Figure 14 : Carte du plasmide pTB345. Carte générée avec le logiciel MacVector à partir de la séquence fournie par le laboratoire de Tom Bernhardt, Université Harvard.

2.1.3 Isolation et purification des produits de digestion sur gel d'agarose « low melt » 0,7% et par kit de purification.

Afin de se débarrasser des fragments de digestion non désirés et de récupérer les fragments d'intérêt, le mélange de chaque digestion est migré sur un gel d'agarose 0,7% de type « low melt » avec une tension électrique de 100V. Le gel résulte de la dissolution à 100°C de 0,7 g

de poudre d'agarose « low melt » dans 100 ml de TBE (Tris-base 10,8 g, acide borique 5,5 g, 0.5M EDTA 4 ml et eau distillée pour 1L) et d'ajout de 3,5 µl de bromure d'éthidium #E1510 de la compagnie « Sigma-Aldrich » après que le gel soit attiédi. Une fois le gel lentement agité, coulé et refroidi à 4°C, il est plongé dans un bain de TBE à 4°C afin d'éviter qu'il ne surchauffe et ne fonde sous l'effet de la tension électrique, car ayant une faible densité. Chaque produit de digestion (20 µl) est mélangé à 3,5 µl de tampon de charge Orange DNA Loading Dye #R0631 de la compagnie Thermofisher® et est déposé dans un puit du gel d'agarose « low melt ». Un marqueur de poids moléculaire #M101R-1 de la compagnie BioBasic® est déposé dans le premier puit et le gel est soumis à une tension électrique de 100V jusqu'à ce que le tampon de charge sorte du gel. À la fin de la migration, le gel est soumis à une lumière UV afin de révéler les fragments d'ADN, cela grâce au BET s'étant intercalé dans l'ADN et qui réagit à la lumière UV. Les bandes représentant les fragments d'intérêt (inserts digérés et plasmide digéré) sont rapidement et finement découpées et récupérées séparément dans différents tubes. L'ADN contenu dans ces bandes est par la suite purifié de l'agarose en utilisant un kit d'extraction #T1020S de la compagnie NewEnglandBiolabs®. Enfin, la concentration est calculée au NanoDrop et les échantillons sont conservés à 4°C.

2.1.4 Ligation des inserts *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* digérés au plasmide pTB345 digéré.

Afin de lier chaque insert au plasmide pTB345, une étape de ligation, accomplie par une ADN T4 ligase, est nécessaire. Ainsi, les produits de digestion représentant les gènes de *murC-his*, *murD-his*, *murE-his* et *murF-his* ont été clonés dans la plasmide pTB345 selon les conditions décrites dans le Tableau V.

Tableau V : Conditions de ligation

ADN lié	Ligase	Rapport insert /plasmide	Conditions d'incubation
pTB345 (digéré NdeI et HindIII) + <i>murC-his10</i> (digéré NdeI et HindIII)	T4 #M0202L NewEnglandBiolabs®	3 : 1	Toute la nuit à 16°C dans un volume total de 16,6 µl
pTB345 (digéré XbaI et HindIII) + <i>murD-his10</i> (digéré XbaI et HindIII)	T4 #M0202L NewEnglandBiolabs®	3 : 1	Toute la nuit à 16°C dans un volume total de 100 µl
pTB345 (digéré NdeI et HindIII) + <i>murE-his10</i> (digéré NdeI et HindIII)	T4 #M0202L NewEnglandBiolabs®	3 : 1	Toute la nuit à 16°C dans un volume total de 8 µl
pTB345 (digéré NdeI et HindIII) + <i>murF-his10</i> (digéré NdeI et HindIII)	T4 #M0202L NewEnglandBiolabs®	3 : 1	Toute la nuit à 16°C dans un volume total de 32 µl

2.1.5 Transformation des produits de ligation par choc thermique dans des cellules compétentes *Escherichia coli* DH5 (α pir).

La transformation est une technique de génétique bactérienne permettant d'introduire de l'ADN à l'intérieur d'une cellule bactérienne dite compétente. Afin de transformer les produits de ligation dans des cellules de *Escherichia coli* DH5(α pir) (Tableau VI), ces dernières ont été rendues chimio-compétentes par une technique utilisant le CaCl₂.

Tableau VI : Souches de *Escherichia coli* utilisées pour ce projet

Souches	Espèce	Génotype	Source
DH5(αpir)	<i>Escherichia coli</i>	<i>F- hsdR17 deoR recA1 endA1 phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 \emptyset80dlacZΔM15</i>	Fournie par le laboratoire de Tom Bernhardt, Université Harvard
MG1655	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rph1 ilvG rfb-50</i>	[188]
BL21(λDE3)	<i>Escherichia coli</i>	<i>ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Fournie par le laboratoire de Tom Bernhardt, Université Harvard
ER2738	<i>Escherichia coli</i>	<i>F'proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	New England Biolabs #E4104

- Préparation des cellules compétentes au CaCl_2 *Escherichia coli* DH5 (α pir)

Une culture de nuit de DH5 (α pir) est diluée 1 :100 dans 200 ml de LB et incubée à 37°C avec agitation. Une fois que la DO à 600nm atteint 0,35, la culture est placée sur glace pour une durée de 30 minutes et est par la suite centrifugée à 2500 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est alors jeté et le culot cellulaire est suspendu dans 100 ml de solution CaCl_2 0,1 M à 4°C et la suspension incubée sur glace pour la nuit. Après incubation, la suspension est centrifugée à 2500 x g pendant 15 minutes à 4°C et le culot cellulaire est suspendu avec 200 μ l de solution de CaCl_2 0,1 M. Les cellules ainsi obtenues sont compétentes et prêtes à être transformées.

- Transformation des produits de ligation dans les cellules compétentes CaCl₂ *Escherichia coli* DH5 (α pir)

Le volume total de chacun des 4 produits de ligation est mélangé à 40 μ l de cellules compétentes et les 4 tubes sont incubés sur glace pendant 30 minutes. Le choc thermique est réalisé en transférant les tubes au bain marie à 42°C pendant 90 secondes puis 2 minutes sur glace. Un ml de SOC (Tableau VII) est ajouté dans chaque tube et ces derniers sont incubés pour 1h à 37°C avec agitation. Après incubation les cellules de chaque tube sont étalées sur 2 géloses LB amp50 (LB agar contenant 50 μ g/mL d'ampicilline) de telle manière à ce qu'il y ait 10% et 90% des cellules dans chaque, et sont incubés pendant 2 jours à température pièce (aucune transformation n'a fonctionné lorsque les milieux solides ont été incubés à 37°C).

Tableau VII : Milieux de culture et solutions utilisées

Milieux	Compositions	Quantité
LB agar (Pour 1L)	Agar A (Bio Basic Canada Inc #FB0010)	15 g
	Peptone-A (Bio Basic Canada Inc #G213)	10 g
	Extrait de levure (Bio Basic Canada Inc #G0961)	5 g
	NaCl (Fisher Chemical #S271)	5 g
LB liquide (pour 1L)	Peptone-A (Bio Basic Canada Inc #G213)	10 g
	Extrait de levure (Bio Basic Canada Inc #G0961)	5 g
	NaCl (Fisher Chemical #S271)	5 g
SOB (pour 1L)	Tryptone (Bio Basic Canada Inc #G211)	20 g
	Extrait de levure (Bio Basic Canada Inc #G0961)	5 g
		10 ml
	KCl 250mM (J.T. Baker Chemical Co. #3040)	
SOC (pour 1L)	SOB	980 ml
	MgCl ₂ , 1M (Fisher Scientific #BP214)	20 ml
	Glucose 20% (Sigma #G8270)	20 ml
Agar-TOP (pour 1L)	Peptone-A (Bio Basic Canada Inc #G213)	10 g
	Extrait de levure (Bio Basic Canada Inc #G0961)	5 g
	NaCl (Fisher Chemical #S271)	5 g
	Agar A (Bio Basic Canada Inc #FB0010)	7 g
Solution de CaCl₂ (pour 1L)	CaCl ₂ (Fisher Scientific #BP510)	11,1 g
Stock IPTG/Xgal (pour 25ml)	Isopropyl-β-D-thiogalactoside (Bio Basic Canada Inc #IB0168)	1,25 g
		1 g
	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (Bio Basic Canada Inc #BB0083)	25 ml
	Dimethyl formamide (Fisher Chemical #D119)	

LB agar IPTG/Xgal (pour 1L)	LB agar	999 ml
	Stock IPTG/Xgal	1 ml
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (Bio Basic Canada Inc #AD0002)	22 mg
	Citrate de sodium (BioShop® #CIT001)	258 mg
TSB (pour 100 ml)	LB	90 ml
	MgCl ₂ , 1M (Fisher Scientific #BP214)	5 ml
	DMSO	5 ml
	PEG (Sigma ® #P-4338)	10 g

2.1.6 Vérification des plasmides par digestion enzymatique.

Afin de vérifier l'insertion des fusions *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* dans le vecteur de clonage pTB345, les plasmides de deux colonies choisis au hasard, et cela pour chacune des 4 transformations réalisées, ont été extraits à l'aide du kit GeneJET #K0503 en suivant le protocole du manufacturier, puis digérés avec les mêmes enzymes de restriction utilisées préalablement (Tableau IV). Les produits de digestions ont par la suite été mélangés au tampon de charge « *Orange DNA Loading Dye* » #R0631 de la compagnie Thermofisher® et ont été chargés dans les puits d'un gel d'agarose 1% (poudre d'agarose 1g, TBE1X, BET). Les produits sont migrés dans le gel par électrophorèse à 120V et le gel est soumis à une lumière UV afin de révéler les bandes d'ADN. Grace à un marqueur de poids moléculaire chargé dans le premier puit du gel, il a été confirmé que les plasmides digérés sont bien composés des inserts *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10*, *murF-his10*.

2.1.7 Séquençage de pLM1, pLM2, pLM4, pDL1.

Afin de vérifier la présence d'éventuelles erreurs dans la séquence nucléotidique des inserts *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* apparues lors de leur amplification par PCR, chaque plasmide, pLM1, pLM2, pLM4 et pDL1 (Tableaux II et VIII) est envoyé à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (IRCM) afin d'être séquencé (Tableau III). Après vérification par alignement des résultats de séquençage avec les séquence de plasmide *in silico*

correspondants, il a été confirmé que les plasmides pLM1, pLM2 et pLM4 (Tableau VIII) ne contiennent aucune modification de séquence au niveau de leurs inserts, et seul le plasmide pDL1 sensé contenir l'insert *murD-his10* est porteur de mutations sous forme de 4 substitutions aux nucléotides 6522, 6523, 6524 et 6526 du plasmide pDL1.

Tableau VIII : Plasmides utilisés et construits pour ce projet

Plasmide	Origine de répllication	Résistance	Génotype	Sources
pTB345	f1	<i>amp^r</i>	pET-21 portant le gène <i>mrcA</i> sous le contrôle de P _{T7}	Laboratoire de Tom Bernhardt, Université Harvard
pLM1	f1	<i>amp^r</i>	pTB345 avec le gène <i>murF-his10</i> à la place de <i>mrcA</i>	Ce mémoire
pLM2	f1	<i>amp^r</i>	pTB345 avec le gène <i>murE-his10</i> à la place de <i>mrcA</i>	Ce mémoire
pLM3	f1	<i>amp^r</i>	pTB345 avec le gène <i>murD-his10</i> à la place de <i>mrcA</i>	Ce mémoire
pLM4	f1	<i>amp^r</i>	pTB345 avec le gène <i>murC-his10</i> à la place de <i>mrcA</i>	Ce mémoire
pDL1	f1	<i>amp^r</i>	pTB345 avec le gène <i>murD-his10</i> muté à la place de <i>mrcA</i>	Ce mémoire

2.1.8 Mutagenèse dirigée du plasmide porteur de l'insert *murD-his10* muté

La mutagenèse dirigée est une technique de biologie moléculaire permettant de modifier d'une manière spécifique un ou plusieurs nucléotides d'un ADN par le biais d'une PCR. Dans le cas d'un plasmide, ce dernier est dénaturé et à l'aide de deux amorces composées des séquences environnantes aux nucléotides devant être modifiés, une PCR est réalisée. Ainsi, en utilisant le kit « *Q5® Site directed mutagenesis* » de la compagnie NewEnglandBiolabs®, une PCR a été réalisée en utilisant 0.5 ng du plasmide recombinant muté pDL1 comme ADN matrice, une amorce sens « Mut-correction-DL-FWD » et une amorce anti-sens « Mut-Correction-DL-Rev » (Tableaux II, III et VIII) afin de réparer les mutations aux nucléotides 6522, 6523, 6524 et 6526 du plasmide pDL1. Le produit de PCR est par la suite migré sur gel d'agarose 1% afin de confirmer l'amplification.

Afin de circulariser les produits de la PCR et d'éliminer l'ADN matrice pDL1, 1 µl du cocktail d'enzymes, composé d'une ADN ligase, de l'enzyme de restriction méthyl dépendante Dpn I et d'une kinase (#M0554S NewEnglandBiolabs®), est ajouté au produit de la PCR et incubé pendant 5 minutes à température pièce. Après incubation, le plasmide d'origine pDL1, qui a été méthylé suite à sa transformation dans *Escherichia coli* DH5 (α pir), est digéré par l'enzyme Dpn I, les ADN linéaires résultants de l'amplification par PCR sont phosphorylés par la kinase et circularisés par l'ADN ligase formant ainsi le plasmide pLM3 (Tableau VIII). Le plasmide pLM 3 est par la suite transformé dans *Escherichia coli* DH5 (α pir) compétentes au CaCl₂ selon les conditions définies dans la partie 2.2.5. Après transformation, pLM3 est précipité avec le kit « *GeneJet Plasmid Miniprep #K0503* » de la compagnie ThermoScientific et envoyé à l'IRCM pour séquençage. Par alignement des résultats de séquençage, il a été confirmé que pLM3 contient en totalité la séquence de l'insert *murD-his10*.

2.2 Production des protéines recombinantes MurC-his10, MurD-his10, MurE-his10 et MurF-his10

2.2.1 Transformation des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 dans *Escherichia coli* BL21(λ DE3)

a- Préparation des cellules BL21(λ DE3) compétentes

En vue de la surproduction, chacun des 4 plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 est transformé dans des cellules *Escherichia coli* BL21(λ DE3) (Tableau VI) rendues compétentes par la technique de « Chung » [189]. Pour cela, une culture de nuit de cellules BL21(λ DE3) est diluée au 1 : 100 dans 5 ml de LB est incubée à 37°C avec agitation jusqu'à atteinte d'une densité optique à 600 nm de 0,5. La culture est par la suite mise sur glace pendant 1h et centrifugée à 4°C à 1700 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté et le culot cellulaire lentement suspendu dans 500 μ l de TSB (LB 90 ml, 1M MgCl₂ 5 ml, DMSO 5 ml, PEG 8000 10g) froid et stérile.

b- Minipréparation des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4

Afin de transformer les plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 dans les cellules de *Escherichia coli* BL21(λ DE3), ces derniers sont extraits par minipréparation à partir des cellules de *Escherichia coli* DH5 (α pir) à l'aide du kit « GeneJET Plasmid Miniprep Kit » #0502 de la compagnie ThermoFisher Scientific. En suivant le protocole du manufacturier du kit, les cellules sont lysées et les plasmides sont extraits, purifiés et élués avec un volume de 40 μ l de tampon d'éluion. Enfin la concentration de chaque plasmide est évaluée au nanodrop.

c- Transformation des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 dans BL21(λ DE3) compétentes

Deux μ l de chaque plasmide est ajouté à 100 μ L de cellules *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) compétentes. Les 4 mélanges (cellules + plasmides) sont incubés 30 minutes sur glace puis 5 minutes à 37°C et enfin une nouvelle fois sur glace pendant 2 minutes. Après l'ajout de 1 ml de

SOC dans chaque tube, ces derniers sont incubés pendant 1h à 37°C avec agitation et 100 µL de chaque tube est étalé sur une boîte de LB amp50 et incubé à 37°C pendant toute la nuit. En parallèle un mélange de cellules BL21(λDE3) compétentes sans ADN est également étalé sur boîte LB amp50 servant de témoin négatif. Le lendemain, une colonie est choisie pour chaque plasmide et incubée dans 4 mL de LB amp50 pour toute la nuit. Enfin, 1 mL de chacune des cultures de BL21(λDE3) porteuses des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 ou pLM4 est additionné de 600 µL de glycérol 40% et conservée à -80°C.

2.2.2 Surproduction de MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his à petite échelle

Afin de vérifier que les plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 surproduisent respectivement les protéines recombinantes MurF-his10, MurE-his10, MurD-his10 et MurC-his10 en quantité suffisante dans les cellules de BL21(λDE3) et dans les conditions de surproduction précédemment optimisées [190], , une surproduction à petite échelle est réalisée. Pour cela, les souches de BL21(λDE3) portant les plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 sont chacune étalées sur un milieu solide LB amp50 et incubées pour la nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie est prélevée pour chaque boîte et ensemencée dans une fiole Erlenmeyer contenant 20 ml de LB amp50, et incubée à 37°C avec agitation jusqu'à atteindre une DO à 600nm de 0,5 correspondant à la phase exponentielle. Afin de maximiser la surproduction, les cellules sont par la suite lavées de leur milieu en les centrifugeant à 4°C pendant 10 minutes à 10000 x g et les culots cellulaires suspendus dans 20 ml de milieu frais de LB amp50 additionné de 1mM d'IPTG, afin d'induire la production de la protéine recombinante. Chacune des 4 fioles est alors incubée à 37°C avec agitation pendant 6h et les cultures sont par la suite centrifugées à 4°C pendant 15 minutes à 10000 x g et les culots cellulaires sont conservés à -80°C. Au moment opportun, les culots sont décongelés sur glace, suspendus dans 200 µL de PBS pH 7,4 (Na₂HPO₄ 1,44g, KH₂PO₄ 0,24g, NaCl 8g, KCl 0,2g, H₂O 800mL) et lysés par sonication. Les lysats sont centrifugés 5 min à 18000 x g à 4°C et le surnageant est récupéré et mis sur glace.

- SDS-PAGE

Afin d'évaluer la quantité relative produite des protéines recombinantes MurC-his10, MurD-his10, MurE-his10 et MurF-his10 par rapport à la production protéique totale par les cellules BL21(λ DE3), porteuses respectivement des plasmides pLM4, pLM3, pLM2 et pLM1, le surnageant des lysats cellulaires est migré sur gel de polyacrylamide par la technique SDS-PAGE. Pour cela, 20 μ l de chaque surnageant est mélangé à un volume égal de tampon de charge 2X #1610737 de la compagnie Bio-Rad® et 1:40 de volume de 2-Mercaptoéthanol #M6250 de la compagnie Sigma®. Les mélanges sont alors chauffés à 95°C pendant 5 min et un volume de 15 μ l de chaque mélange est déposé dans les puits d'un gel de polyacrylamide composé de 4% d'acrylamide pour le compactage, et de 12% d'acrylamide pour la séparation. Aussi, un volume de 10 μ L de marqueur de poids moléculaire allant de 250 à 10 kDa #1610363 de la compagnie Bio-Rad® est déposé dans le premier puit. Le système d'électrophorèse est alors soumis à une tension électrique de 120V, le temps que les échantillons traversent le gel de compactage, puis à 180V jusqu'à ce que le tampon d'échantillon traverse la totalité du gel. Le gel est alors coloré au bleu de Coomassie pendant 40 minutes et lavé avec agitation toute la nuit dans une solution de lavage (Ethanol 100% 100 ml, acide acétique 100 ml, H₂O 800 ml).

2.2.3 Surproduction à grande échelle de MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his

Après confirmation par SDS-PAGE de la surproduction des protéines recombinantes MurC-his10, MurD-his10, MurE-his10 et MurF-his10 dans les cellules de BL21(λ DE3) portant respectivement les plasmides pLM4, pLM3, pLM2 et pLM1, la surproduction à plus grande échelle permettant d'obtenir des quantités suffisantes de protéines recombinantes pour la suite de l'étude, peut alors être réalisée. Elle est effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie 2.2.2, mais dans un volume final de 2,4 L de milieu de culture pour chaque souche. Après 6 heures d'incubation, un échantillon de 3 ml de chaque culture est incubé sur glace tandis que le reste des cultures est centrifugé pendant 15 minutes à 25000 x g à 4°C. Les surnageants sont jetés et les culots cellulaires sont conservés à -80°C. L'échantillon de 3 ml de culture prélevée préalablement est alors quant à lui centrifugé à 22000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est suspendu dans 200 μ l de PBS et lysé par sonication. Le lysat est

alors analysé par SDS-PAGE et la surproduction est confirmée par la présence d'une importante bande protéique ayant un poids moléculaire correspondant à celui de la protéine d'intérêt et la proportion de la protéine recombinante par rapport à la quantité protéique totale est évaluée par observation du gel à l'œil nu.

2.3 Purification des protéines MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his

2.3.1 Lyse des cellules de *Escherichia coli* BL21(λ DE3).

Les culots cellulaires des souches porteuses des plasmides pLM1, pLM2, pLM3 et pLM4 sont lentement décongelés sur glace. Après décongélation, chacun des 4 culots est suspendu dans 30 ml d'une solution de lyse (Tris 1M pH 8 1,5mL, lysozyme 3 mg, eau 28,5 mL) dans laquelle est ajouté 1 mL d'un cocktail d'inhibiteur de protéases # p858549 de la compagnie Sigma®. Le mélange est alors agité au vortex pendant 10 secondes et incubé sur glace pendant 30 minutes. Les cellules sont lysées en réalisant 5 passages à la presse à piston en chambre froide et l'efficacité de lyse est vérifiée par microscopie. Le lysat est alors centrifugé à 22000 x g pendant 1h à 4°C et le surnageant récupéré. La concentration protéique totale de ce dernier est déterminée par la méthode de Bradford, et le lysat est stérilisé par filtration et conservé à 4°C pour la nuit.

2.3.2 Purification des protéines par chromatographie d'affinité sur résine de nickel.

Du fait de l'affinité des atomes de nickel avec les atomes d'azote du cycle imidazole des acides aminés histidine, et de la capacité de l'imidazole à rompre cette affinité par compétition [191], les protéines MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his qui sont fusionnées à une étiquette 10 histidines sont purifiées des autres protéines grâce à ce principe. Une résine chromatographique sur laquelle sont chélatés des atomes de nickel est utilisée. Ainsi, après avoir préalablement calculé la quantité totale des protéines présentes dans le lysat cellulaire (section 2.3.1), et évalué la proportion des Mur ligases par rapport à la production protéique totale (section 2.2.3), la

quantité de protéines d'intérêt peut alors être évaluée afin de déterminer le volume de résine nécessaire.

