

Construction et caractérisation d'hydrolases du peptidoglycane avec de nouvelles propriétés antibactériennes

Promoteurs : Dr. Christelle Devillé et Dr. Mohammed Terrak

Année académique 2018 - 2019

*Ce travail a été réalisé par
El moussaoui Khalid pour
l'obtention du diplôme de
Bachelier – Technologue
de laboratoire médical
(option chimie clinique).*

Catégorie Paramédicale
CHU – B36 /Tour 4 / bureau 4/32
Quartier Hôpital – 15, Avenue Hippocrate
B-4000 Liège (Sart-Tilman)

Tel. : 0032(0)4 / 366 43 70
Fax : 0032(0)4 / 366 43 74

E-mail : secr.paramedical@hech.be

URL : <http://www.biomedcharlemagne.be>

Table des matières

INTRODUCTION	6
1.1. LA PAROI BACTÉRIENNE	6
1.1.1. <i>La paroi des bactéries Gram +</i>	6
1.1.2. <i>La paroi des bactéries Gram -</i>	7
1.2. LE PEPTIDOGLYCANE	8
1.2.1. <i>Structure et composition du peptidoglycane</i>	8
1.2.2. <i>Biosynthèse du peptidoglycane</i>	9
1.3. LES HYDROLASES DU PEPTIDOGLYCANE	10
1.4. L'AMIDASE AMIC	12
1.5. LA PROTÉINE FTSN	13
1.5.1. <i>Le domaine SPOR</i>	13
1.6. LES LYSOZYMES.....	14
1.6.1. <i>Le phage λ</i>	14
1.6.2. <i>Le lysozyme du phage λ</i>	14
1.7. LA LYSOSTAPHINE	15
1.8. FONCTIONS DES HYDROLASES DU PEPTIDOGLYCANE	16
1.9. LE SYSTÈME SYNZIP	17
OBJECTIFS	18
2.1. LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	18
2.2. LES ENJEUX DE LA RECHERCHE	19
MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
3.1. MATÉRIEL.....	20
3.1.1. <i>Souches bactériennes</i>	20
3.1.2. <i>Plasmides</i>	20
3.1.3. <i>Enzymes</i>	21
3.1.4. <i>Milieux de culture</i>	21
3.1.5. <i>Antibiotiques</i>	21
3.1.6. <i>Gel SDS-PAGE</i>	22
3.1.7. <i>Marqueurs de poids moléculaires</i>	22
3.1.8. <i>Solutions et tampons</i>	23
3.2. MÉTHODE D'EXPRESSION ET DE PURIFICATION	24
3.2.1. <i>Transformation de cellules compétentes</i>	24
3.2.2. <i>Expression de la protéine</i>	24
3.2.3. <i>Extraction de la protéine</i>	25
3.2.4. <i>Purification de la protéine sur colonne d'affinité</i>	25
3.2.5. <i>Dessalage de la protéine</i>	26
3.2.6. <i>Concentration de la protéine</i>	26
3.3. MÉTHODE DE CARACTÉRISATION PAR SEC-MALS	27
3.3.1. <i>Principe de la chromatographie SEC-MALS</i>	27
3.4. MÉTHODE DE CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE.....	28
3.4.1. <i>Turbidity reduction assay (TRA)</i>	28
3.4.2. <i>Growth inhibition assay (GIA)</i>	28
3.4.3. <i>Test d'hydrolyse sur PG marqué au RBB</i>	28

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	29
4.1. EXPRESSION ET PURIFICATION	29
4.2. CARACTÉRISATION PAR <i>SEC – MALS</i>	32
4.3. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE	37
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	39
5.1. EXPRESSION ET PURIFICATION	40
5.2. CARACTÉRISATION	41
BIBLIOGRAPHIE	42
ANNEXES.....	45