A- Purification de MurF

Pour la purification de la protéine MurF, 10 ml de résine de nickel HisPur™ #88222 de la compagnie ThermoFisher® répartie dans 4 colonnes de chromatographie (2,5 ml de résine pure par colonne) par gravité de la compagnie BioRad® ont été utilisés. Ainsi, en chambre froide à 4°C, 5 ml de résine sont versés (50% éthanol 50% résine) dans chacune des 4 colonnes fixées à un support. Le bouchon de fermeture du dessous est alors retiré afin que l'éthanol s'échappe de la résine par effet de gravitation puis la résine est équilibrée en ajoutant 5 ml (2 fois le volume de la résine) de tampon d'équilibrage (20 mM phosphate de sodium, 300 mM chlorure de sodium, 10 mM d'imidazole, pH 7,4). Après écoulement total du tampon d'équilibrage, le lysat laissé à 4°C (section 2.3.1) est mélangé avec un volume égal de tampon d'équilibrage et l'ensemble est réparti équitablement entre les 4 colonnes. Après écoulement total du lysat (récupéré dans des tubes), il est passé une deuxième fois dans les colonnes, puis récupéré et gardé à 4°C pour une analyse ultérieure afin d'évaluer la qualité de rétention de la protéine MurF-his par la résine. La résine est alors lavée à 3 reprises avec 5 ml (2 fois le volume de la résine) de tampon de lavage (20 mM phosphate de sodium, 300 mM chlorure de sodium, 25 mM d'imidazole, pH 7,4) ayant une faible concentration d'imidazole, pour éliminer les faibles interactions qui pourraient exister entre les atomes de nickel et les histidines portées par d'autres protéines cellulaires. Pour chacun des 3 lavages, le tampon écoulé est récupéré individuellement et laissé à 4°C pour analyse ultérieure de la qualité du lavage. À ce stade, les protéines MurF fusionnées à une étiquette 10 histidines sont fixées aux atomes de nickel chélatés à la résine. Pour les décrocher, les protéines sont éluées en utilisant 5 ml (2 fois le volume de la résine) de tampon d'éluion fortement concentré en imidazole (20 mM phosphate de sodium, 300 mM chlorure de sodium, 250 mM d'imidazole, pH 7,4) qui va perturber les liaisons entre les atomes de nickel et les étiquettes 10 histidines, par compétition. Le tampon d'éluion est ajouté de manière séquentielle (6 volumes de 0,5 ml et 2 volumes de 1 ml) afin que l'éluât soit récupéré en différentes fractions. Ces fractions sont par la suite analysées par SDS-PAGE, et celles contenant les protéines MurF avec une pureté et une concentration satisfaisante sont regroupées et mélangées.

- Dialyse dans le tampon de conservation

Dans le but d'éliminer l'imidazole qui pourrait interférer avec les expériences à venir, et de transférer les protéines dans un milieu non dénaturant et stable permettant leur conservation à long terme, les éluats sélectionnés sont injectés dans une cassette de dialyse « *Slide-A-LyzerTM* #66380 » de la compagnie ThermoFisher®. La cassette est déposée dans un bécher contenant 5 L de tampon de conservation (50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM Dithiothréitol pH 7,4) et est dialysée avec agitation pendant toute une nuit, en chambre froide à 4°C. Le lendemain, la cassette est transférée dans un autre bécher contenant 5 L de tampon de conservation frais et est de nouveau dialysée pendant 4h. Le contenu de la cassette est récupéré et la concentration protéique est calculée par la méthode de Bradford afin de déterminer si la concentration est satisfaisante ($\geq 2\text{mg/mL}$). Du glycérol (15% concentration finale) est alors ajouté et le contenu récupéré est aliquoté dans des tubes de 0,5 ml en volumes de 10 μl (50% du volume total) et de 100 μl (pour l'autre moitié). Enfin, les tubes sont conservés à -80°C pour utilisation ultérieure.

B- Purification murE-his10

La purification et la conservation de la protéine recombinante murE-his10 a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie 2.3.2.A, mais cependant avec les modifications suivantes afin d'en améliorer la pureté :

En plus des 3 lavages réalisés avec le tampon de lavage contenant 25 mM d'imidazole, des lavages supplémentaires de la résine de nickel sont effectués comme suit :

- 2 lavages avec un tampon de lavage contenant 45 mM d'imidazole (5 ml pour chaque lavage)
- 2 lavages avec un tampon de lavage contenant 70 mM d'imidazole (5 ml pour chaque lavage)

L'écoulement de chacun de ces lavages est récupéré et conservé à 4°C pour analyse ultérieure de la qualité du lavage. L'intérêt de ces lavages supplémentaires est d'augmenter de manière séquentielle la concentration d'imidazole afin de détacher les protéines ayant une affinité avec le nickel contenu dans la résine, sans pour autant décrocher les protéines d'intérêt porteuses d'étiquettes 10 histidines.

C- Purification murD-his10

La purification et la conservation de la protéine recombinante murD-his10 a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans les sections 2.3.2.B.

D- Purification murC-his10

Une première tentative de purification de la protéine recombinante murC-his10 a été réalisée dans les mêmes conditions que celles énumérées dans la section 2.3.2.B avec une étape de lavage supplémentaire, à l'aide d'une solution contenant 100 mM d'imidazole. Suite à la précipitation de la protéine après dialyse dans le tampon de conservation (50mM HEPES, 10mM MgCl₂, 2,5mM dithiothréitol), le changement suivant a été apporté afin d'éviter la précipitation de la protéine :

- La deuxième dialyse a été réalisée dans un tampon de conservation différent (400 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10mM MgCl₂, 5mM dithiothréitol, 15% glycérol, pH 9).

Après la dialyse, la concentration des protéines purifiées s'est avérée trop faible (500 µg/mL) et les protéines ont donc été concentrées afin d'atteindre une concentration de 2 mg/mL. Pour cela, le mélange de protéines purifiées a été introduit dans un tube de concentration *Pierce® Concentrator 9K MWCO # 87748* de la compagnie ThermoFisher et le tube a été centrifugé à 20000 x g jusqu'à ce que les 3/4 du volume aient traversés le filtre. Les protéines concentrées ont été récupérées et leur concentration confirmée par la méthode de Bradford.

2.4 Sélection de peptides ayant une affinité pour les mur ligases par la technique de présentation phagique

2.4.1 Protocole de la technique de présentation phagique sur les mur ligases

a) Activation des mur ligases

Afin que les mur ligases adoptent une conformation active leur permettant de lier leurs substrats peptidiques, les protéines sont incubées dans 1 ml d'une solution d'ATP (1mM ATP, TBS pH 8,6) avec rotation pendant 30 minutes à température pièce.

b) Fixation des Mur ligases

Afin de sélectionner les peptides ayant une affinité pour les Mur ligases par la technique de présentation phagique, les protéines sont fixées sur des billes magnétiques enduites de nickel *Ni-NTA Magnetic agarose Beads #36113* de la compagnie QIAGEN®, cela grâce à l'affinité qui existe entre l'étiquette 10 histidines fusionné aux Mur ligases et les atomes de nickel. Ainsi, après incubation des protéines avec l'ATP, 10 µl de la solution, correspondant à 10^{12} unités protéiques (molécules), sont prélevés et ajoutés à une solution de 990µl TBST 0,1% (TBS Tween 20) contenant 15 µl de billes magnétiques enduites de nickel lavées préalablement à deux reprises avec une solution de TBS. Le mélange est incubé 1 h à température pièce avec rotation. Les billes sont alors lavées 3 fois avec un tampon de lavage en magnétisant les billes avant chaque lavage et en retirant la solution à l'aide d'une micro pipette.

c) Pre élimination des peptides ayant une affinité pour le nickel

Dans le but d'éliminer les peptides des deux banques Ph.D.-12 et Ph.D.-C7C (Tableau IX) qui pourraient avoir une affinité pour le nickel, les deux banques de phages utilisées sont incubées avec des billes enduites de nickel et les phages portant des peptides qui ne se lient pas au nickel sont récupérés. Pour cela, 10 µl de la banque de phages, correspondant à une quantité de 10^{11} phages, sont ajoutés à 490µl de TBST 0,1% contenant 25 mM d'imidazole et 15µl de billes magnétiques enduites de nickel préalablement lavées. Le mélange est incubé avec rotation

pendant une heure à température pièce, et les billes sont magnétisées. Enfin, les 500 µl de phages sont récupérés à la micropipette.

Tableau IX : Banques peptidiques utilisées

Banque	Phage	Diversité peptidique	Taille et forme des peptides	Concentration phagique
Ph.D.-12 (NewEnglandBiolabs® #E8110S)	M13	10 ⁹	Peptides linéaires de 12 acides aminés	10 ¹³ phages/ml
Ph.D.-C7C (NewEnglandBiolabs® #E8120S)	M13	10 ⁹	Peptides circulaires de 7 acides aminés	10 ¹³ phages/ml

d) Ronde de présentation phagique

Les 500 µl de phages récupérés dans la partie 2.4.1.c sont ajoutés aux billes magnétiques de la partie 2.4.1.b sur lesquelles les Mur ligases sont fixées et l'ensemble est incubé avec rotation pendant 1 heure à température ambiante. Les billes sont lavées à 10 reprises avec un tampon de lavage selon la condition testée (Tableau X). Enfin, les billes sont éluées avec 500 µl de tampon d'éluat selon la condition testée (Tableau X). Les billes de nickel sont alors magnétisées et l'éluat est récupéré à l'aide d'une micropipette et est conservé à 4°C.

Tableau X : Solutions de lavage et méthodes d'élution des phages

Type de tampon	Composition du tampon	Méthode d'utilisation
Lavage classique	TBS, 0,1% Tween 20, 25 mM Imidazole	10 lavages
Lavage optimisé	5 M NaCl, 0,5% Tween 20, 25 mM Imidazole	10 lavages
Elution classique	0.2 M glycine-HCl pH 2,2	Incubation pendant 18 minutes avec rotation et le pH est neutralisé avec une solution de 1 M Tris-HCl, pH 9,1
Elution optimisée	0.5 M imidazole pH 8	Incubation pendant 1 h avec rotation

e) Titration phagique

Pour calculer le titre phagique, les éluats sont dilués en série (1/10) dans du LB jusqu'à la dilution voulue. En parallèle, 20 ml de LB est inoculé avec une colonie de *Escherichia coli* ER2738 (Tableau VI) et est incubé à 37°C avec agitation jusqu'à atteinte d'une densité optique à 600 nm de 0,5. Une fois la densité optique atteinte, trois volumes de 200 µl de cellules d'*Escherichia coli* sont prélevés et chaque volume est infecté avec 100µl d'une dilution de phages pendant 2 minutes. Les cellules infectées sont par la suite mélangées à 3 ml d'agar top fondu et le tout est coulé sur des boîtes LB agar IPTG/Xgal (Tableau VII) et incubées à 37°C pour 48h. Enfin, les plages de lyses sont comptées et la concentration phagique calculée.

f) Amplification des phages

Pour amplifier les phages élués, 20 ml de LB est inoculé avec 200 µl d'une culture de nuit de *Escherichia coli* ER27382. L'ensemble de l'éluat est ajouté et la culture est incubée à 37°C avec agitation pendant 5 heures. La culture est par la suite centrifugée à 22000 x g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est de nouveau centrifugé afin d'éliminer toute trace de cellules résiduelles.

g) Précipitation des phages

Cinq ml d'une solution de précipitation (2,5M NaCl, 20% PEG-8000) sont ajoutés aux phages amplifiés et le tube est mélangé au vortex et incubé à 4°C pour la nuit. Le lendemain le tube est centrifugé à 20,000g pendant 15 minutes à 4°C et le culot est suspendu dans 1 ml de TBS et transféré dans un nouveau tube. Le tube est brièvement centrifugé afin d'éliminer tout débris cellulaires potentiel et le surnageant est transféré dans un nouveau tube auquel est ajouté 200 µl d'une solution de précipitation (2,5M NaCl, 20% PEG-8000) puis est incubé sur glace pendant 1h. Le tube est par la suite centrifugé à 22,000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant jeté. Le tube est de nouveau centrifugé et le surnageant restant est retiré à la micropipette. Enfin le culot est suspendu dans 200 µl de TBS, titré et conservé à 4°C.

2.5 Evaluation de l'affinité des peptides sélectionnés par ELISA

2.5.1 Préparation des clones phagiques

Une sélection de 20 clones phagiques de chaque sélection peptidique sont amplifiés en préparant une plaque de titration de sorte qu'il y ait entre 20 et 100 plages de lyse. A l'aide de pics stériles, 20 plages de lyse sont prélevées et chacune transférées dans des tubes de culture contenant 1 ml d'une culture de nuit de *Escherichia coli* ER2738 diluée 1/100. Les tubes sont incubés à 37°C avec agitation pendant 5h. Les cultures sont alors transférées dans des microtubes et centrifugées à 22,000g à 4°C pendant 30 minutes. Les surnageants sont récupérés et recentrifugés. Un volume correspondant à 80% de la partie supérieure des surnageants est récupérée à l'aide d'une micropipette et transférée dans un nouveau tube. Chaque clone est alors précipité tel que décrit dans la partie 2.4.1.g.

2.5.2 ELISA

- Préparation de la plaque

Pour chaque clone testé, une rangée de 12 puits d'une plaque de 96 puits enduits d'atomes de nickel #786-749 de la compagnie G-Biosciences® est remplie d'une solution de 0,1M NaHCO₃ pH 8,6 (200 µl par puit) contenant une concentration de 25µg/ml de chacune des Mur ligases

(MurC, MurD, MurE et MurF). La plaque est incubée à 4°C pour la nuit dans une boîte hermétique humidifiée. Le lendemain la plaque est vidée en l'agitant vers le bas et le résidu de solution restant dans les puits est dégagé en claquant la plaque à plusieurs reprises face en bas contre un papier buvard et en prenant soin de la diriger vers une partie inutilisée du papier à chaque fois. La rangée de puits est remplie (300 µl par puit) avec une solution de blocage (0,1M NaHCO₃, 5 mg/ml BSA) afin de bloquer les sites aspécifiques. De plus, une rangée de puits sur la même plaque sans Mur ligases est également bloquée avec la solution de blocage afin de tester la liaison de chaque peptide au BSA et au plastique, et la plaque est incubée à 4°C pendant 2 heures. En parallèle, une rangée de 12 puits d'une plaque de 96 puits non enduite de nickel est bloquée avec la solution de blocage dans les mêmes conditions et sera utilisée pour réaliser les dilutions phagiques. Les puits sont par la suite vidés de la solution de blocage et lavés 6 fois avec une solution de TBST 0,1% en vidant et claquant les plaques à plusieurs reprises sur des parties non utilisées de papier buvard entre chaque lavage.

- Dilutions phagiques

Les dilutions de phages sont alors réalisées dans une solution de TBST 0,1% de telle manière à réaliser une dilution au 1 : 4 d'un puit à l'autre et d'avoir une quantité de 10¹² phages au premier puit et de 2x10⁵ phage dans le 12^e puit dans volume de 200µl par puit. A l'aide d'une pipette multicanaux, 100 µl de dilution est transféré dans la rangée de puits sur lesquels les Mur ligases sont fixées et les 100µl restants sont transférés dans la rangée de puits enduits de nickel sans Mur ligases. La plaque est alors incubée à température pièce pendant 1 heure avec agitation. Après incubation, la plaque est vidée et lavée 6 fois avec une solution de TBST 0,1%.

- Test ELISA

Des anticorps anti protéines pIII du phage M13 couplés à la peroxydase raifort HRP #11973-MM05T-H de la compagnie SinoBiological[®] sont dilués à la concentration de 0,4 µg /ml dans le tampon de blocage (0,1M NaHCO₃, 5 mg/ml BSA). 200 µl de la dilution d'anticorps est ajouté dans chacun des puits contenant ou pas de mur ligases, et la plaque est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec agitation. La plaque est par la suite vidée de la solution d'anticorps

et lavée à 6 reprises avec une solution de TBST 0,1% en vidant et claquant la plaque à plusieurs reprises sur des parties non utilisées de papier buvard entre chaque lavage.

Une solution de substrat HRP est préparée en joutant 36 μl de H_2O_2 30 % à 21 ml d'une solution d'ABTS (ABTS 22 mg, 26 mg citrate de sodium, 100 ml eau, pH 4). Un volume de 200 μl de substrat est ajouté dans chaque puit et la plaque est incubée 15 minutes à température pièce avec une légère agitation. La densité optique à 405 nm de chaque puit est mesurée au spectrophotomètre (Figure 15).

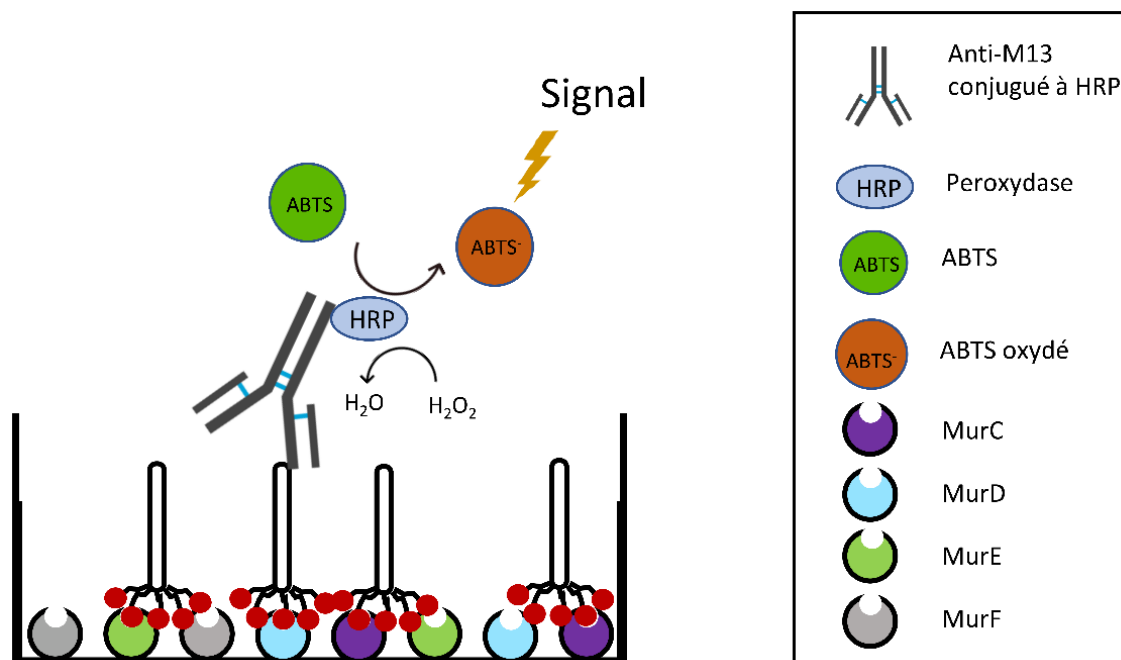


Figure 15 : Principe de la technique ELISA pour évaluer l'affinité des peptides pour les 4 Mur ligases. Plusieurs dilutions d'un clone phagique sont incubées dans des puits enduits de nickel où sont fixées les 4 Mur ligases en proportions égales. Après plusieurs lavages, des anticorps anti-pVIII du phage M13 conjugués à une HRP sont ajoutés dans les puits. Après une étape de lavages, l'ABTS ajouté est réduit par la HRP ce qui résulte sur une réaction colorimétrique dont l'intensité est quantifiée par spectrophotométrie.

2.6 Statistiques

Les statistiques de cette étude ont été calculées avec le logiciel GraphPad Prism 6 en réalisant des tests de Student et One way ANOVA.

3. Résultats

3.1 Clonage des gènes *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* et *murF-his10* de *P. aeruginosa* PAO1-l et PAO1-h dans un vecteur d'expression

Dans le but de surproduire et de purifier les protéines MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his, les gènes de *P. aeruginosa* codant pour ces protéines et fusionnés à une étiquette 10 histidine (*murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* de PAO1-l et *murF-his10* de PAO1-h) ont été clonés dans un vecteur d'expression pTB345 (Figure 14).

3.1.1 Vérification de la transformation des produits de ligation par digestion analytique

Suite à la transformation des produits de ligation dans les cellules de *Escherichia coli* DH5(α pir), le plasmide de chaque clone obtenu est purifié et analysé par digestion analytique afin de confirmer la présence de l'insert *murC-his10*, *murD-his10*, *murE-his10* ou *murF-his10*. Pour cela chaque plasmide est purifié, digéré, et migré sur gel d'agarose. La Figure 16 présente les résultats de la digestion analytique des plasmides issus des clones transformés par les produits de ligation des inserts *murC-his10* et *murE-his10* au plasmide pTB345 débarrassé de son insert d'origine *mrcA*.