Table des abréviations

#	<ul style="list-style-type: none">6H : 6 Histidines (<i>histag</i>)λL : Lysozyme du phage λ
B	<ul style="list-style-type: none">BP : Boîte de PétriBSA : Bovine Serum Albumin
C	<ul style="list-style-type: none">CBD : Cell wall Binding DomainCQI : Contrôle Qualité Iterne
D	<ul style="list-style-type: none">DO_{600nm} : Densité Optique à 600 nm
E	<ul style="list-style-type: none">eBLSE : Entérobactéries sécrétrices de β-Lactamases à Spectre Elargi
F	<ul style="list-style-type: none">FT : Flow ThroughFRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	<ul style="list-style-type: none">GEWL : Goose Egg White LysozymeGIA : Growth Inhibition AssayGlcNAc : N-acétyl glucosamine
H	<ul style="list-style-type: none">HEWL : Hen Egg White LysozymeHPG : Hydrolases du PeptidoGlycane
I	<ul style="list-style-type: none">IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
L	<ul style="list-style-type: none">LB : Lysogeny BrothLPS : LipoPolySaccharides
M	<ul style="list-style-type: none">MH : Mueller HintonMurNAc : acide N-ACétyl MURamique
P	<ul style="list-style-type: none">PBP : Penicillin Binding Proteins
R	<ul style="list-style-type: none">RBB : Remazol Brilliant BlueRpfA : Resuscitation-Promoting Factor A
S	<ul style="list-style-type: none">SARM : Staphylococcus aureus Résistant à la MéticillineSDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel ElectrophoresisSEC-MALS : Size Exclusion Chromatography - Multi Angle Light ScatteringSOC : Super Optimal broth with Catabolite repressionSZ : SynZip
T	<ul style="list-style-type: none">T4L : Bactériophage T4 LysozymeTGS : Tris Glycine SDSTP : Tampon de la ProtéineTRA : Turbidity Reduction Assay
U	<ul style="list-style-type: none">UDP : Uridine DiPhosphate

Avant-propos

Ce travail de fin d'études a été réalisé au centre d'ingénierie des protéines de Liège, dans le laboratoire « paroi et division cellulaire » sous la supervision du docteur Mohammed Terrak. Le but de ce travail est de produire de nouvelles hydrolases du peptidoglycane en associant un domaine catalytique avec un domaine de liaison au peptidoglycane. Ces associations de domaines sont possibles grâce à l'utilisation du système SynZip.

Chacun des domaines sera produit au sein d'*E. coli* et purifié sur colonne d'affinité. Ils seront ensuite associés entre eux et analysés en utilisant la technique de *Size-exclusion chromatography – multi angle light scattering (SEC-MALS)* afin de s'assurer de la formation des complexes. Pour finir, l'activité des protéines sera caractérisée en utilisant 3 tests : le *turbidity reduction assay (TRA)*, le *growth inhibition assay (GIA)* et le test d'hydrolyse du peptidoglycane marqué au *remazol brilliant blue (RBB)*.

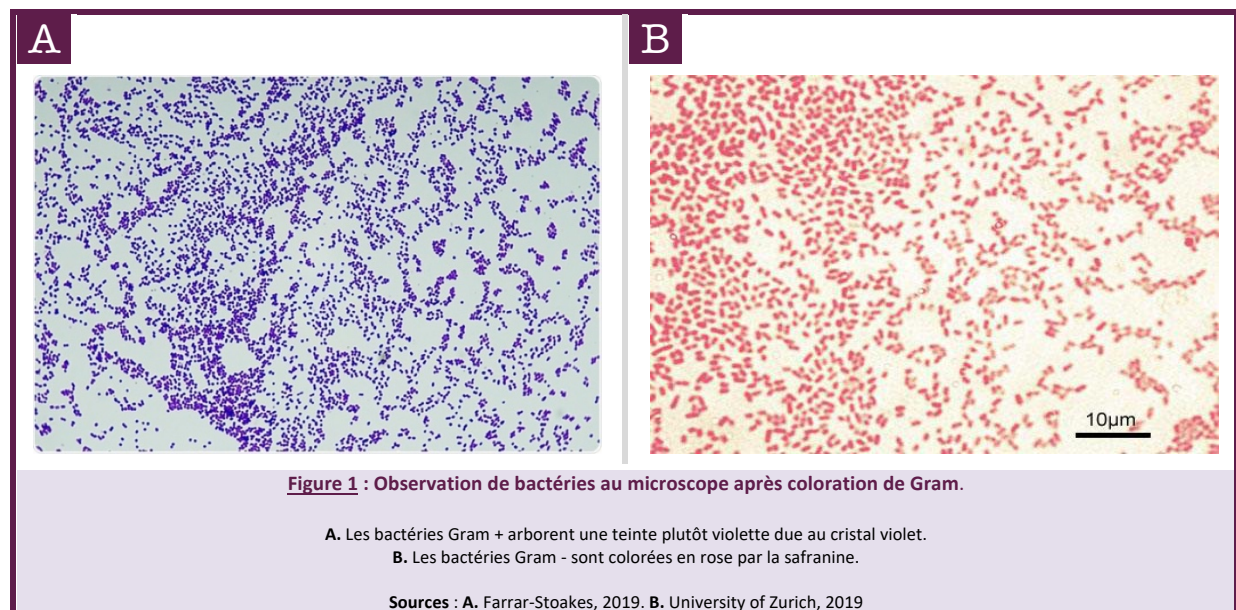
The page features a light purple-to-pink gradient background. In the top-left and bottom-right corners, there are decorative brackets made of dark purple lines, consisting of a horizontal line and a vertical line meeting at a right angle.

Introduction

1.1. La paroi bactérienne

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes par opposition aux cellules eucaryotes dont ils diffèrent sur plusieurs points. L'une des différences primordiales qu'il existe entre ces deux types cellulaires est la paroi. Cette structure est propre aux bactéries, elle n'existe chez aucune cellule eucaryote. Elle est principalement composée d'une macromolécule complexe, le peptidoglycane (PG, également appelé muréine). La paroi confère à la bactérie sa forme et lui assure une protection contre la pression osmotique. Bien que la paroi soit une caractéristique commune des bactéries (exception faite des bactéries du genre *Mycoplasma*), il en existe différentes versions (Vollmer et Bertsche, 2008).

En 1884, Hans Christian Gram met au point une coloration différentielle qui divise les bactéries en 2 grands groupes : les bactéries arborant une teinte plutôt violette, dites « Gram positives » (**figure 1A**) et celles qui arborent une teinte plutôt rosâtre, dites « Gram négatives » (**figure 1B**). Cette différence de réaction à la coloration de Gram s'explique par des différences morphologiques au sein de la paroi. Ainsi, les bactéries Gram +, dont la paroi est composée d'une épaisse couche de PG, retiennent le premier pigment mis en contact avec la paroi, le cristal violet. Les bactéries Gram - s'imprègnent certes de ce pigment, mais leur fine couche de PG ne leur permet pas de le retenir avec autant d'efficacité que les bactéries Gram +. Ainsi, lors de la décoloration à l'alcool, les bactéries Gram - perdent leur teinte tandis que les bactéries Gram + restent mauves. Une seconde coloration (à la safranine) colore les bactéries Gram - en rose tandis que les bactéries Gram + restent mauves (Moyes et al., 2009).