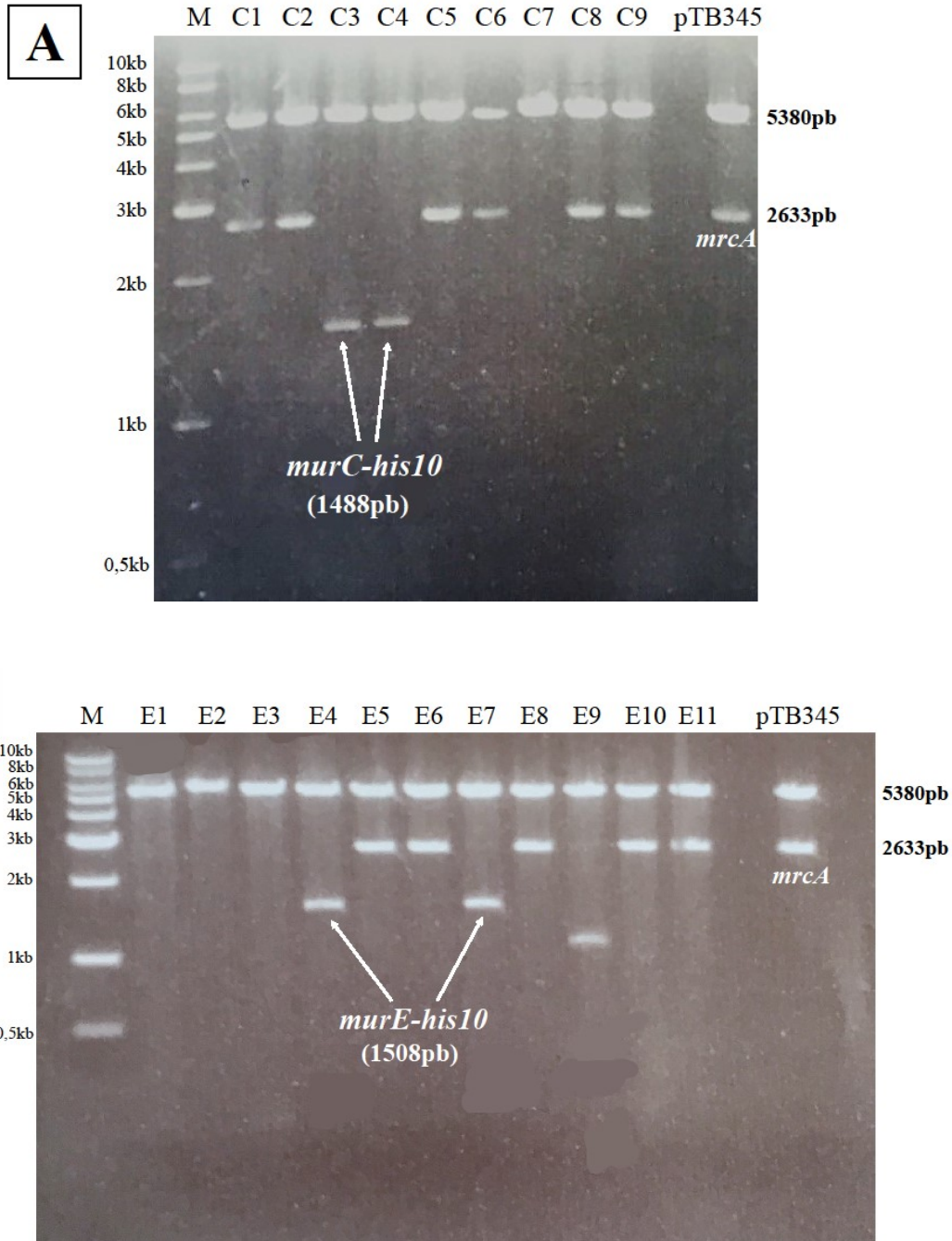


Figure 16 : Sélection par digestion analytique des plasmides issus de la transformation des produits de ligation dans *Escherichia coli* DH5(α pir). (A) : Digestion des plasmides C1 à C9 par les enzymes de restriction NdeI/HindIII et migration sur gel d'agarose. Les plasmides sélectionnés (C3 et C4) sont ceux portant l'insert *murC-his10*. (B) : Digestion des plasmides E1 à E11 par les enzymes de restriction NdeI/HindIII et migration sur gel d'agarose. Les plasmides sélectionnés (E4 et E7) sont ceux portant l'insert *murE-his10*. *mrcA* : insert du plasmide pTB345

La digestion analytique des plasmides issus de la ligation du gène *murC-his10* montre que seuls les plasmides C3 et C4 contiennent l'insert *murC-his10* correspondant à la taille de 1488 pb alors que tous les autres plasmides contiennent l'insert d'origine *mrcA* (Figures 14 et 16.A). Pour ce qui est de la digestion analytique des plasmides issus de la ligation du gène *murE-his10*, la migration des produits de digestion montre que seuls les plasmides E4 et E7 sont porteurs de l'insert *murE-his10* à la taille de 1508 pb tandis que les autres plasmides contiennent l'insert d'origine *mrcA* d'une taille de 2633 pb (Figures 14 et 16.B). Ainsi seuls les plasmides C3, C4, E4, E7 sont envoyés pour séquençage afin confirmer l'absence de modification dans la séquence nucléotidique des inserts.

3.1.2 Mutagenèse dirigée du plasmide pDL1

Lors d'une précédente tentative de lier l'insert *murD-his10* au plasmide pTB345, un plasmide (pDL1) a été construit dans le laboratoire. Après séquençage, il s'est avéré que ce plasmide portait un gène *murD* muté aux nucléotides 1359, 1360, 1361 et 1363. Au vu des difficultés rencontrées au cours de ce travail dans la construction des plasmides nécessaires à sa réalisation, il a été décidé de corriger les mutations présentes dans pDL1 par mutagenèse dirigée. Afin d'y arriver, des amorces spécifiques ont été conçues dans le but de corriger ces mutations lors d'une amplification par PCR du plasmide pDL1 (Tableaux II et III). Pour cela 4 conditions de PCR où varient la quantité d'ADN matrice utilisée ainsi que la présence ou non de « *GC enhancer* » ont été réalisées. La migration sur gel d'agarose des produits de ligation de chaque PCR est présentée dans la Figure 17.

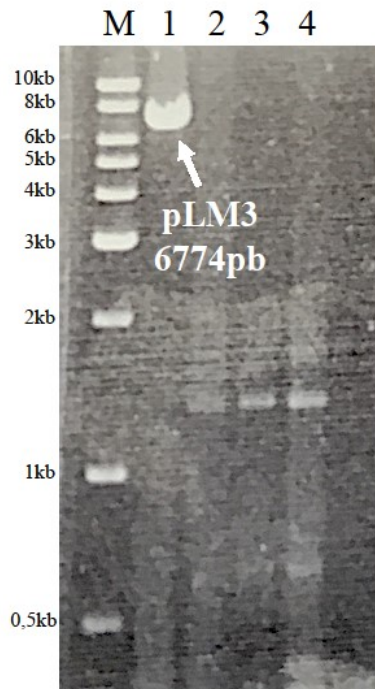


Figure 17 : Migration sur gel d'agarose des produits de PCR pour la mutagenèse dirigée de pDL1. 1 : 0.5ng de plasmide pDL1 et ajout de « *GC enhancer* ». 2 : 0.5ng de plasmide pDL1. 3 : 1ng de plasmide pDL1. 4 : 5ng de plasmide pDL1.

Parmi les 4 conditions testées, seul la PCR où est utilisé 0.5ng de pDL1 avec le « *GC enhancer* » a fonctionné avec la présence d'une bande correspondant au plasmide corrigé pLM3 à 6774 pb (Figure 17). Après séquençage et analyse des résultats par alignement de séquences avec un plasmide *in silico*, il a été confirmé que le plasmide pLM3 contient l'insert *murD-his10* sans aucune mutation. Ce dernier sera donc utilisé pour la suite de l'étude.

3.2 Surproduction des protéines MurF-his, MurE-his, MurD-his et MurC-his

3.2.1 Vérification de la surproduction

Après qu'il ait été vérifié que les plasmides précédemment sélectionnés ne contiennent aucune mutation, ils ont été transformés dans des cellules de *Escherichia coli* BL21(λ DE3) en vue de la surproduction des Mur ligases. Au préalable, un essai de surproduction à petite échelle est réalisé afin de confirmer la surproduction de chacune des 4 Mur ligases et de sélectionner un plasmide pour la surproduction à grand échelle de chacune des Mur ligases C, D, E et F. Les résultats de ces essais sont présentés dans la Figure 18.

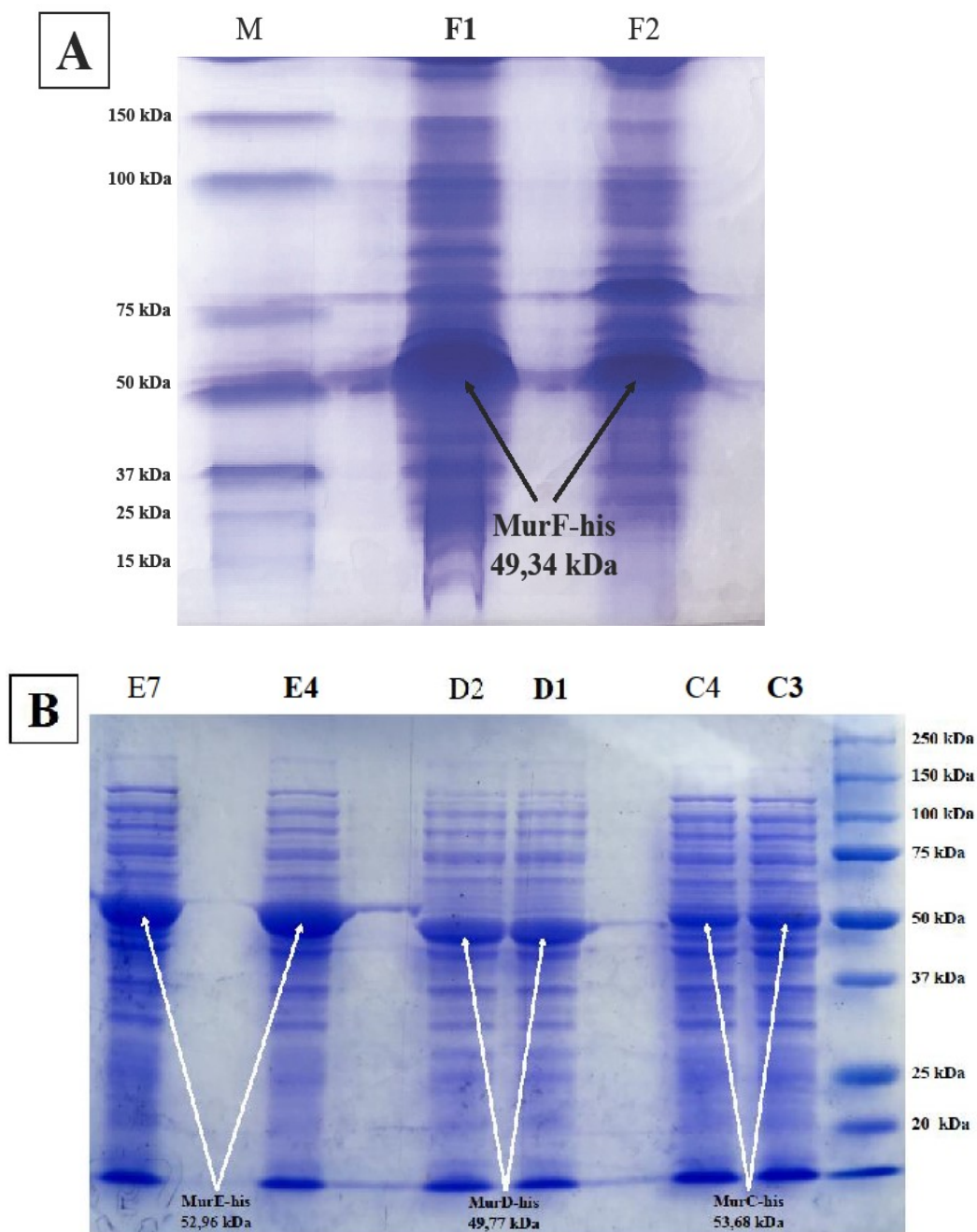


Figure 18 : Analyse par SDS-PAGE de la quantité relative de surproduction des 4 Mur ligases par les plasmides sélectionnés. (A) : Surproduction à petite échelle de la protéine MurF-his par *Escherichia coli* BL21(λ DE3) transformées par les plasmides F1 et F2 (en gras est le plasmide sélectionné pour la surproduction) (B) : Surproduction à petite échelle des protéines MurC-his, MurD-his et MurE-his respectivement par les paires de plasmides C3/C4, pLM3 et E4/E7 transformés dans des cellules de *Escherichia coli* BL21(λ DE3) (en gras sont les plasmides sélectionnés pour la surproduction).

Les plasmides F1 et F2 surproduisent bien une protéine ayant un poids moléculaire proche de 50 kDa (Figure 18.A) ce qui correspond à la protéine MurF-his qui a un poids moléculaire de 49,34 kDa. Le plasmide F1 paraît cependant surproduire davantage cette protéine, et c'est donc ce plasmide (pLM1) qui sera utilisé pour les futures surproductions. Les plasmides C3/C4, pLM3 et E4/E7 surproduisent bien des protéines ayant une taille correspondant respectivement à MurC-his (53,68 kDa), MurD-his (49,77 kDa) et MurE-his (52,96 kDa) (Figure 18.B). Le plasmide E4 (pLM2) surproduit davantage et ce dernier est donc sélectionné pour la surproduction de MurE-his tandis que les plasmides C3 et C4 ne surproduisent pas la protéine MurC-his de manière satisfaisante. Il a donc été décidé d'optimiser les conditions de surproduction afin d'améliorer le rendement du plasmide C1 (pLM4).

3.2.2 Optimisation des conditions de surproduction de MurC-his

Afin d'optimiser la surproduction de la protéine MurC-his par les cellules de *Escherichia coli* BL21(λ DE3) porteuses du plasmide pLM4, différents paramètres d'incubation et d'induction de la surproduction ont été testés, les résultats sont présentés dans la Figure 19.

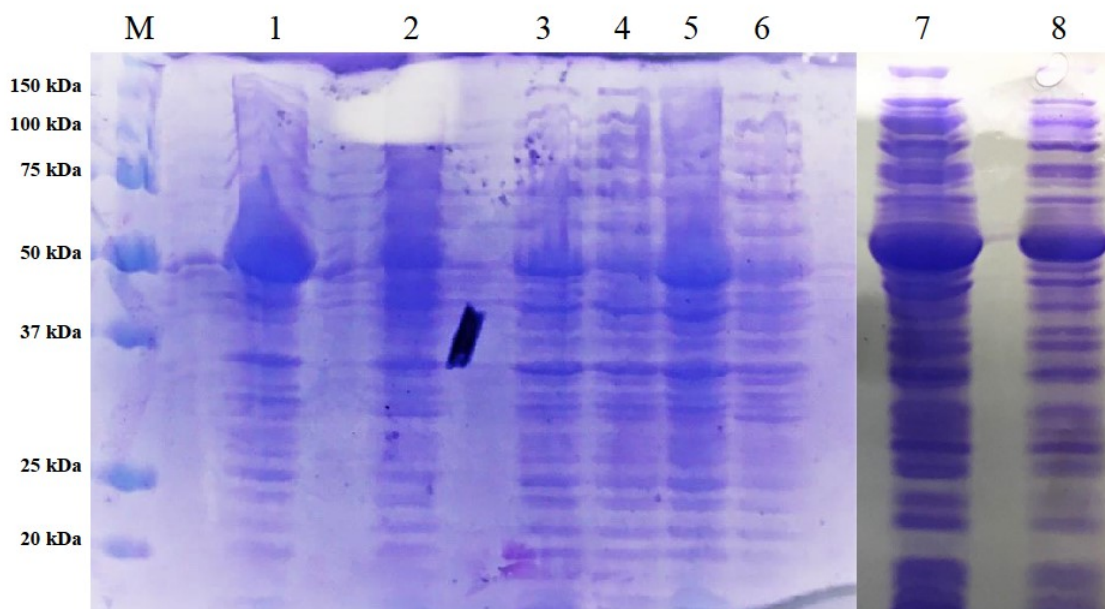


Figure 19 : Analyse par SDS-PAGE de la surproduction de la protéine MurC-his selon différentes conditions d'incubation et d'induction de la surproduction. 1 : Température d'incubation de 21°C. 2 : Température d'incubation de 30°C. 3 : Induction de la surproduction à DO_{600nm} de 0,3. 4 : Control (conditions classiques) 5 : Induction de la surproduction avec 250 μM d'IPTG. 6 : Surproduction toute la nuit. 7 : Incubation à température pièce et induction de la surproduction avec 200 μM d'IPTG. 8 : Incubation à température pièce et induction de la surproduction avec 1 mM d'IPTG.

Parmi les 8 conditions testées, la condition 1 (incubation toute la nuit à 21°C) permet la production la plus importante de la protéine MurC-his (Figure 19). Cependant, en raison de la faible capacité de charge de l'incubateur à 21°C du laboratoire, c'est la condition 7 (incubation à température pièce et induction de la surproduction avec 200 μM d'IPTG au lieu de 1 mM) qui est retenue.

3.3 Purification des Mur ligases

À la suite de la surproduction des 4 protéines MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his, ces dernières sont purifiées par chromatographie sur colonne d'affinité. Pour cela, les colonnes sont remplies avec une résine de nickel qui va capter les protéines d'intérêt du fait de la forte affinité qui existe entre les atomes de nickel contenus dans la résine avec les 10 acides aminés histidine fusionnés aux Mur ligases [191]. Une fois que le lysat cellulaire contenant le mélange protéique

total ait traversé la résine, la résine est lavée des protéines qui auraient une affinité moins importante pour le nickel que les protéines d'intérêt en utilisant un tampon de lavage faiblement concentré en imidazole (25 mM). En effet, l'imidazole permet d'affaiblir la liaison qui existe entre les atomes de nickel et le cycle imidazole des acides aminés histidine par effet de compétition [192], et une fois la résine lavée, les Mur ligases sont décrochées en faisant passer dans la colonne un tampon d'élution cette fois ci fortement concentré en imidazole (250 mM). Les fractions de lavages et sous fractions d'élution sont alors récupérées et analysées par SDS-PAGE afin d'évaluer la qualité des lavages et des éluions mais aussi de sélectionner les fractions d'élution contenant les protéines d'intérêt, avec une pureté et une quantité jugées satisfaisantes.

3.3.1 Purification de la protéine MurF-his

Après élution des protéines MurF-his de la colonne chromatographique, les fractions de lavages et les fractions d'élutions sont analysées par SDS-PAGE (Figure 20).

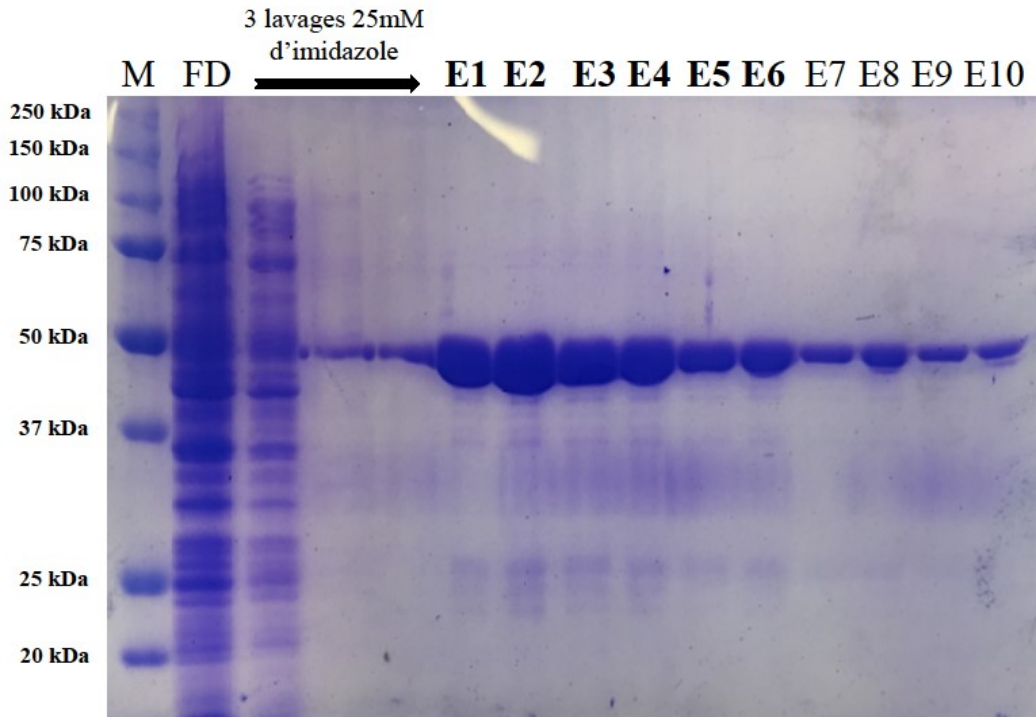


Figure 20 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine MurF-his. M : marqueur de poids moléculaire. FD : flux direct (lysate cellulaire). E1 à E10 : sous fractions de l'élution avec 250 mM d'imidazole (en gras sont représentées les sous fractions d'élution sélectionnées).

Dans l'analyse des fractions obtenues lors de la purification de la protéine MurF-his (Figure 20), on peut observer que les lavages ont permis l'élimination de la grande majorité des protéines contaminantes ce qui a permis de récupérer les protéines MurF-his avec une pureté satisfaisante dans les éluats. Cependant, afin d'avoir un stock de protéines purifiées le plus concentré possible, sans pour autant négliger la quantité, seules les fractions E1 à E6 sont récupérées et dialysées.

3.3.2 Purification de la protéines MurD-his

La protéine MurD-his a été purifiée dans des conditions identiques que celles utilisées lors de la purification de la protéine MurF-his avec cependant une différence au niveau des lavages. En effet, dans le but d'éliminer davantage de protéines contaminantes, les lavages sont réalisés avec un tampon contenant une concentration plus élevée en imidazole (35 mM) ce qui permet de

déstabiliser plus fortement les liaisons qui pourraient exister entre les acides aminés histidine des protéines contaminantes et les atomes de nickel de la résine, sans pour autant décrocher les protéines d'intérêt qui sont fusionnées a des étiquettes de 10 acides aminés histidine. Les fractions de lavages et fractions d'élutions ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 21).

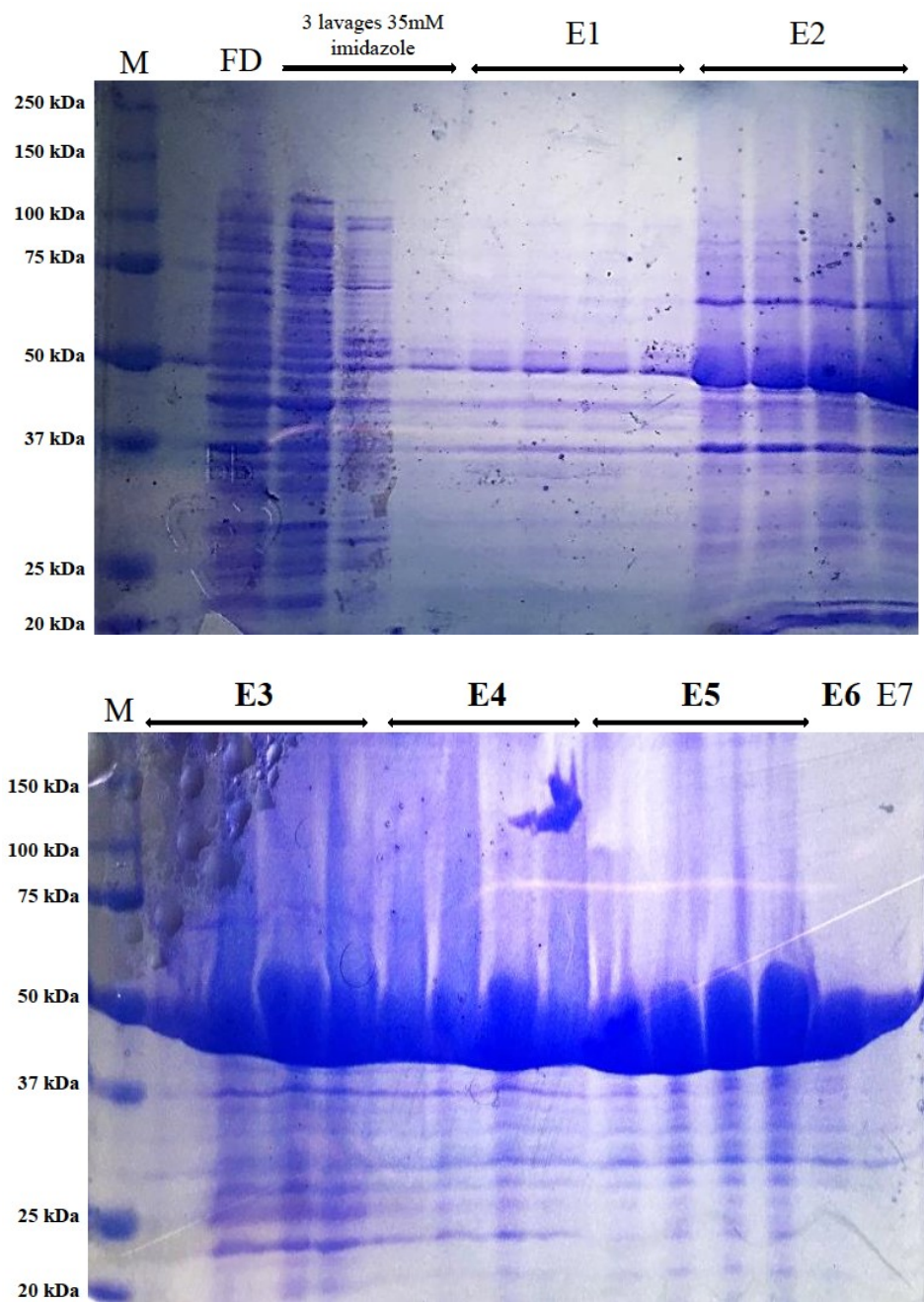


Figure 21 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élutions obtenues lors de la purification de la protéine MurD-his. M : marqueur de poids moléculaire. FD : flux direct. E1 à E7 : sous fractions de l'élution avec 250 mM d'imidazole (en gras sont représentées les sous fractions d'élution sélectionnées).

Les lavages à 35 mM d'imidazole ont permis de décrocher une grande partie de protéines contaminantes sans pour autant décrocher les protéines d'intérêt de manière significative (Figure 21). La fraction d'élution E2 montre la présence de deux protéines contaminantes majeures, une à 37 kDa et l'autre entre 50 et 75 kDa. Pour ce qui est des autres fractions d'élution, on observe la présence de protéines contaminantes en quantité relative moins importante, étant donné que la protéine d'intérêt MurD-his est présente à une forte concentration. Ainsi, seules les fractions E3 à E6 sont récupérées et dialysées.

3.3.3 Purification de la protéine MurE-his

Suite aux résultats observés lors de la purification de la protéine MurD-his (Figure 21), il a été décidé que la purification de la protéine MurE-his sera réalisée dans les mêmes conditions avec cependant des lavages supplémentaires à l'aide de concentrations plus importantes en imidazole. Ainsi, la résine de nickel a été lavée avec des tampons de lavages contenant 25, 50, 70 puis 100 mM d'imidazole ; le but étant de décrocher un maximum de protéines contaminantes sans pour autant décrocher la protéine d'intérêt MurE-his. Les fractions de lavages et fractions d'élution ont par la suite été analysées par SDS-PAGE (Figure 22).

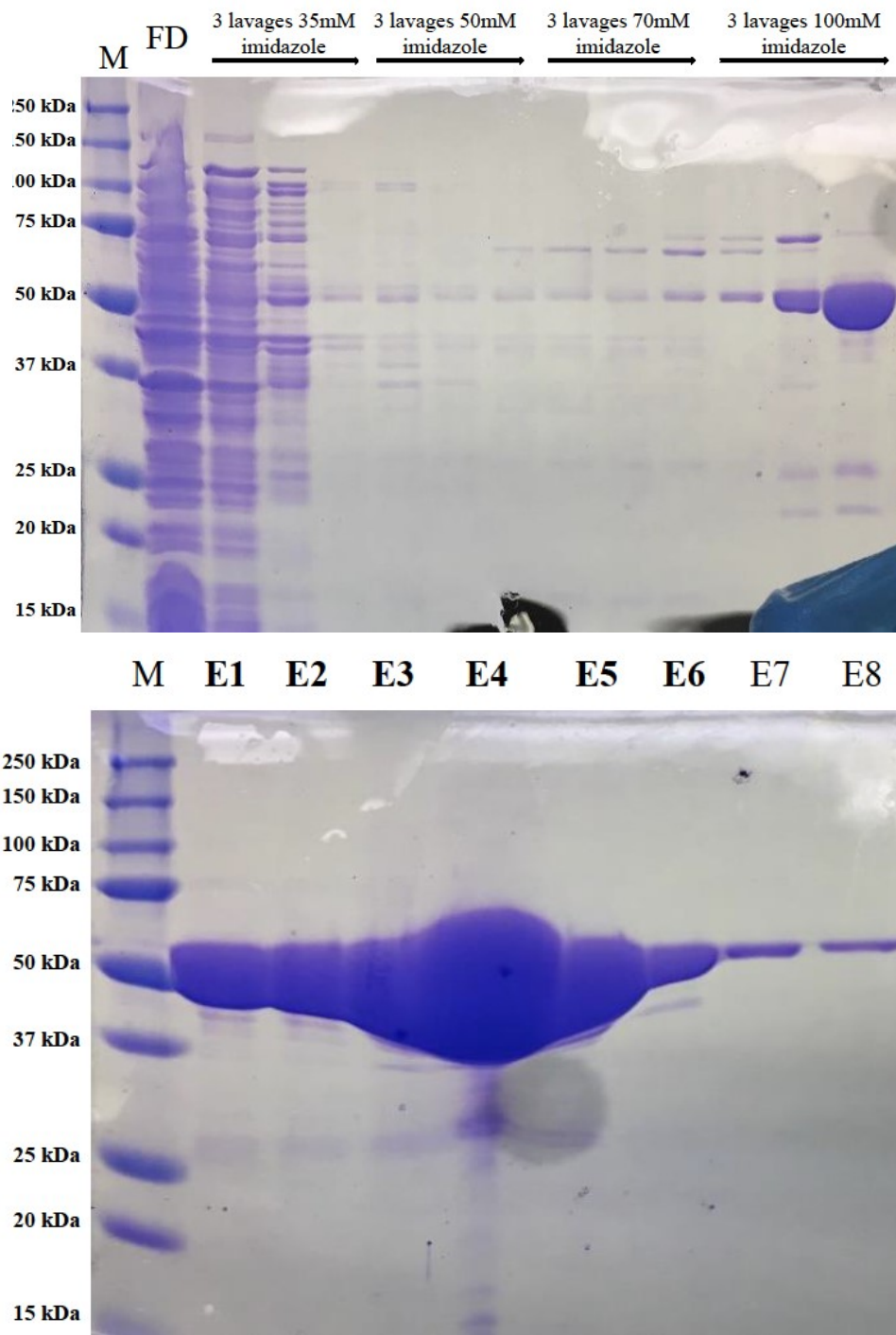


Figure 22 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine MurE-his. M : marqueur de poids moléculaire. FD : flux direct. E1 à E8 : sous fractions des éluions avec 250 mM d'imidazole (en gras sont représentées les sous fractions d'élution sélectionnées).

L'analyse des fractions de lavages et fractions d'élution (Figure 22) montre que jusqu'à 70 mM d'imidazole la protéine MurE-his n'est pas décrochée, tandis que d'autres protéines contaminantes ayant un poids moléculaire entre 50 et 75 kDa ont pu être éliminées de la résine de nickel. C'est à partir du lavage avec 100 mM d'imidazole que les protéines d'intérêt ont commencé à être décrochées, néanmoins ces lavages ont permis d'éliminer les dernières protéines contaminantes entre 50 et 70 kDa et d'autres protéines entre 20 et 25 kDa. Enfin, l'analyse des fractions d'élution montre que les protéines MurE ont été décrochées de façon abondante avec une pureté élevée pour les sous fractions E1 à E6. Ces fractions sont par conséquent récupérées et dialysées.

3.3.4 Purification de la protéine MurC-his

La purification de la protéine MurC-his a été réalisée dans des conditions identiques que celles décrites lors de la purification de la protéine MurE-his. La résine a été lavée de la même manière avec des tampons contenant des concentrations croissantes d'imidazole, et les fractions de lavages et sous fractions d'élution ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 23)

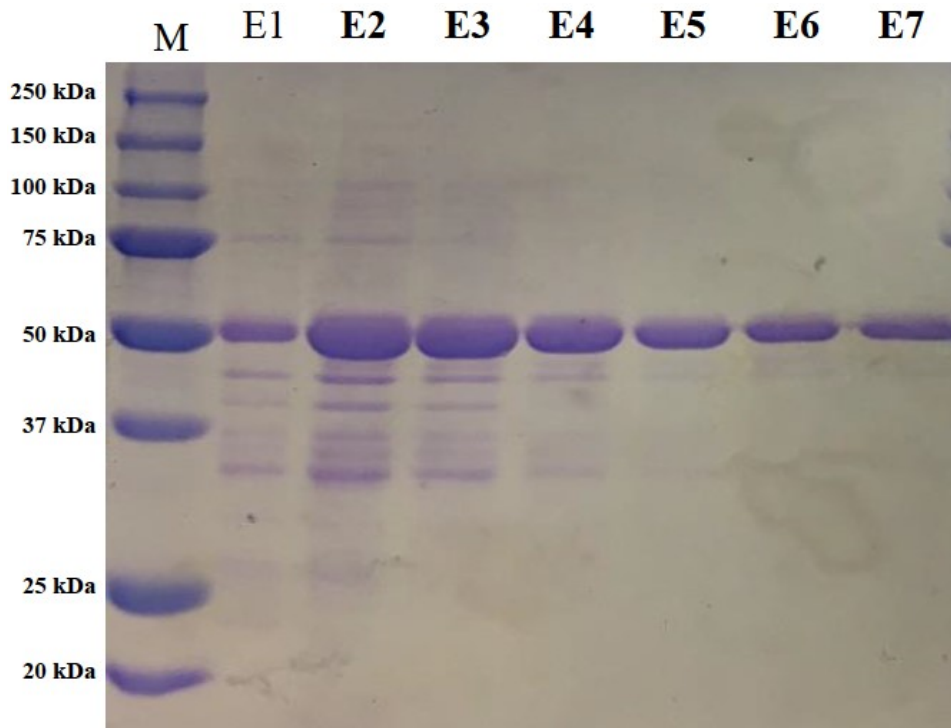
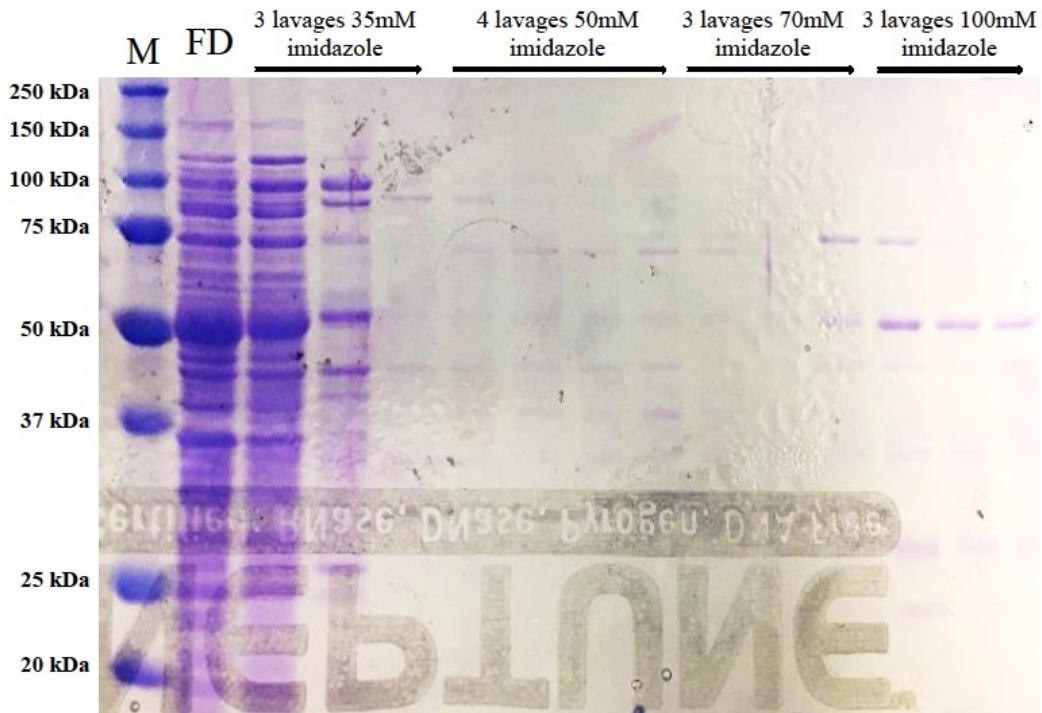
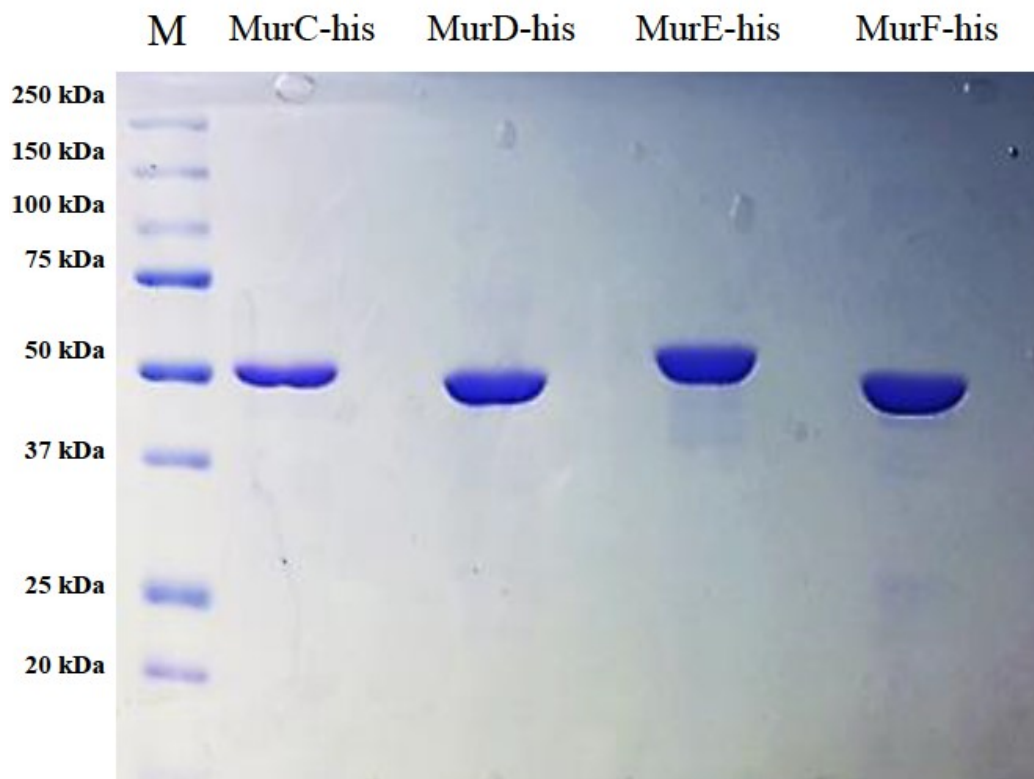


Figure 23 : Analyse par SDS-PAGE des fractions de lavage et sous fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine MurC-his. M : marqueur de poids moléculaire. FD : flux direct. E1 à E7 : sous fractions des éluions avec 250 mM d'imidazole (en gras sont représentées les sous fractions d'élution sélectionnées).

L'analyse des fractions de lavages (Figure 23) montre que l'élimination de la quasi-totalité des protéines contaminantes a eu lieu lors du lavage avec 35 mM d'imidazole, alors que les lavages avec des concentrations en imidazoles plus élevées montrent que très peu de protéines ont été décrochées, même si des protéines d'un poids moléculaire d'approximativement 70 kDa ont pu être éliminées de la résine de nickel. Pour ce qui est de l'élution, on observe dans les premières fractions, qu'en plus d'une faible quantité de protéines MurC-his décrochées, l'apparition de protéines contaminantes de poids moléculaire inférieur à MurC-his et n'ayant pas pu être éliminées de la résine lors des lavages, malgré l'utilisation d'une forte concentration d'imidazole (100mM).

3.3.5 Vérification du taux de pureté et calcul de la concentration des 4 Mur ligases purifiées

Une fois que les 4 mur ligases (MurC, D, E et F) ont été purifiées et dialysées, le taux de pureté a été analysé par SDS-PAGE (Figure 24.A) et leur concentration ont été calculées par la méthode de Bradford (Figure 24.B).

A**B**

Protéines	Concentration (mg/ml)	Quantité (mg)
MurC-his	1,9	29
MurD-his	9,5	76
MurE-his	7,5	64
MurF-his	9	73

Figure 24 : Taux de pureté et concentrations des Mur ligases. A : Vérification de la pureté par SDS-PAGE après purification des protéines MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his. B : Concentrations et quantités des protéines purifiées MurC-his, MurD-his, MurE-his et MurF-his.

La pureté des 4 Mur ligases est jugée satisfaisante avec un taux de pureté supérieur à 90% (Figure 24.A). Les concentrations et les quantités totales des protéines purifiées MurC-his, MurD-his MurE-his et MurF-his sont largement suffisantes pour la sélection de peptides avec la technique de présentation phagique (Figure 24.B).

3.4 Evaluation de l'efficacité et ajustement des conditions de la version optimisée de la technique de présentation phagique, dans le cadre de la sélection peptidique sur les Mur ligases.

La version optimisée de la technique de présentation phagique a pour but de sélectionner des peptides de plus grande et de meilleure affinité. Cela est réalisé en augmentant d'une part la stringence des lavages afin d'éliminer davantage de peptides de faible et moyenne affinité et en modifiant d'autre part le principe d'élution des phages afin de récupérer la totalité des peptides liés aux protéines cibles. Plus précisément, cette méthode permet d'éluer l'ensemble des complexes cible-peptide-phage afin de récupérer les peptides ayant la plus forte affinité pour la protéine cible, et qui ne pourraient pas être décrochés avec la méthode d'élution classique, basée sur l'utilisation de contraintes chimiques afin de décrocher le peptide de la cible (Figure 25).

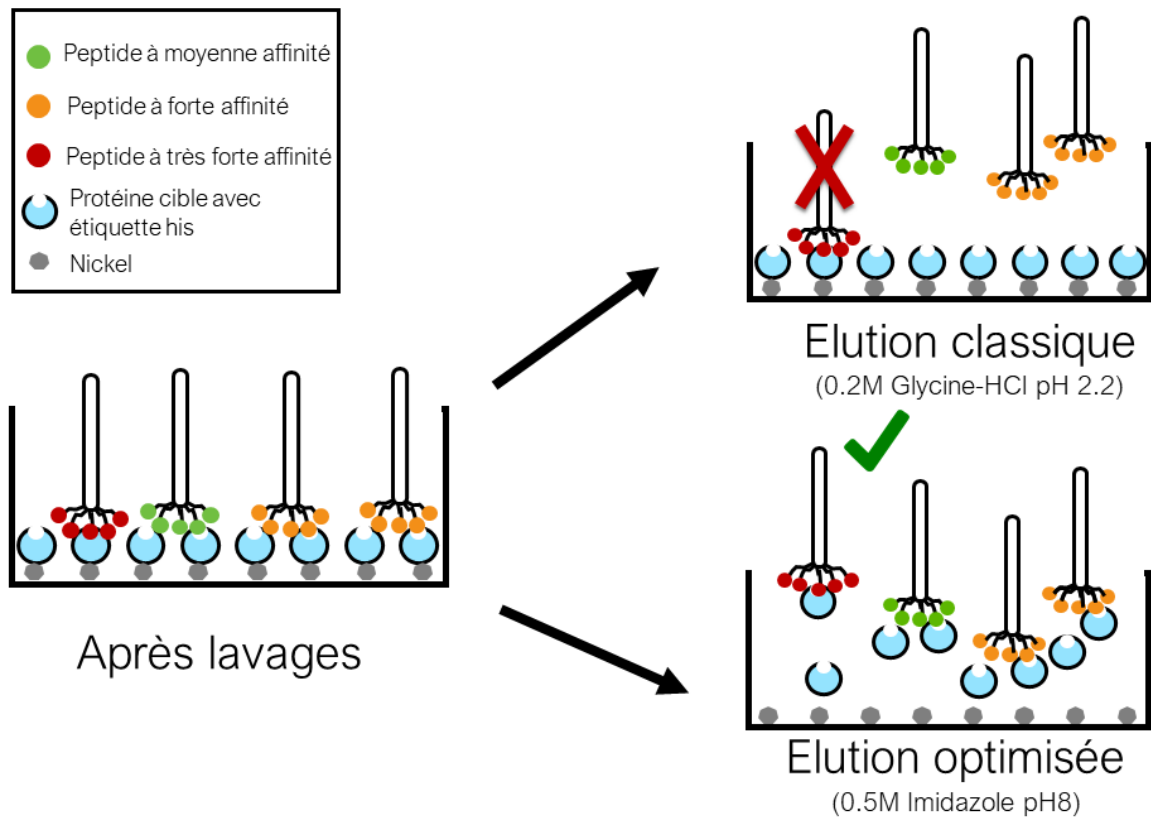


Figure 25 : Principe de la méthode d'éluion classique et de la méthode d'éluion optimisée. La méthode classique élue les phages fusionnés aux peptides grâce à un tampon acide qui rompt la liaison entre le peptide et la cible par une contrainte chimique. Cependant, les peptides ayant le plus d'affinité pour le ligand ne sont pas décrochés, et augmenter la force du tampon risque de détruire les phages. La méthode optimisée élue le complexe cible-peptide-phage ce qui permet de récupérer l'ensemble des peptides fusionnés à des phages restés viables.

3.4.1 Pré élimination des peptides ayant une affinité avec le nickel

Etant donné que du nickel est utilisé lors des rondes de présentation phagique, il est nécessaire de pré éliminer les peptides ayant une affinité pour le nickel. Pour cela, les phages de la banque peptidique sont pré-incubés avec des billes magnétiques enduites de nickel et seuls ceux ne s'étant pas accrochés à ces billes sont utilisés pour une ronde de présentation phagique.

Afin d'évaluer le nombre de ces peptides et l'impact de la pré-élimination sur la diversité peptidique, les phages récupérés de même que les phages décrochés à l'imidazole des billes de nickel, ont été titrés (Figure 26).