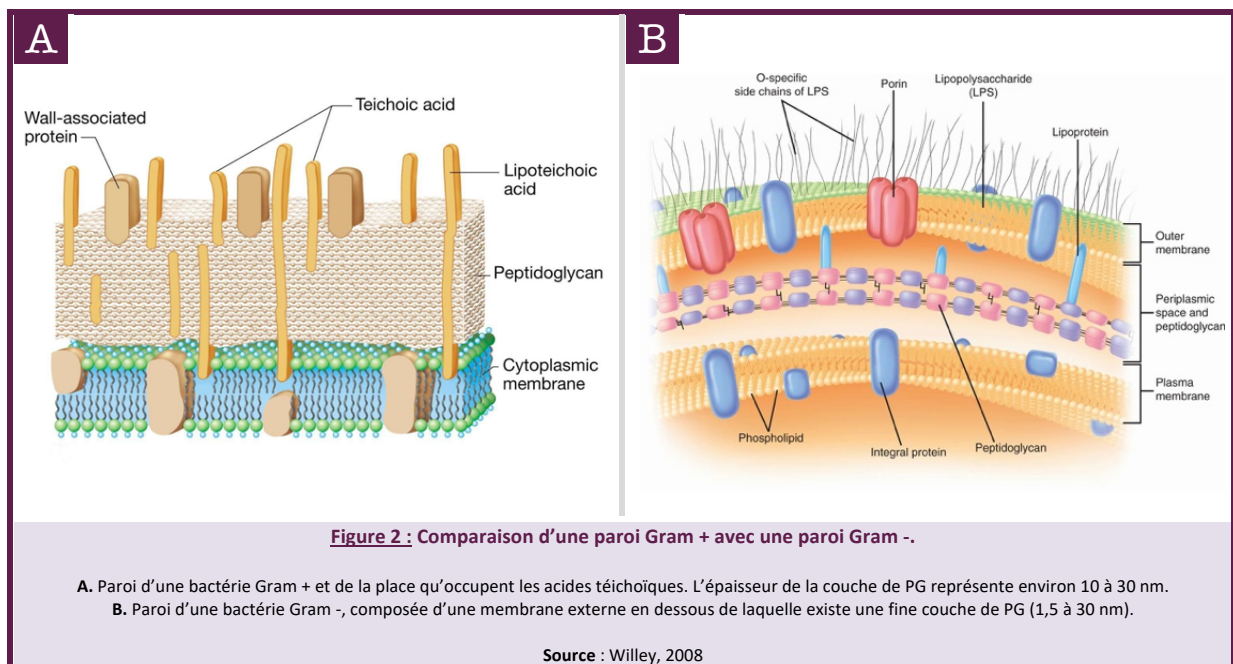


1.1.1. La paroi des bactéries Gram +

La paroi des bactéries Gram + diffère de celle des bactéries Gram - sur trois points : l'absence de membrane externe, l'épaisseur nettement plus importante du PG ainsi que la présence d'acides téichoïques. Ces derniers se lient de manière covalente au PG, jouant un rôle important dans la stabilisation de la paroi. Lorsqu'ils sont liés de manière covalente à la membrane plasmique, ils sont nommés acides lipotéichoïques (**figure 2A**).

1.1.2. La paroi des bactéries Gram -

La paroi des bactéries Gram - diffère de celle des bactéries Gram + de par la présence d'une membrane externe, en plus de la membrane interne. L'espace délimité par ces deux membranes est appelé espace périplasmique. C'est au sein de cet espace que se trouve le PG. Comparé au PG présent dans la paroi des bactéries Gram +, le PG des bactéries Gram - est beaucoup plus fin et il n'existe pas d'acide téichoïque. Cependant, il existe des protéines spécifiques aux bactéries Gram -, les lipoprotéines de Braun (**figure 2B**) qui relient le PG à la membrane externe. D'autres protéines sont présentes dans cette membrane externe, comme les porines responsables d'une certaine perméabilité de la membrane. Les lipopolysaccharides (LPS) jouent un rôle dans la pathogénicité de la bactérie.



1.2. Le peptidoglycane

Le PG, principal composant de la paroi bactérienne, est localisé au niveau du périplasma. Selon les espèces, des variations peuvent avoir lieu au niveau des chaînes peptidiques qui le composent. Cependant, la structure de base demeure relativement conservée d'une bactérie à une autre.

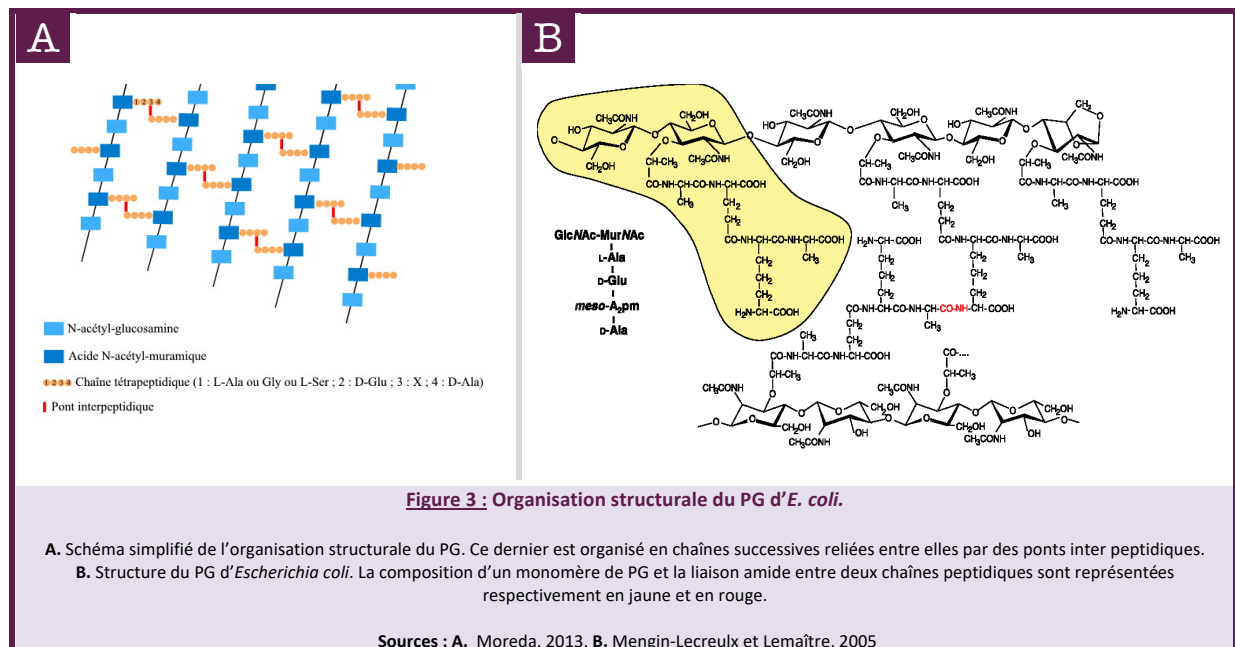
1.2.1. Structure et composition du peptidoglycane

Le PG est un hétéropolymère organisé en chaînes (**figure 3A**), chaque chaîne étant formée de 2 composantes :

- une première composante glucidique (glycane), formée par une alternance de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétyl-muramique (MurNAc) unis par une liaison β_{1-4}
- une seconde composante peptidique, formée au minimum de 4 acides aminés avec alternance de configurations L et D. Cette chaîne peptidique est toujours fixée sur l'acide muramique.