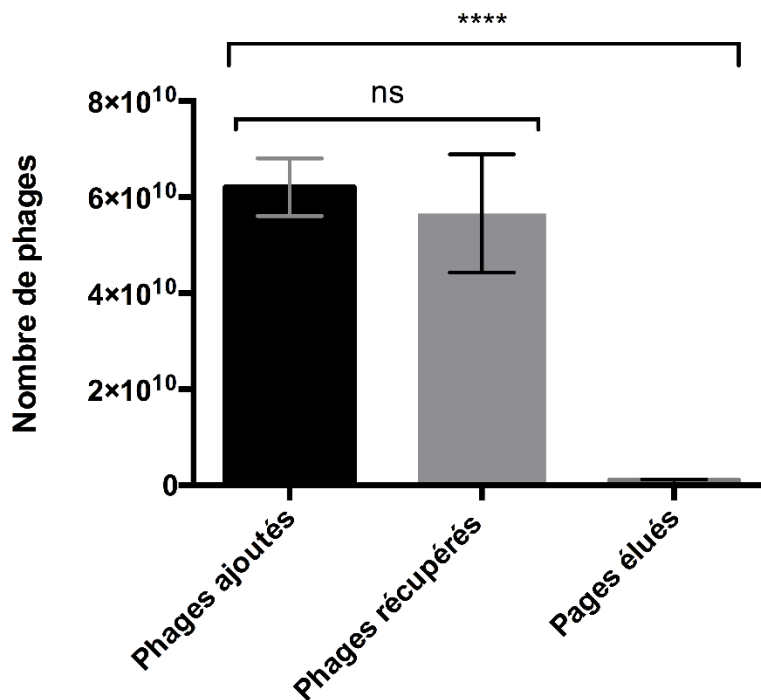


Figure 26 : Essai de pré élimination des peptides ayant une affinité avec le nickel. Les phages élués représentent les phages qui expriment des peptides ayant une affinité avec le nickel, alors que les phages récupérés sont les phages qui expriment des peptides qui ne se sont pas attaché aux billes enduites de nickel. ns : Différence statistiquement non significative ($p > 0,1$). **** : Différence statistiquement très significative ($p < 0,0001$). Statistiques calculées avec le test de Student.

Les résultats (Figure 26) montrent que le nombre de peptides ayant une affinité pour nickel représentent une très faible proportion de la diversité peptidique de la banque. En effet, le nombre de phages récupérés après incubation n'est pas significativement différents du nombre de phages incubés, et le nombre de phages élués du nickel représente une perte ayant un impact négligeable sur la diversité peptidique de la banque. De ce fait, l'étape de pré-élimination des peptides ayant une affinité pour le nickel est validée et sera utilisée avant chaque ronde de présentation phagique au cours de cette étude.

3.4.2 Évaluation de l'infectivité du phage M13 lié à plusieurs Mur ligases

Pour se multiplier, les bactériophages M13 infectent les cellules de *Escherichia coli* ER2738 par l'intermédiaire d'une des 5 copies de la protéine pIII présentes à leur surface et qui s'adsorbe sur le pilus de la bactérie (Figures 13 et 27.A). Cependant, en raison de la méthode d'éluion des phages à l'imidazole qui décroche les Mur ligases, cela qu'elles soient liées ou non à un phage, la question s'est posée de savoir si un phage ayant ses 5 peptides (peptides fusionnés aux protéines pIII) liés à des protéines de taille relativement importante tel que les mur ligases (\pm 50 kDa) peut toujours infecter de manière efficace les cellules de *Escherichia coli* ER2738 (Figure 27.B). En effet, étant donné que chaque phage est porteur de 5 peptides identiques, il y a un risque de perdre les phages qui expriment les peptides ayant la plus forte affinité pour les Mur ligases étant donné que ceux-ci ont plus de probabilité de lier les Mur ligases présentes sous forme libre dans l'éluât.

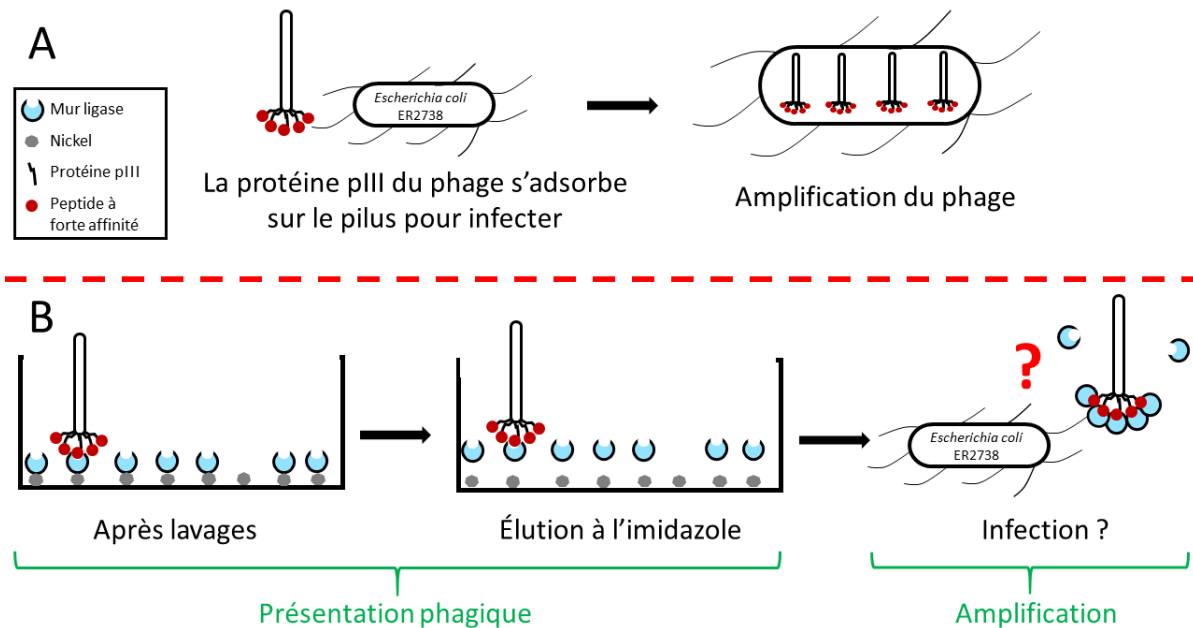


Figure 27 : Schéma explicatif résumant la problématique de l'infectivité du phage M13 lié à plusieurs Mur ligases. (A) Le phage M13 s'adsorbe sur le pilus F de *Escherichia coli* par l'intermédiaire de sa protéine pIII afin de l'infecter et de pouvoir s'amplifier. (B) Lors de l'élution à l'imidazole, les phages exprimant des peptides de très forte affinité pour les Mur ligases sont élués avec de nombreuses Mur ligases libres de tout peptide qui peuvent alors être fixées par les 4 autres peptides restés libres exprimés par le phage. La problématique posée est de savoir si un phage M13 ayant plusieurs ou l'ensemble de ses peptides (fusionnés à ses protéines pIII) liés à des Mur ligases est toujours capable d'infecter *Escherichia coli* de manière aussi efficace.

Pour répondre à cette question, une très faible quantité (10^4) de protéine MurF-his a été utilisée comme cible pour une ronde de présentation phagique afin de s'assurer qu'il y ait le moins possible de Mur ligases libres dans l'éluât. Après titration de l'éluât, une quantité croissante de la protéine MurF est ajoutée de manière séquentielle aux phages élués et ces derniers sont titrés après chaque ajout de protéines MurF afin d'observer l'effet de la liaison de Mur ligases aux peptides libres des phages sur leur infectivité (Figure 28).

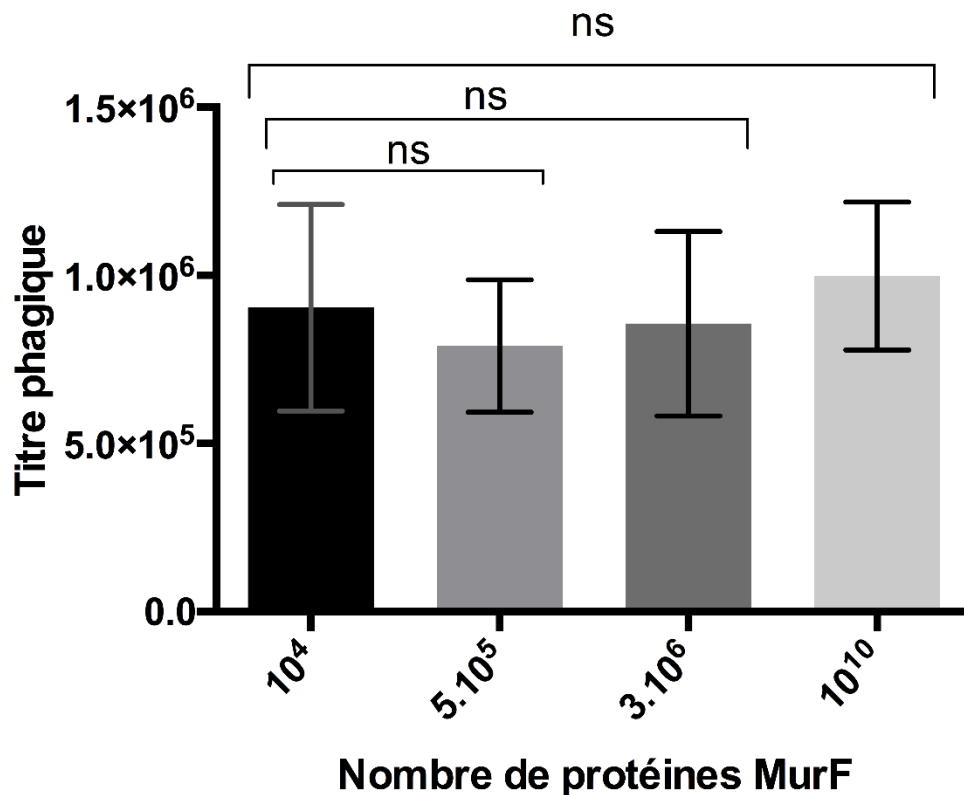


Figure 28 : Infectivité du phage M13 selon le nombre de protéines MurF liées aux peptides.

Aucune différence significative dans le titre phagique n'est observée après les ajouts de $5 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^6$ et 10^{10} unités de MurF lorsque comparé au titre phagique obtenu après une ronde réalisée avec 10^4 unités de MurF. ns : Différence statistiquement non significative ($p > 0,1$). Statistiques calculées avec le test de Student.

Dans les résultats présentés Figure 28, on observe aucune modification significative du titre phagique suite à l'ajout de quantités croissantes de protéines MurF. Cela signifie que l'infectivité du phage M13 n'a pas été altérée malgré l'augmentation du nombre de protéines MurF libres dans le milieu. De ce fait, il en est conclu que l'infectivité du phage M13 reste inchangée lorsqu'il est lié à une ou plusieurs Mur ligases.

3.4.3 Evaluation de l'efficacité des versions optimisées du tampon de lavage et de la méthode d'élution

Des optimisations antérieures du tampon de lavage et d'élution dans le cadre de présentations phagiques avec la protéine PBP-1a de *Escherichia coli* ont été réalisées par l'étudiante à la maîtrise Karine Dufresne entre juin 2013 et janvier 2014, au laboratoire du Dr. Catherine Paradis-Bleau. Les résultats obtenus ont montré que le tampon de lavage optimisé lorsque comparé au tampon de lavage classique (recommandé par le manufacturier du kit de présentation phagique) permettait de laver les phages de manière plus efficace et ainsi d'éliminer davantage de peptides ayant une faible affinité pour la protéine PBP1a. Pour ce qui est de la méthode d'élution optimisée, les résultats obtenus ont montré que cette méthode permettait d'éluer un plus grand nombre de phages lorsque comparé à la méthode d'élution classique (recommandée par le manufacturier du kit de présentation phagique).

Dans le cadre de cette étude où les présentations phagiques seront réalisées sur des Mur ligases, l'efficacité de ce tampon de lavage et de cette méthode d'élution a été évaluée en utilisant comme cible la protéine MurF. Pour cela, 4 conditions de présentation phagique où varient les tampons de lavage et d'élution ont été réalisées (Figure 29.A) avec les deux banques peptidiques Ph.D.-12 et Ph.D.-C7C (Tableau IX), et les éluats ont été titrés afin d'évaluer l'efficacité de chaque tampon (Figure 29.B)

A

Condition testée	Type de lavage	Type d'éluion
Condition 1	Classique	Classique
Condition 2	Classique	Optimisée
Condition 3	Optimisé	Classique
Condition 4	Optimisé	Optimisée

B

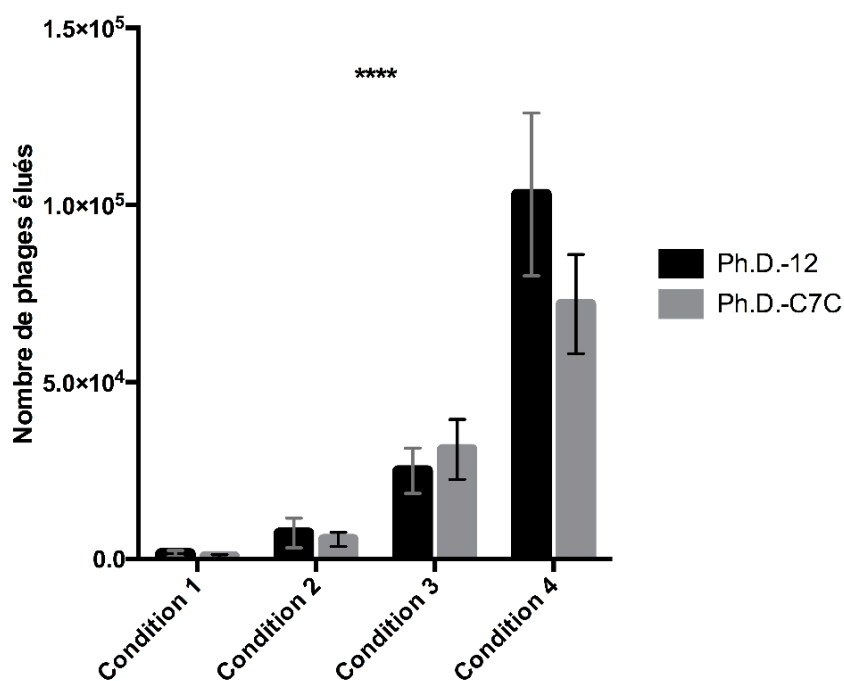


Figure 29 : Evaluation de l'efficacité du tampon de lavage et d'éluion optimisé. (A) Le tableau décrit le type de tampon de lavage et d'éluion utilisés dans chaque condition. Tampon de lavage classique : TBS, 0,1% Tween 20, 25 mM imidazole. Tampon de lavage optimisé : 5M NaCl, 0,5% Tween 20, 25 mM imidazole. Tampon d'éluion classique : 0.2 M glycine-HCl pH 2,2. Tampon d'éluion optimisé : 0.5 M imidazole pH 8. (B) Nombre de phages élués selon la condition testée et la banque peptidique utilisée. **** : Différence statistiquement très significative ($p < 0,0001$) pour la comparaison, selon la banque utilisée, de tous les résultats entre eux avec un test ANOVA. (Expérience réalisée à trois reprises).

La comparaison des résultats obtenus entre la condition 1 et la condition 2 mais aussi entre la condition 3 et la condition 4 montre que la méthode d'élution à l'imidazole permet d'éluer plus de phages par rapport à la méthode d'élution classique et cela avec les deux banques peptidiques utilisées (Figure 29). Cette différence pourrait être le résultat de peptides ayant une très forte affinité pour la protéine MurF et n'ayant pas pu être décrochés de celles-ci par le tampon d'élution classique tandis que l'élution à l'imidazole permet de récupérer l'ensemble des complexes MurF-peptide-phage. Concernant l'efficacité du tampon de lavage optimisé, les résultats montrent que ce dernier lave d'une manière moins efficace lorsque comparé au tampon de lavage classique. En effet, en comparant le nombre de phages élués entre les conditions 1 et 3 mais aussi entre les conditions 2 et 4 où les conditions d'élutions sont identiques, le nombre de phages récupérés est significativement plus élevé lorsque les lavages sont réalisés avec le tampon optimisé. Cette diminution de l'efficacité du tampon de lavage optimisé pourrait être le résultat de la forte concentration en NaCl (5M) utilisée.

3.4.4 Evaluation de l'effet du NaCl sur l'efficacité des lavages

Afin d'étudier l'effet du NaCl sur l'efficacité des lavages, trois présentations phagiques sont réalisées avec 3 tampons de lavages différents contenant une quantité croissante de NaCl (Figure 30)

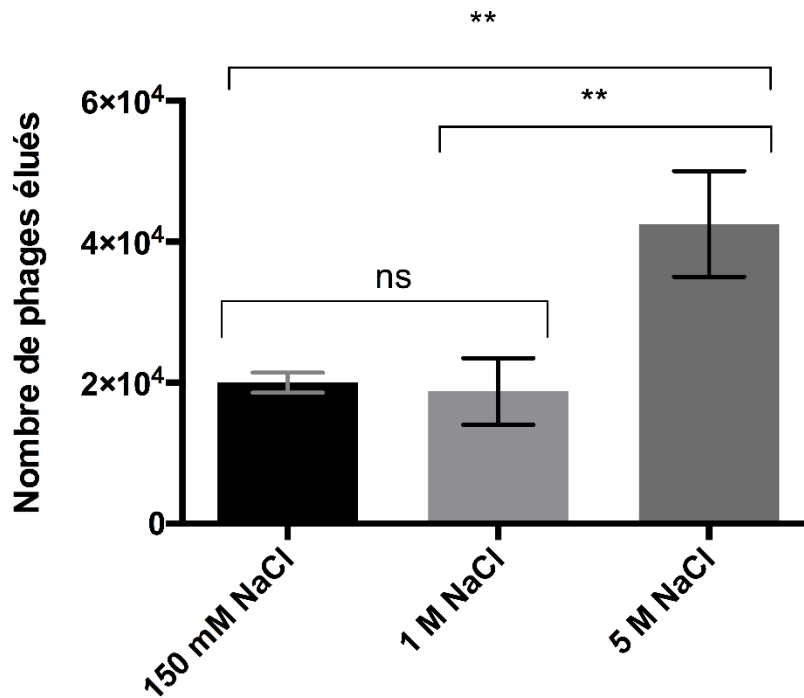


Figure 30 : Evaluation de l'effet de la concentration en NaCl du tampon de lavage sur le nombre de phages élués. Trois présentations phagiques sont réalisées dans des conditions identiques excepté l'utilisation de tampons de lavage de concentrations différentes en NaCl. Les phages sont élués à l'imidazole et la titration montre que le nombre de phages récupérés est significativement plus important lorsque comparé l'utilisation de solutions de lavage contenant 150 mM et 1 M de NaCl. ns : Différence statistiquement non significative. **: Différence statistiquement très significative ($p < 0,01$). Statistiques réalisées avec le test de Student.

Les résultats obtenus (Figure 30) montrent que le nombre de phages élués suite à l'utilisation d'un tampon de lavage contenant 5 M de NaCl est significativement plus important que lors de l'utilisation de tampons de lavage contenant 150 mM et 1 M de NaCl, ce qui confirme les observations précédentes (Figure 29). Cependant, il n'a pas été observé de relation dose dépendante entre la concentration de NaCl et l'efficacité de lavage étant donné qu'aucune différence n'est observée entre les concentrations de 150 mM et 1 M de NaCl. Ainsi au vu de ces résultats, il est décidé que le tampon de lavage classique (150 Mm) sera utilisé pour la sélection de peptides ayant une affinité pour les Mur ligases.

3.4.5 Evaluation de la capacité de la méthode d'élution optimisée à éluer des peptides n'ayant pas pu être décrochés par la méthode d'élution classique

À la suite des observations montrant que l'élution à l'imidazole permettait de récupérer davantage de peptides que la méthode d'élution classique (Figure 29), nous avons voulu vérifier si cette différence résulte de la capacité de cette méthode d'élution à éluer des peptides supplémentaires n'ayant pas pu être décrochés des Mur ligases par la méthode d'élution classique. Pour vérifier cette hypothèse, deux rondes de présentation phagique avec la méthode d'élution classique et deux autres rondes avec la méthode d'élution optimisée sont réalisées avec chacune des deux banques Ph.D.-12 et Ph.D.C7C. Les éluats sont alors récupérés et titrés (Figure 31.A), tandis que les billes magnétiques enduites de nickel sur lesquelles les protéines MurF sont fixées sont éluées une nouvelle fois avec de l'imidazole, et ce peu importe la condition de la première élution. Enfin, les nouveaux éluats sont titrés (Figure 31.B), afin de vérifier si l'imidazole permet en effet de récupérer des peptides n'ayant pas pu être décrochés lors de la première élution avec la méthode classique.

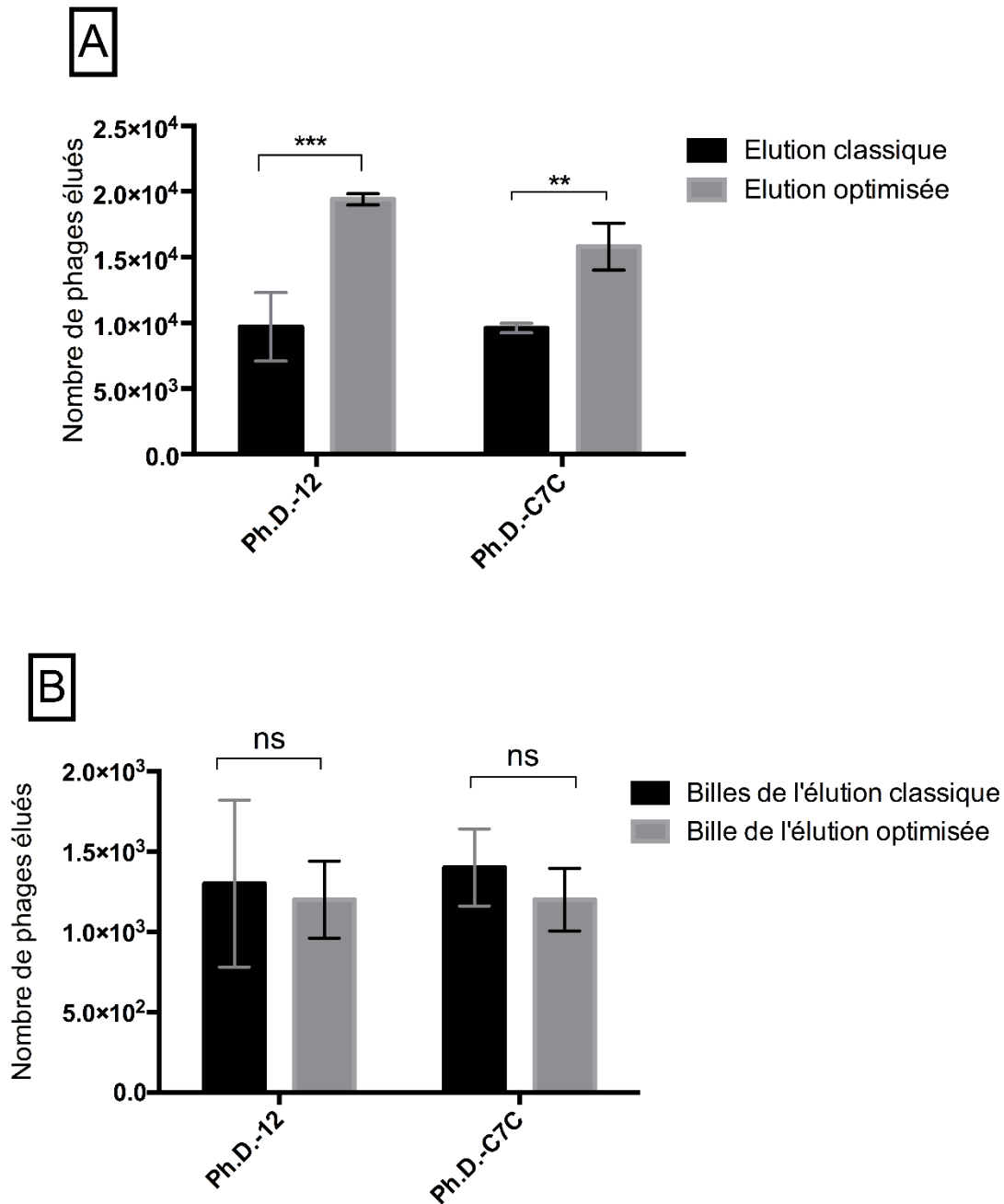


Figure 31 : Evaluation de la capacité de la méthode d'éluion optimisée à récupérer des peptides n'ayant pas pu l'être par la méthode d'éluion classique. (A) : Comparaison du nombre de phages élués selon la méthode d'éluion utilisée après une ronde de présentation phagique avec la protéine MurF. (B) : Seconde éluion à l'imidazole des billes issues de la partie A. (Essai réalisé à deux reprises). ns : différence statistiquement non significative ($p > 0,1$). ** : Différence statistiquement très significative ($p < 0,01$). *** : Différence statistiquement très significative ($p < 0,001$). Statistiques calculées avec le test de Student. (Expériences réalisées à deux reprises)

Les résultats obtenus après la première élution (Figure 31.A) montrent que la méthode d'élution à l'imidazole permet de récupérer plus de phage que la méthode d'élution classique et concordent avec ceux observés précédemment (Figure 29). Cependant, lorsque les billes enduites de nickel sont une nouvelle fois éluées avec la méthode d'élution optimisée, aucune différence significative n'est constatée (Figure 31.B) entre le nombre de phages récupérés à partir des billes une première fois éluées par la méthode d'élution classique et les billes une première fois éluées par la méthode d'élution optimisée. De ce fait, la différence observée entre le nombre de phages récupérés par les deux méthodes d'élution (Figures 29 et 31.A) ne résulte pas de l'incapacité de la méthode d'élution classique à décrocher certains peptides des Mur ligases. Cette différence pourrait être le résultat de l'effet de l'acidité du tampon d'élution classique (0.2 M glycine-HCl pH 2,2) sur la viabilité des phages.

3.4.6 Evaluation de l'effet du tampon d'élution classique sur la viabilité du phage M13

Afin de vérifier l'effet du tampon d'élution classique sur la viabilité des phages M13, un volume identique de la banque Ph.D.-12 ayant une concentration de 10^{13} pfu/ml est ajouté dans du tampon d'élution classique ou du tampon d'élution optimisé. Après incubation, chaque tampon est titré afin d'observer l'effet sur la viabilité des phages (Figure 32).

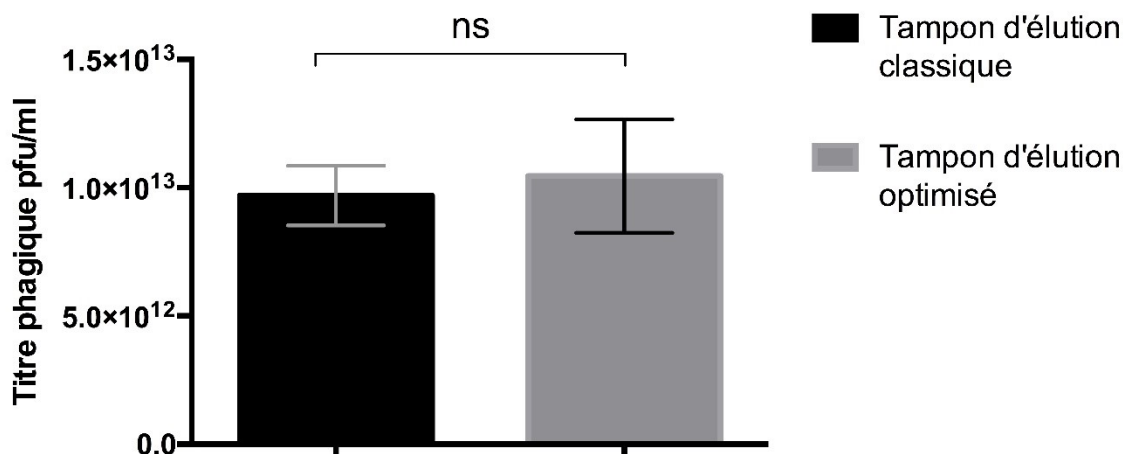


Figure 32 : Evaluation de l'effet des tampons d'éluion classique et optimisé sur la viabilité des phages M13. Le titre phagique reste inchangé que ce soit dans le tampon d'éluion classique ou optimisé (le titre phagique affiché est multiplié par le facteur de dilution). ns : Différence statistiquement non significative. Statistiques calculées avec le test de Student.

Les résultats obtenus (Figure 32) montrent que le titre phagique reste inchangé que ce soit suite à l'incubation dans le tampon d'éluion classique ou optimisé. Il en est déduit que la viabilité des phages M13 n'est altérée par aucun des deux tampons d'éluion, et que la différence observée entre ces deux méthodes d'éluion (Figure 31.A) n'est pas le résultat de l'effet du tampon d'éluion classique sur la viabilité des phages. Malgré cela, la méthode d'éluion optimisée permet de récupérer plus de peptides lors d'une ronde de présentation avec la protéine MurF et c'est donc cette méthode d'éluion qui est retenue pour la sélection de peptides ayant une affinité pour les Mur ligases.

3.5 Sélection de peptides ayant une affinité pour les protéines MurC, MurD, MurE et MurF à partir des banques peptidiques Ph.D.-12 et Ph.D.-C7C

Afin de sélectionner des peptides ayant une affinité pour les 4 Mur ligases MurC, MurD, MurE et MurF, 4 présentations phagiques avec chacune des banques peptidiques Ph.D.-12 et Ph.D.-C7C sont réalisées sur une Mur ligase différente dans chaque présentation (Figure 33).

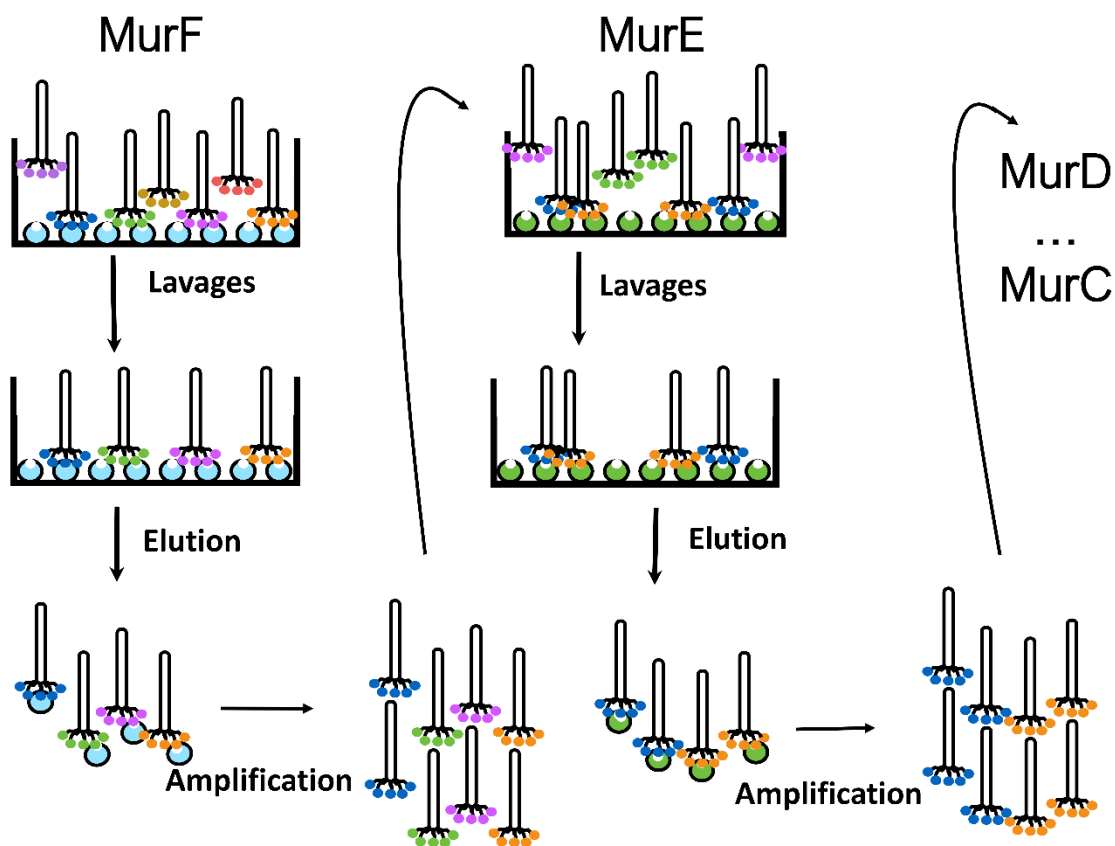


Figure 33 : Stratégie utilisée pour l'isolation de peptides inhibiteurs multi-cibles qui visent les Mur ligases. Une première ronde de présentation phagique est réalisée avec la protéine MurF et phages élués sont amplifiés et utilisés pour une nouvelle ronde de présentation phagique avec la protéine MurE et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de peptides ayant une affinité pour les 4 Mur ligases (MurC, MurD, MurE et MurF).

Afin de sélectionner un pool important de peptides lors de la première présentation phagique, cette dernière est réalisée avec la protéine MurF car cette enzyme utilise un dipeptide comme substrat naturel [95], ce qui augmente les probabilités de sélection de peptides avec les banques Ph.D.-12 (peptides linéaires de 12 acides aminés) et Ph.D.C7C (peptides circulaire de 7 acides aminés). Les phages élués sont alors amplifiés et utilisés pour une nouvelle ronde de présentation phagique avec la protéine MurE (Figure 33) et ainsi de suite avec la protéine MurD puis MurC. Les phages élués lors de la dernière ronde avec la protéine MurC expriment des

peptides ayant théoriquement une affinité pour chacune des 4 Mur ligases. Les éluats ont été titrés après chaque ronde et les résultats sont présentés dans la Figure 34.

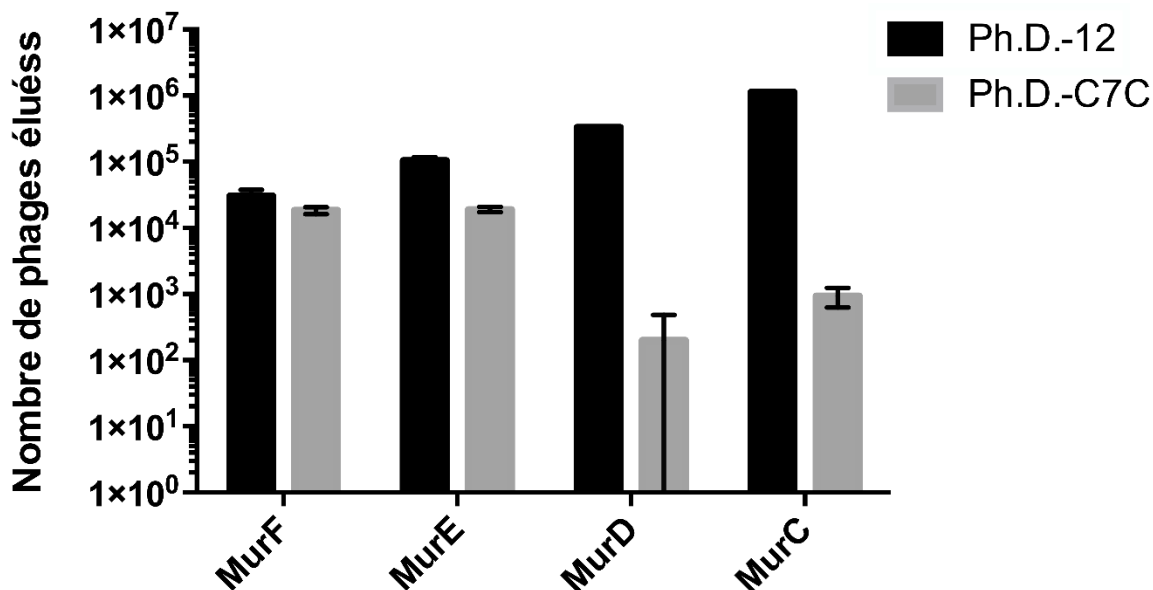


Figure 34 : Titre phagique des éluats des rondes de présentation phagique sur les 4 Mur ligases. (Échelle logarithmique).

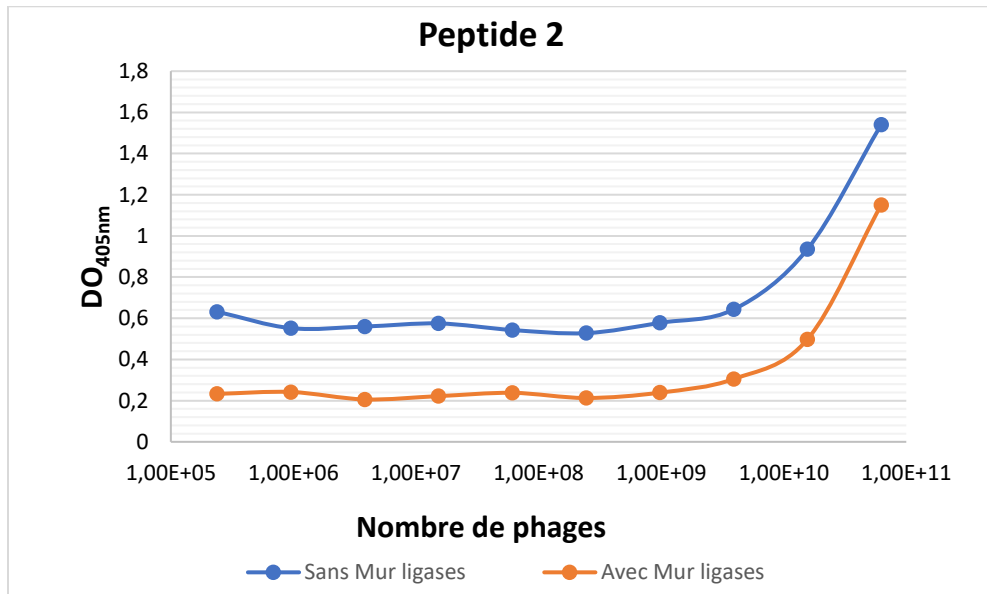
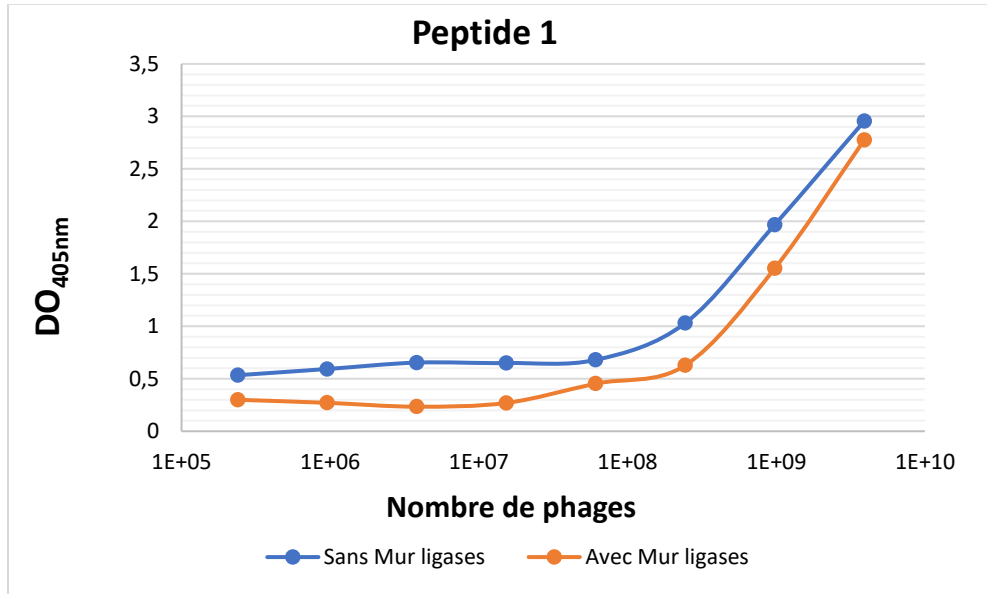
Les peptides élués après la première ronde de présentation phagique sur la protéine MurF (Figure 34) représentent la diversité peptidique qui sera utilisée pour le criblage de peptides ayant une affinité avec les protéines MurE, MurD puis MurC. Cette diversité est de l'ordre de 10⁴ pour les deux banques de peptides criblées, un résultat consistant avec les résultats observés précédemment (Figures 29 et 31.A).

Lors du criblage de la banque Ph.D.-12, le nombre de phages élués triple à chaque nouvelle élution, indiquant une augmentation de l'affinité moyenne des peptides après chaque présentation phagique. Pour ce qui est de la banque Ph.D.-C7C, on observe dans un premier temps une stagnation dans le nombre de peptides élués entre la sélection réalisée avec la protéine MurF et celle réalisée avec MurE, puis une baisse considérable lors des sélections suivantes réalisées sur les protéines MurD puis MurC. Cela est probablement le résultat d'une très faible affinité des peptides sélectionnés pour les Mur ligases. En effet, étant donné que les phages sont

amplifiés après chaque élution, l'existence d'un ou plusieurs peptides ayant une forte affinité pour les 4 Mur ligases résulterait sur une augmentation de nombre de phages élués du fait de la constante augmentation de la proportion de ces peptides après chaque amplification.

3.6 Evaluation par ELISA de l'affinité des peptides sélectionnés pour les 4 Mur ligases

Afin d'affiner la sélection des peptides précédemment isolés, l'affinité individuelle et relative de chaque peptide est évaluée par ELISA. Pour cela, 20 clones phagiques (censés représenter la diversité peptidique de la sélection) par banque peptidique sont aléatoirement sélectionnés, individuellement amplifiés et évalués par ELISA pour leur affinité avec les 4 Mur ligases (Figures 35 et 36).



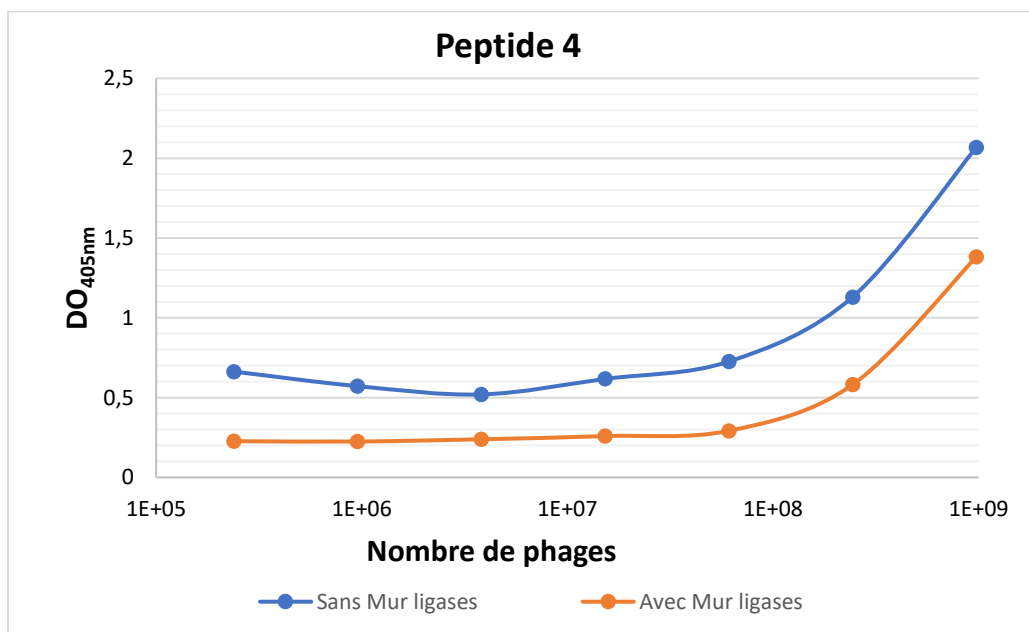
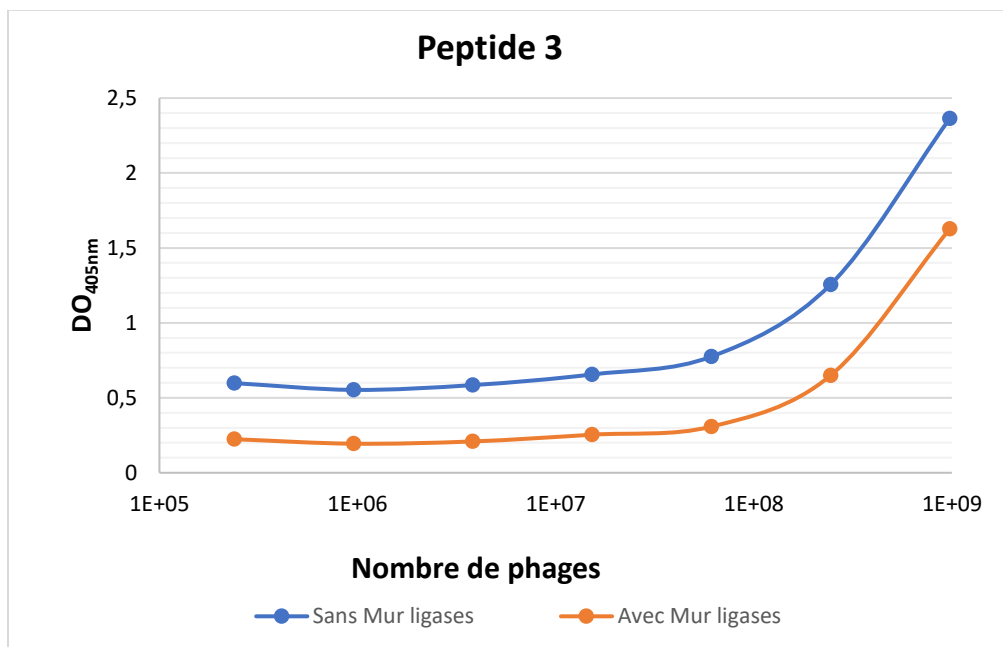


Figure 35 : Evaluation par ELISA de l'affinité de 4 peptides sur les Mur ligases. Les peptides 1, 2, 3 et 4 sont issus du criblage de la banque Ph.D.-12 par la technique de présentation phagique réalisée sur les 4 Mur ligases. Le signal obtenu avec les fortes concentrations de phages est trop élevé et n'a pas pu être quantifié au spectrophotomètre.

La mesure du signal colorimétrique au spectrophotomètre est, pour les 4 peptides, sensiblement plus élevé (1,5 à 3 fois plus) en l'absence de Mur ligases qu'en leur présence, et cela pour toutes les dilutions mesurées (Figure 35). Ces résultats sont contraires à ceux attendus, étant donné que ces peptides ont en principe une affinité pour les Mur ligases. La supériorité du signal dans les puits sans Mur ligases pourrait être le résultat de l'affinité de ces peptides pour les atomes de nickel, le BSA ou le plastique des puits dont les sites de fixation seraient en partie bloqués lorsque les Mur ligases y sont fixées ce qui pourrait expliquer la différence observée.

Afin de vérifier que les résultats précédents ne sont pas la conséquence d'une mauvaise manipulation, l'affinité pour les Mur ligases de deux autres peptides issus également du criblage de la banque Ph.D.-12 a été évaluée par ELISA (Figure 36) en utilisant cette fois-ci deux fois moins d'anticorps par puit pour limiter les effets de bruit de fond mais aussi un signal trop élevé obtenu précédemment avec les concentrations phagiques les plus élevées (Figure 35).

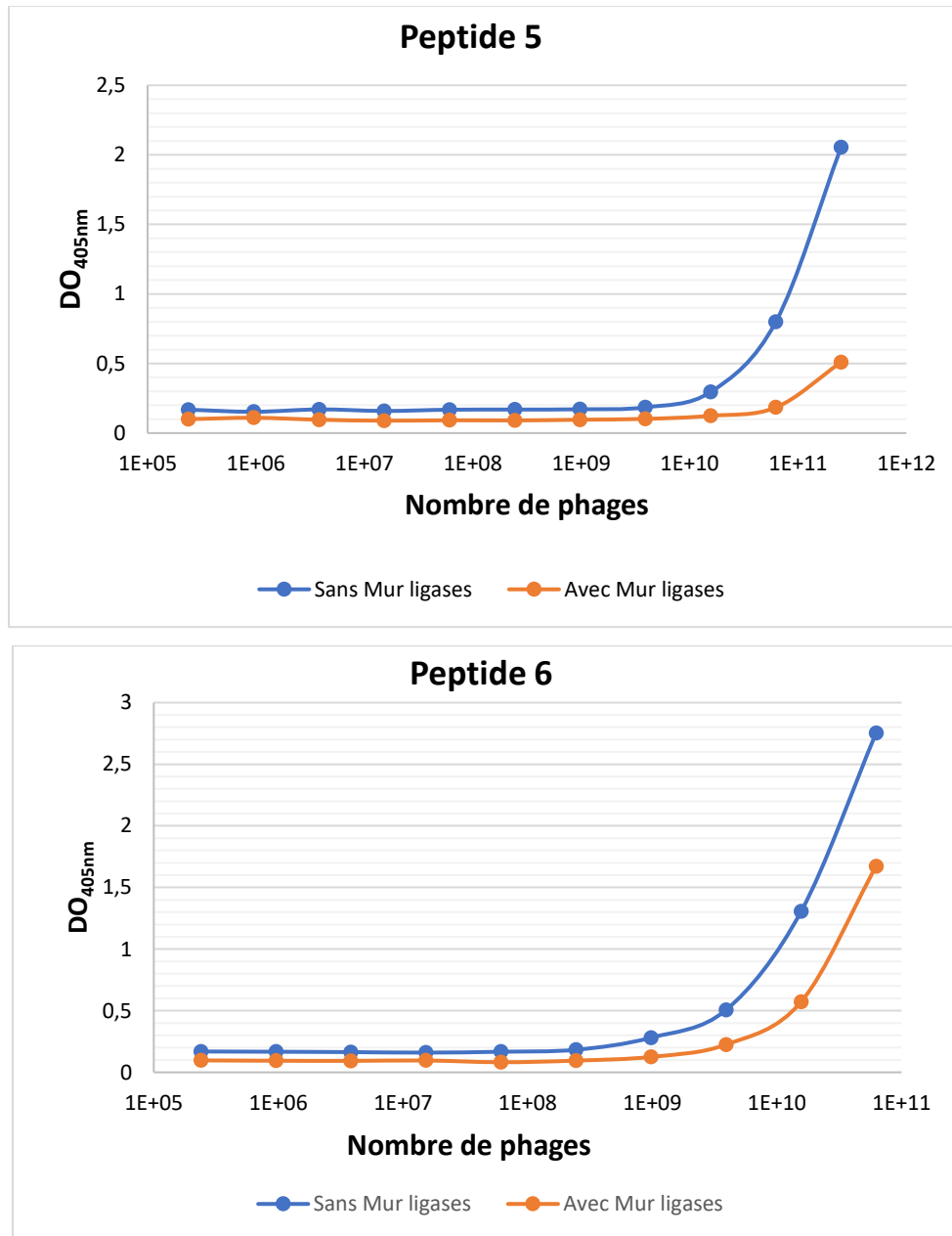


Figure 36 : Evaluation par ELISA de l'affinité des peptides 5 et 6 pour les Mur ligases.

La tendance observée avec les peptides 1, 2, 3 et 4 (Figure 35) est confirmée par les résultats obtenus avec les peptides 5 et 6 (Figure 36) où le signal est plus important dans les puits sans Mur ligases, et cela pour toutes les dilutions.

4. Discussion

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales dans le monde [3]. Sa plasticité génétique, sa résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques et sa capacité à former des biofilms sont des éléments qui expliquent la persistance et la difficulté à traiter les infections causées par cette bactérie. Cela est particulièrement vrai chez les personnes atteintes de fibrose kystique où les infections pulmonaires par ce pathogène sont la principale cause de morbidité et de mortalité [72, 187]. Ainsi, développer de nouveaux agents antibactériens capables de combattre efficacement et durablement ce pathogène est aujourd'hui une nécessité de santé publique.

Pour qu'un agent antibactérien soit efficace, il doit cibler une étape essentielle dans la croissance des bactéries, être hautement sélectif pour sa cible et avoir un faible degré de toxicité pour l'homme. Pour cela, la cible doit être une voie métabolique ou une enzyme présente seulement dans les cellules bactériennes et totalement absente dans les cellules de mammifères [193]. Pour ces raisons, la voie de biosynthèse du peptidoglycane fait partie des cibles privilégiées dans le développement d'agents antibactériens, étant donné le rôle essentiel de ce polymère dans la survie bactérienne et la présence exclusive chez ces dernières des enzymes impliquées dans sa formation. Les Mur ligases, une famille d'enzymes très similaires et ayant un rôle essentiel dans cette voie de biosynthèse, ne sont aujourd'hui ciblées par aucun antibiotique et constituent des cibles prometteuses pour le développement d'agents antibactériens performants et durables, qui cibleraient plusieurs d'entre elles.

Afin de sélectionner des peptides inhibiteurs qui ciblent plusieurs Mur ligases de *P. aeruginosa*, nous avons cloné les gènes, produit et purifié chacune des Mur ligases MurC, MurD, MurE et MurF. Nous avons par la suite évalué l'efficacité d'une version précédemment optimisée de la technique de présentation phagique, adapté les paramètres et l'avons utilisé pour cribler deux banques peptidiques afin de sélectionner des peptides ayant une affinité pour les 4 Mur ligases. Enfin, nous avons évalué l'affinité relative de 6 de ces peptides pour les 4 Mur ligases.

4.1 Clonage, production et purification des Mur ligases

Afin de cloner les gènes des Mur ligases dans des vecteurs plasmidiques, les gènes *murC*, *murD*, *murE* et *murF* de *P. aeruginosa* ont été amplifiés par PCR. Plusieurs difficultés ont été rencontrées lors de ces amplifications et de nombreux paramètres ont dû être adaptés. Cela est lié à l'utilisation de polymérases à haute-fidélité nécessitant des conditions d'incubation plus restrictives mais surtout à la composition riche en nucléotides GC des gènes codant pour les Mur ligases (67 à 69% de nucléotides GC) [194]. En effet, du fait de l'existence de trois liaisons hydrogène entre la guanine et la cytosine, les ADN riches en nucléotides GC ont tendance à maintenir leur structure secondaire ce qui empêche la liaison des amorces à l'ADN matrice et bloque l'étape d'élongation lors de la PCR [195]. Cette difficulté a été résolue en additionnant du « GC enhancer », un mélange de détergent, de DMSO et de bétaine qui permet la déconstruction de ces structures secondaires (Tableau II, Figure 17).

Dans l'étape de production et de purification des Mur ligases, nous avons au fur et à mesure optimisé les conditions d'incubation, de lavages et d'élution afin d'obtenir des protéines ayant des concentrations et des taux de pureté les plus élevés possible. S'il a été possible d'augmenter le taux de surproduction de la protéine MurC (Figure 19), de nombreuses protéines contaminantes n'ont pas pu être éliminées lors de la purification de cette protéine. En effet, dans les sous fractions d'élution, nous avons observé de nombreuses protéines contaminantes de poids moléculaire inférieur à la protéine d'intérêt et qui n'ont pas pu être décrochées de la résine de nickel lors des lavages malgré l'utilisation d'une concentration de 100 mM en imidazole (Figure 23). Ces protéines contaminantes sont probablement le résultat de faux départs de traduction de la protéine MurC étant donné leur poids moléculaire inférieur, le positionnement de la fusion 10 histidine à l'extrémité C-terminale et l'existence de 13 codons d'initiation ATG dans le cadre de lecture du gène *murC* [194]. Cela a également été observé lors d'une précédente purification de la protéine MurC de *Escherichia coli* [128]. Une solution serait de positionner l'étiquette histidine à l'extrémité N-terminale de la protéine, afin que seules les protéines dont la traduction est initiée par le premier codon ATG soient porteuses de la fusion histidine, même si cela a été réalisé par le passé et a abouti sur une perte de la solubilité de la protéine [196].

4.2 Version optimisée de la technique de présentation phagique

La technique de présentation phagique est une méthode qui permet la sélection de ligands selon leur affinité pour une protéine cible. Cette technique a été optimisée au laboratoire dans le but de sélectionner des ligands de plus grande affinité, cela en augmentant la stringence des lavages afin d'éliminer davantage de ligands de faible affinité et en modifiant le principe d'élution afin de récupérer l'ensemble des ligands. Dans le cadre de la sélection de peptides ayant une affinité pour les Mur ligases, nous avons étudié et évalué l'efficacité des étapes de lavages et d'élution de cette version optimisée et avons vérifié son impact sur l'infectivité des phages M13.

Lors de l'évaluation de l'étape de lavage, nous avons démontré que le tampon de lavage optimisé lavait moins efficacement lorsque comparé au tampon de lavage classique (Figure 28) et que cela était directement lié à l'utilisation d'une forte concentration en NaCl (Figure 30). Même si nous n'avons pas pu établir de corrélation entre la concentration de NaCl utilisée et l'efficacité de lavage, cela pourrait être le résultat de la forte concentration en sel et en ions de la solution favorisant la formation de ponts salins ainsi que d'autres types d'interactions non covalentes entre les acides aminés des peptides fusionnés aux phages et les acides aminés des Mur ligases [197-199], renforçant ainsi les liaisons aspécifiques et diminuant par conséquent l'efficacité des lavages. Afin de mieux comprendre l'effet du NaCl, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de tampons de lavage représentant une plus large gamme de concentrations en NaCl, allant de 0 M à 5 M.

Pour ce qui est de l'étude de la méthode d'élution optimisée, nous avons évalué la capacité de cette méthode à récupérer des peptides de meilleure affinité et qui n'auraient pas pu être décrochés avec la méthode d'élution classique (Figure 25). Si dans un premier temps il a en effet été observé que l'élution à l'imidazole permettait d'éluer un plus grand nombre de peptides (Figures 29 et 31.A), nous avons par la suite découvert que cette différence n'est pas le résultat de l'élution de peptides de meilleure affinité (Figure 31.B). Même si nous n'avons pas observé d'effet du tampon d'élution classique sur la viabilité des phages (Figure 32), cela reste l'hypothèse la plus cohérente pour expliquer cette différence et d'autres essais sont alors nécessaires afin d'étudier cette possibilité.

Enfin, nous avons étudié l'impact qu'aurait la méthode d'éluion optimisée sur l'infectivité des phages M13. En effet, étant donné qu'avec cette méthode d'éluion ce sont les complexes phage-peptide-Mur ligases qui sont décrochés, il existait un risque de perdre les peptides de meilleure affinité du fait de la présence de Mur ligases libres dans l'éluat (Figure 27). Nos résultats ont démontré que l'infectivité des phages M13 n'était pas impactée suite à la liaison de plusieurs Mur ligases et que cette méthode d'éluion permet bien de récupérer l'ensemble des peptides. L'absence de changement dans l'infectivité de ces phages résulte probablement du fait qu'en moyenne seules une ou deux protéines de surface pIII expriment un peptide [200] ce qui permet aux phages d'infecter les bactéries au moyen des autres protéines pIII libres de toute fusion.

4.3 Sélection et études de peptides ayant une affinité avec les Mur ligases

Afin d'isoler des peptides ayant une affinité pour les 4 Mur ligases, nous avons mis en place une stratégie innovante où les protéines MurC, MurD, MurE et MurF sont utilisées une à une comme cibles dans des rondes de présentation phagique (Figure 33). En raison de la forte similarité qui existe entre les sites actifs des Mur ligases et de leur utilisation de petits peptides comme substrats naturels [95], cette stratégie devrait permettre l'isolation de peptides qui se fixent sur le site actif de plusieurs Mur ligases et l'identification d'une séquence consensus. L'ordre de présentation des Mur ligases dans cette stratégie est un paramètre important, et nous avons commencé avec la protéine MurF afin d'augmenter le pool de peptides sélectionnés pour la ronde suivante, étant donné que c'est la seule Mur ligase à utiliser un dipeptide comme substrat [122]. Toujours dans la même logique, nous avons par la suite utilisé les protéines MurE, MurD puis MurC, l'ordre inverse de liaison des Mur ligases au peptide en formation (Figure 9).

À la suite de la sélection, nous avons évalué par ELISA l'affinité relative pour les 4 Mur ligases de 6 peptides issus du criblage de la banque Ph.D.-12. Les résultats que nous avons obtenus (Figures 35 et 36) indiquent qu'aucun de ces peptides n'a une affinité pour les Mur ligases. En

effet, pour tous les peptides évalués, le signal obtenu dans les puits sans Mur ligases est supérieur à celui obtenu dans les puits où les Mur ligases sont fixées, une tendance indiquant que ces peptides n'ont pas d'affinité pour la protéine cible utilisée et que le signal obtenu est le résultat de peptides pouvant se lier au polystyrène ou au BSA [201-203]. En effet, dans les banques peptidiques il existe des peptides ayant une affinité pour des composants utilisés pendant les rondes de sélection appelés « *target unrelated peptides* » (TUP) [203, 204] et identifiés au sein de la banque peptidique Ph.D.-12 que nous avons utilisé [205]. Ces peptides ont un taux de propagation plus rapide et de ce fait s'accumulent rapidement pendant la sélection au détriment des autres peptides qui pourraient avoir une affinité pour la cible utilisée [206-208], aboutissant ainsi sur des résultats faussement positifs tel que ceux observés pendant les rondes de sélection avec la banque Ph.D.-12 où le nombre de phages élués triple après chaque ronde de présentation (Figure 34). De possibles alternatives seraient l'utilisation de tubes en polypropylène pour lequel il existe moins de TUP [202] ou l'utilisation de tubes en verre.

Ainsi, au vu de ces résultats, il est possible que l'ensemble des peptides sélectionnés n'aient aucune spécificité pour les Mur ligases. Pour vérifier cette possibilité, l'évaluation par ELISA de l'affinité globale pour les Mur ligases de l'ensemble des peptides issus de la dernière ronde de sélection doit être réalisée, et indiquera la nécessité d'effectuer une nouvelle sélection peptidique. Le cas échéant, les conditions de sélection devront être moins sélectives et l'affinité globale des peptides pour chaque Mur ligase devra être confirmée après chaque ronde de présentation phagique. Même si des peptides de très haute affinité ne sont pas isolés, l'analyse de la séquence de plusieurs peptides de moyenne affinité permettra de dégager une séquence consensus qui pourra être utilisée pour la conception d'inhibiteurs des Mur ligases et une meilleure compréhension du mécanisme d'inhibition à travers l'analyse de la structure secondaire et tertiaire qu'adopte cette séquence.

5. Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude ont permis l'évaluation de l'efficacité d'une version précédemment optimisée de la technique de présentation phagique dans le cadre de la sélection de peptides ayant une affinité pour les Mur ligases. Il a été démontré que le tampon de lavage optimisé est peu efficace et que cela était la conséquence de l'utilisation d'une forte concentration en NaCl. Aussi, il a été vu que l'élution des complexes phage-peptide-Mur ligases n'a aucun effet sur l'infectivité des phages M13 et que cette méthode d'élution permet de récupérer des peptides en plus grand nombre mais pas de meilleure affinité. Dans cette étude il a également été testé une stratégie originale ayant pour objectif la sélection de peptides ayant une affinité pour plusieurs cibles et deux banques peptidiques ont été criblées à l'aide de cette stratégie afin de sélectionner des peptides ayant une affinité pour les 4 Mur ligases de *P. aeruginosa*. Les résultats obtenus suite à l'évaluation de l'affinité pour les Mur ligases de 6 de ces peptides ont montré qu'ils ne présentent aucune affinité spécifique et que des optimisations sont nécessaires pour la réussite de cette sélection. Si malgré les optimisations aucun peptide n'a pu être isolé, une approche alternative sera de changer l'ordre de présentation des Mur ligases dans la technique de présentation phagique. En effet, étant donné que seule la protéine MurF utilise un dipeptide comme substrat, les chances de sélection de peptides multi-cibles pourraient être améliorées si la sélection commence avec les protéines MurC, MurD et MurE qui partagent l'utilisation d'un seul acide aminé comme substrat et ainsi sélectionner des peptides ayant une affinité pour deux ou trois Mur ligases. Les peptides sélectionnés pourront être synthétisés et étudiés pour leur pouvoir inhibiteur *in vitro* sur les Mur ligases en mesurant l'activité ATPase de ces enzymes. Ils pourront également être étudiés, par courbe de croissance, pour leur activité inhibitrice *in vivo* en les exprimant au moyen d'un vecteur plasmidique dans des cellules de *P. aeruginosa*.

Bibliographie

1. Rastegar Lari, A., H. Bahrami Honar, and R. Alaghebandan, *Pseudomonas infections in Tohid Burn Center, Iran*. Burns, 1998. **24**(7): p. 637-41.
2. Breidenstein, E.B., C. de la Fuente-Nunez, and R.E. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. Trends Microbiol, 2011. **19**(8): p. 419-26.
3. Gaynes, R., J.R. Edwards, and S. National Nosocomial Infections Surveillance, *Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(6): p. 848-54.
4. Kollef, M.H., et al., *Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia*. Chest, 2005. **128**(6): p. 3854-62.
5. Pollack, M., *Pseudomonas aeruginosa*, in *Principles and Practice of Infectious Diseases*, R.D. G. L. Mandell, and J. E. Bennett Editor. 1995, Churchill Livingstone, New York, NY. p. 1820-2003.
6. Harris, A.A., L. Goodman, and S. Levin, *Community-acquired Pseudomonas aeruginosa pneumonia associated with the use of a home humidifier*. West J Med, 1984. **141**(4): p. 521-3.
7. Pitt, T.L., *Pseudomonas, Burkholderia, and related genera*, in *Microbiology and microbial infections*, B.I. Duerden, Editor. 1998, Oxford University Press Inc., New York, NY. p. 1109–1138.
8. Bisbe, J., et al., *Pseudomonas aeruginosa bacteremia: univariate and multivariate analyses of factors influencing the prognosis in 133 episodes*. Rev Infect Dis, 1988. **10**(3): p. 629-35.
9. Carmeli, Y., et al., *Health and economic outcomes of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Arch Intern Med, 1999. **159**(10): p. 1127-32.
10. Morrison, A.J., Jr. and R.P. Wenzel, *Epidemiology of infections due to Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis, 1984. **6 Suppl 3**: p. S627-42.
11. Blanc, D.S., et al., *Frequency and molecular diversity of Pseudomonas aeruginosa upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study*. Clin Microbiol Infect, 1998. **4**(5): p. 242-247.

12. Erol, S., et al., *Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients*. Burns, 2004. **30**(4): p. 357-61.
13. Ohara, T. and K. Itoh, *Significance of Pseudomonas aeruginosa colonization of the gastrointestinal tract*. Intern Med, 2003. **42**(11): p. 1072-6.
14. Thuong, M., et al., *Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit*. J Hosp Infect, 2003. **53**(4): p. 274-82.
15. Valles, J., et al., *Patterns of colonization by Pseudomonas aeruginosa in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia*. Intensive Care Med, 2004. **30**(9): p. 1768-75.
16. Burns, J.L., et al., *Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States*. Clin Infect Dis, 1998. **27**(1): p. 158-63.
17. Lambert, P.A., *Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med, 2002. **95 Suppl 41**: p. 22-6.
18. Dimatatac, E.L., M. M. Alejandria, C. Montalban, C. Pineda, C. Ang, and R. Delino, *Clinical outcomes and costs of care of antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa infections*. Philipp. J. Microbiol. Infect. Dis, 2003. **32**: p. 159-167.
19. Gasink, L.B., et al., *Fluoroquinolone-resistant Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk factors and clinical impact*. Am J Med, 2006. **119**(6): p. 526 e19-25.
20. Carmeli, Y., et al., *Emergence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(6): p. 1379-82.
21. Nicas, T.I. and R.E. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant*. J Bacteriol, 1983. **153**(1): p. 281-5.
22. Angus, B.L., et al., *Outer membrane permeability in Pseudomonas aeruginosa: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant*. Antimicrob Agents Chemother, 1982. **21**(2): p. 299-309.
23. Yoshimura, F. and H. Nikaido, *Permeability of Pseudomonas aeruginosa outer membrane to hydrophilic solutes*. J Bacteriol, 1982. **152**(2): p. 636-42.
24. Godfrey, A.J. and L.E. Bryan, *Penetration of beta-lactams through Pseudomonas aeruginosa porin channels*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(8): p. 1216-21.

25. Daikos, G.L., V.T. Lolans, and G.G. Jackson, *Alterations in outer membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa associated with selective resistance to quinolones*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(5): p. 785-7.
26. Norris, S.A. and C.V. Sciortino, *Monoclonal antibody to an aminoglycoside-resistance factor from Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis, 1988. **158**(6): p. 1324-8.
27. Bryan, L.E., K. O'Hara, and S. Wong, *Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1984. **26**(2): p. 250-5.
28. Parr, T.R., Jr. and A.S. Bayer, *Mechanisms of aminoglycoside resistance in variants of Pseudomonas aeruginosa isolated during treatment of experimental endocarditis in rabbits*. J Infect Dis, 1988. **158**(5): p. 1003-10.
29. Poole, K., et al., *Multiple antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: evidence for involvement of an efflux operon*. J Bacteriol, 1993. **175**(22): p. 7363-72.
30. Kohler, T., et al., *Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(11): p. 2540-3.
31. Lomovskaya, O., et al., *Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(6): p. 1340-6.
32. Poole, K., et al., *Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol, 1996. **21**(4): p. 713-24.
33. Zhao, W.H. and Z.Q. Hu, *Beta-lactamases identified in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Crit Rev Microbiol, 2010. **36**(3): p. 245-58.
34. Sykes, R.B. and M. Matthew, *The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics*. J Antimicrob Chemother, 1976. **2**(2): p. 115-57.
35. Costerton, W., et al., *The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections*. J Clin Invest, 2003. **112**(10): p. 1466-77.
36. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 881-90.

37. Stoodley, P., D. Debeer, and Z. Lewandowski, *Liquid flow in biofilm systems*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(8): p. 2711-6.
38. de Beer, D., et al., *Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport*. Biotechnol Bioeng, 1994. **43**(11): p. 1131-8.
39. Hoiby, N., et al., *The clinical impact of bacterial biofilms*. Int J Oral Sci, 2011. **3**(2): p. 55-65.
40. Mah, T.F. and G.A. O'Toole, *Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents*. Trends Microbiol, 2001. **9**(1): p. 34-9.
41. Sauer, K., et al., *Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm*. J Bacteriol, 2002. **184**(4): p. 1140-54.
42. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(2): p. 114-22.
43. Fuqua, C., M.R. Parsek, and E.P. Greenberg, *Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing*. Annu Rev Genet, 2001. **35**: p. 439-68.
44. Bjarnsholt, T. and M. Givskov, *The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(2): p. 409-14.
45. Davies, D.G., et al., *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science, 1998. **280**(5361): p. 295-8.
46. Stewart, P.S., *Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms*. Int J Med Microbiol, 2002. **292**(2): p. 107-13.
47. Gilbert, P., et al., *The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities*. Adv Microb Physiol, 2002. **46**: p. 202-56.
48. Cheema, M.S., J. E. Rassing, and C. Marriott, *The diffusion coefficients of antibiotics in mucus glycoprotein gels*. J. Pharm. Pharmacol. Suppl, 1986. **38**(53P).
49. Gordon, C.A., N.A. Hodges, and C. Marriott, *Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 1988. **22**(5): p. 667-74.
50. Ishida, H., et al., *In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(7): p. 1641-5.

51. Suci, P.A., et al., *Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(9): p. 2125-33.
52. Ward, K.H., et al., *Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants*. J Med Microbiol, 1992. **36**(6): p. 406-13.
53. Anwar, H., J.L. Strap, and J.W. Costerton, *Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(7): p. 1347-51.
54. Sternberg, C., et al., *Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(9): p. 4108-17.
55. Marrie, T.J., J. Nelligan, and J.W. Costerton, *A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1339-41.
56. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
57. Khoury, A.E., et al., *Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices*. ASAIO J, 1992. **38**(3): p. M174-8.
58. Cochrane, D.M., et al., *Antibody response to Pseudomonas aeruginosa surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection*. J Med Microbiol, 1988. **27**(4): p. 255-61.
59. Tolker-Nielsen, T., *Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities*. APMIS Suppl, 2014(138): p. 1-51.
60. Hoiby, N., O. Ciofu, and T. Bjarnsholt, *Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis*. Future Microbiol, 2010. **5**(11): p. 1663-74.
61. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
62. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
63. Choi, J.Y., et al., *Cl(-)-dependent HCO₃- transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. JOP, 2001. **2**(4 Suppl): p. 243-6.
64. Anderson, M.P., et al., *Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia*. Am J Physiol, 1992. **263**(1 Pt 1): p. L1-14.

65. Welsh, M.J. and A.E. Smith, *Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis*. Cell, 1993. **73**(7): p. 1251-4.
66. Cohn, J.A., et al., *Increased risk of idiopathic chronic pancreatitis in cystic fibrosis carriers*. Hum Mutat, 2005. **26**(4): p. 303-7.
67. Di Sant'Agnes, P.A., et al., *Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease*. Pediatrics, 1953. **12**(5): p. 549-63.
68. Taussig, L.M., et al., *Fertility in males with cystic fibrosis*. N Engl J Med, 1972. **287**(12): p. 586-9.
69. Ciofu, O., C.R. Hansen, and N. Hoiby, *Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis*. Curr Opin Pulm Med, 2013. **19**(3): p. 251-8.
70. MacKenzie, T., et al., *Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry*. Ann Intern Med, 2014. **161**(4): p. 233-41.
71. Stephenson, A.L., et al., *Survival Comparison of Patients With Cystic Fibrosis in Canada and the United States: A Population-Based Cohort Study*. Ann Intern Med, 2017. **166**(8): p. 537-546.
72. O'Sullivan, B.P. and S.D. Freedman, *Cystic fibrosis*. Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1891-904.
73. FitzSimmons, S.C., *The changing epidemiology of cystic fibrosis*. J Pediatr, 1993. **122**(1): p. 1-9.
74. Rosenfeld, M., et al., *Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis*. Pediatr Pulmonol, 2001. **32**(5): p. 356-66.
75. Cantin, A., *Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(4): p. 939-41.
76. Saiman, L., *Microbiology of early CF lung disease*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. S367-9.
77. Matsui, H., et al., *Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease*. Cell, 1998. **95**(7): p. 1005-15.

78. Worlitzsch, D., et al., *Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 317-25.
79. Armstrong, D.S., et al., *Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(4 Pt 1): p. 1197-204.
80. *Rapport annuel du Registre canadien sur la fibrose kystique*. 2013, Fibrose kystique Canada. p. 23.
81. Hoiby, N., *Antibiotic therapy for chronic infection of pseudomonas in the lung*. Annu Rev Med, 1993. **44**: p. 1-10.
82. Burns, J.L., et al., *Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis*. J Infect Dis, 2001. **183**(3): p. 444-52.
83. Boucher, J.C., et al., *Mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3838-46.
84. Hancock, R.E., et al., *Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains*. Infect Immun, 1983. **42**(1): p. 170-7.
85. Ernst, R.K., et al., *Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1561-5.
86. Martirosyan, A., et al., *Lipopolysaccharides with acylation defects potentiate TLR4 signaling and shape T cell responses*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55117.
87. Thomas, S.R., et al., *Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of Pseudomonas aeruginosa in severe cystic fibrosis lung disease*. Thorax, 2000. **55**(9): p. 795-7.
88. Mahenthalingam, E., M.E. Campbell, and D.P. Speert, *Nonmotility and phagocytic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis*. Infect Immun, 1994. **62**(2): p. 596-605.
89. Typas, A., et al., *From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology*. Nat Rev Microbiol, 2011. **10**(2): p. 123-36.
90. Vollmer, W., D. Blanot, and M.A. de Pedro, *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 149-67.

91. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000414.
92. Cabeen, M.T. and C. Jacobs-Wagner, *Bacterial cell shape*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 601-10.
93. Brown, L., et al., *Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(10): p. 620-30.
94. Barreteau, H., et al., *Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 168-207.
95. Kouidmi, I., R.C. Levesque, and C. Paradis-Bleau, *The biology of Mur ligases as an antibacterial target*. Mol Microbiol, 2014. **94**(2): p. 242-53.
96. Holtje, J.V., *Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 181-203.
97. El Zoeiby, A., F. Sanschagrin, and R.C. Levesque, *Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): p. 1-12.
98. van Heijenoort, J., *Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit*. Nat Prod Rep, 2001. **18**(5): p. 503-19.
99. Zawadzke, L.E., T.D. Bugg, and C.T. Walsh, *Existence of two D-alanine:D-alanine ligases in Escherichia coli: cloning and sequencing of the ddlA gene and purification and characterization of the DdlA and DdlB enzymes*. Biochemistry, 1991. **30**(6): p. 1673-82.
100. Ellsworth, B.A., N.J. Tom, and P.A. Bartlett, *Synthesis and evaluation of inhibitors of bacterial D-alanine:D-alanine ligases*. Chem Biol, 1996. **3**(1): p. 37-44.
101. Anderson, J.S., et al., *Lipid-Phosphoacetylmuramyl-Pentapeptide and Lipid-Phosphodisaccharide-Pentapeptide: Presumed Membrane Transport Intermediates in Cell Wall Synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**: p. 881-9.
102. Bouhss, A., et al., *The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 208-33.
103. Ruiz, N., *Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15553-7.
104. Lovering, A.L., et al., *Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis*. Science, 2007. **315**(5817): p. 1402-5.

105. Bertsche, U., et al., *In vitro* murein peptidoglycan synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(45): p. 38096-101.
106. Mirelman, D. and Y. Nuchamowitz, *Biosynthesis of peptidoglycan in Pseudomonas aeruginosa. 1. The incorporation of peptidoglycan into the cell wall*. *Eur J Biochem*, 1979. **94**(2): p. 541-8.
107. Bush, K., *Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes*. *Rev Sci Tech*, 2012. **31**(1): p. 43-56.
108. Kahan, F.M., et al., *The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin)*. *Ann N Y Acad Sci*, 1974. **235**(0): p. 364-86.
109. Lambert, M.P. and F.C. Neuhaus, *Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from Escherichia coli W*. *J Bacteriol*, 1972. **110**(3): p. 978-87.
110. David, H.L., K. Takayama, and D.S. Goldman, *Susceptibility of mycobacterial D-alanyl-D-alanine synthetase to D-cycloserine*. *Am Rev Respir Dis*, 1969. **100**(4): p. 579-81.
111. Brandish, P.E., et al., *Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. **40**(7): p. 1640-4.
112. Cavalleri, B., et al., *A-16686, a new antibiotic from Actinoplanes. I. Fermentation, isolation and preliminary physico-chemical characteristics*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1984. **37**(4): p. 309-17.
113. Breukink, E. and B. de Kruijff, *Lipid II as a target for antibiotics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(4): p. 321-32.
114. Cudic, P., et al., *Functional analysis of the lipoglycopeptide antibiotic ramoplanin*. *Chem Biol*, 2002. **9**(8): p. 897-906.
115. Ostash, B. and S. Walker, *Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity*. *Nat Prod Rep*, 2010. **27**(11): p. 1594-617.
116. Tipper, D.J. and J.L. Strominger, *Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1965. **54**(4): p. 1133-41.
117. Ghuysen, J.M., *Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins*. *Annu Rev Microbiol*, 1991. **45**: p. 37-67.

118. McCormick, M.H., et al., *Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties*. *Antibiot Annu*, 1955. **3**: p. 606-11.
119. Reynolds, P.E., *Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1989. **8**(11): p. 943-50.
120. Lovering, A.L., S.S. Safadi, and N.C. Strynadka, *Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 451-78.
121. Mol, C.D., et al., *Crystal structures of active fully assembled substrate- and product-bound complexes of UDP-N-acetylmuramic acid:L-alanine ligase (MurC) from Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(14): p. 4152-62.
122. Smith, C.A., *Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases*. *J Mol Biol*, 2006. **362**(4): p. 640-55.
123. Bertrand, J.A., et al., *Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes*. *J Mol Biol*, 1999. **289**(3): p. 579-90.
124. Perdih, A., et al., *Targeted molecular dynamics simulation studies of binding and conformational changes in E. coli MurD*. *Proteins*, 2007. **68**(1): p. 243-54.
125. Anderson, M.S., et al., *Kinetic mechanism of the Escherichia coli UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme: use of a glutathione S-transferase fusion*. *Biochemistry*, 1996. **35**(50): p. 16264-9.
126. Bouhss, A., et al., *MurC and MurD synthetases of peptidoglycan biosynthesis: borohydride trapping of acyl-phosphate intermediates*. *Methods Enzymol*, 2002. **354**: p. 189-96.
127. Boniface, A., et al., *The MurE synthetase from Thermotoga maritima is endowed with an unusual D-lysine adding activity*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(23): p. 15680-6.
128. Bouhss, A., et al., *Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1997. **36**(39): p. 11556-63.
129. Eveland, S.S., D.L. Pompliano, and M.S. Anderson, *Conditionally lethal Escherichia coli murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and folyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily*. *Biochemistry*, 1997. **36**(20): p. 6223-9.

130. Sangshetti, J.N., et al., *Mur Ligase Inhibitors as Anti-bacterials: A Comprehensive Review*. *Curr Pharm Des*, 2017. **23**(21): p. 3164-3196.
131. Silver, L.L. and K.A. Bostian, *Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. **37**(3): p. 377-83.
132. Spratt, B.G., *Resistance to antibiotics mediated by target alterations*. *Science*, 1994. **264**(5157): p. 388-93.
133. Chopra, I., *Protein synthesis as a target for antibacterial drugs: current status and future opportunities*. *Expert Opin Investig Drugs*, 1998. **7**(8): p. 1237-44.
134. Martinez, J.L. and F. Baquero, *Mutation frequencies and antibiotic resistance*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(7): p. 1771-7.
135. Bush, K., *The evolution of beta-lactamases*. *Ciba Found Symp*, 1997. **207**: p. 152-63; discussion 163-6.
136. Abraham, E.P. and E. Adler, *The specificity of diaphorase (coenzyme factor)*. *Biochem J*, 1940. **34**(1): p. 119-27.
137. Eniyan, K., et al., *Development of a one-pot assay for screening and identification of Mur pathway inhibitors in Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 35134.
138. Vetting, M.W., et al., *Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(28): p. 25265-73.
139. Tomlinson, J.H., et al., *A target-protection mechanism of antibiotic resistance at atomic resolution: insights into FusB-type fusidic acid resistance*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19524.
140. Floss, H.G. and T.W. Yu, *Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis*. *Chem Rev*, 2005. **105**(2): p. 621-32.
141. Hooper, D.C., *Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci*. *Lancet Infect Dis*, 2002. **2**(9): p. 530-8.
142. Mendes, R.E., L.M. Deshpande, and R.N. Jones, *Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms*. *Drug Resist Updat*, 2014. **17**(1-2): p. 1-12.
143. Leclercq, R., *Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications*. *Clin Infect Dis*, 2002. **34**(4): p. 482-92.

144. Toh, S.M., et al., *Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistant to the synthetic antibiotic linezolid*. Mol Microbiol, 2007. **64**(6): p. 1506-14.
145. Arias, C.A. and B.E. Murray, *The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 266-78.
146. Hiramatsu, K., et al., *Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. Infect Chemother, 2013. **45**(2): p. 117-36.
147. Moellering, R.C., Jr., *MRSA: the first half century*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(1): p. 4-11.
148. Chopra, I., *Over-expression of target genes as a mechanism of antibiotic resistance in bacteria*. J Antimicrob Chemother, 1998. **41**(6): p. 584-8.
149. Hamilton-Miller, J.M., *Reversal of activity of trimethoprim against gram-positive cocci by thymidine, thymine and 'folates'*. J Antimicrob Chemother, 1988. **22**(1): p. 35-9.
150. Zervos, M.J. and D.R. Schaberg, *Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **28**(3): p. 446-8.
151. Kutter, E., et al., *Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections*. Curr Pharm Biotechnol, 2010. **11**(1): p. 69-86.
152. d'Herelle, F., *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques*. Comptes rendus Acad Sci Paris, 1917. **165**(373-5).
153. Twort, F.W., *An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses*. The Lancet, 1915. **186** (4814): p. 1241-1243.
154. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
155. Cwirla, S.E., et al., *Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6378-82.
156. Azzazy, H.M. and W.E. Highsmith, Jr., *Phage display technology: clinical applications and recent innovations*. Clin Biochem, 2002. **35**(6): p. 425-45.
157. Hamzeh-Mivehroud, M., et al., *Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery*. Drug Discov Today, 2013. **18**(23-24): p. 1144-57.

158. Huang, J.X., S.L. Bishop-Hurley, and M.A. Cooper, *Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(9): p. 4569-82.
159. Christensen, D.J., et al., *Phage display for target-based antibacterial drug discovery*. *Drug Discov Today*, 2001. **6**(14): p. 721-727.
160. Alirezapour, B., et al., *Production and characterization of recombinant scFv against digoxin by phage display technology*. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2013. **32**(3): p. 172-9.
161. Gnanasekar, M., et al., *Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi**. *Infect Immun*, 2004. **72**(8): p. 4707-15.
162. Wang, L.F. and M. Yu, *Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics*. *Curr Drug Targets*, 2004. **5**(1): p. 1-15.
163. Ardekani, L.S., et al., *A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori**. *Int J Infect Dis*, 2013. **17**(9): p. e723-8.
164. Bazl, M.R., et al., *Production of chimeric recombinant single domain antibody-green fluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells*. *Hybridoma (Larchmt)*, 2007. **26**(1): p. 1-9.
165. Sainath Rao, S., K.V. Mohan, and C.D. Atreya, *A peptide derived from phage display library exhibits antibacterial activity against *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa**. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56081.
166. Pini, A., et al., *Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(7): p. 2665-72.
167. Bishop-Hurley, S.L., P.J. Rea, and C.S. McSweeney, *Phage-displayed peptides selected for binding to *Campylobacter jejuni* are antimicrobial*. *Protein Eng Des Sel*, 2010. **23**(10): p. 751-7.
168. Fokine, A., et al., *Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(16): p. 6003-8.
169. Rao, V.B. and L.W. Black, *Structure and assembly of bacteriophage T4 head*. *Virology*, 2010. **7**: p. 356.

170. Shivachandra, S.B., et al., *In vitro binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4 capsid surface through Hoc-capsid interactions: a strategy for efficient display of large full-length proteins*. *Virology*, 2006. **345**(1): p. 190-8.
171. Novagen, *T7 phage display and protein interactions*. www.novagen.com, 2009-2010.
172. Kerby, G.P., R.A. Gowdy, and et al., *Purification pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of Escherichia coli*. *J Immunol*, 1949. **63**(1): p. 93-107.
173. Ackermann HW, T.D., Moineau S, *Long-term bacteriophage preservation*. *WFCC Newsletter*, 2004. **38**: p. 35–40.
174. Sternberg, N. and R.H. Hoess, *Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1609-13.
175. Mikawa, Y.G., I.N. Maruyama, and S. Brenner, *Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads*. *J Mol Biol*, 1996. **262**(1): p. 21-30.
176. Zanghi, C.N., et al., *A simple method for displaying recalcitrant proteins on the surface of bacteriophage lambda*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(18): p. e160.
177. RH, H., *Bacteriophage lambda as a vehicle for peptide and protein display*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2002. **3**(1): p. 23–28.
178. Wilson, D.R. and B.B. Finlay, *Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology*. *Can J Microbiol*, 1998. **44**(4): p. 313-29.
179. Loset, G.A., et al., *Expanding the versatility of phage display II: improved affinity selection of folded domains on protein VII and IX of the filamentous phage*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17433.
180. Eckert, B., et al., *Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(7): p. 619-23.
181. Schmitz, U., et al., *Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies--a review*. *Placenta*, 2000. **21 Suppl A**: p. S106-12.
182. Tikunova, N.V. and V.V. Morozova, *Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection*. *Acta Naturae*, 2009. **1**(3): p. 20-8.
183. Iannolo, G., et al., *Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein*. *J Mol Biol*, 1995. **248**(4): p. 835-44.

184. Malik, P., et al., *Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage*. J Mol Biol, 1996. **260**(1): p. 9-21.
185. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 7978-82.
186. Rakonjac, J., et al., *Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications*. Curr Issues Mol Biol, 2011. **13**(2): p. 51-76.
187. Davies, J.C., *Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence*. Paediatr Respir Rev, 2002. **3**(2): p. 128-34.
188. Guyer, M.S., et al., *Identification of a sex-factor-affinity site in E. coli as gamma delta*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1981. **45 Pt 1**: p. 135-40.
189. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
190. El Zoeiby, A., et al., *In vitro reconstruction of the biosynthetic pathway of peptidoglycan cytoplasmic precursor in Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **201**(2): p. 229-35.
191. Arnold, F.H., *Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(2): p. 151-6.
192. Porath, J., *Immobilized metal ion affinity chromatography*. Protein Expr Purif, 1992. **3**(4): p. 263-81.
193. Sefton, A.M., *Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium*. Drugs, 2002. **62**(4): p. 557-66.
194. Foundation, C.F., *Pseudomonas genome database 2017*.
195. Mamedov, T.G., et al., *A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates*. Comput Biol Chem, 2008. **32**(6): p. 452-7.
196. El Zoeiby, A., et al., *Cloning, over-expression and purification of Pseudomonas aeruginosa murC encoding uridine diphosphate N-acetylmuramate: L-alanine ligase*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **183**(2): p. 281-8.
197. Zhang, J., *Protein-Protein Interactions in Salt Solutions in Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools*, W.C. (Ed.), Editor. 2012, InTech. p. 359-372.

198. Thomas, A.S. and A.H. Elcock, *Direct observation of salt effects on molecular interactions through explicit-solvent molecular dynamics simulations: differential effects on electrostatic and hydrophobic interactions and comparisons to Poisson-Boltzmann theory*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(24): p. 7796-806.
199. Dzubielia, J., *Salt-specific stability and denaturation of a short salt-bridge-forming alpha-helix*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(42): p. 14000-7.
200. Ebrahimizadeh, W. and M. Rajabibazl, *Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application*. Curr Microbiol, 2014. **69**(2): p. 109-20.
201. Barbas, C.F., *Phage display : a laboratory manual*. 2001, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
202. Bakhshinejad, B. and M. Sadeghizadeh, *A polystyrene binding target-unrelated peptide isolated in the screening of phage display library*. Anal Biochem, 2016. **512**: p. 120-128.
203. Menendez, A. and J.K. Scott, *The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies*. Anal Biochem, 2005. **336**(2): p. 145-57.
204. Bakhshinejad, B., et al., *Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library*. Amino Acids, 2016. **48**(12): p. 2699-2716.
205. Qiang, X., et al., *Discovery of a polystyrene binding peptide isolated from phage display library and its application in peptide immobilization*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2673.
206. Nguyen, K.T., et al., *Identification and characterization of mutant clones with enhanced propagation rates from phage-displayed peptide libraries*. Anal Biochem, 2014. **462**: p. 35-43.
207. Brammer, L.A., et al., *A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site*. Anal Biochem, 2008. **373**(1): p. 88-98.
208. Thomas, W.D., M. Golomb, and G.P. Smith, *Corruption of phage display libraries by target-unrelated clones: diagnosis and countermeasures*. Anal Biochem, 2010. **407**(2): p. 237-40.