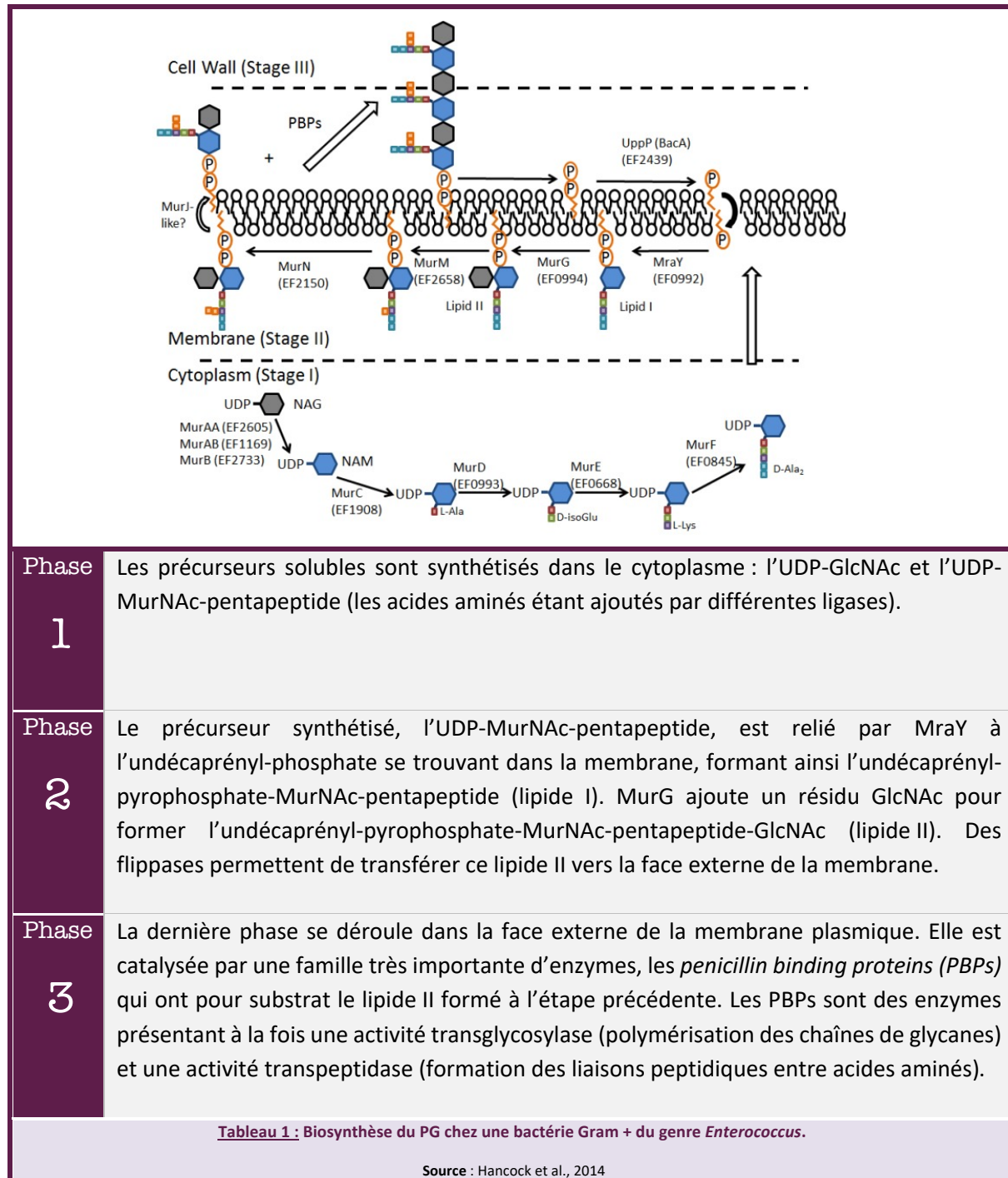
Les différentes chaînes sont reliées entre elles par des ponts interpeptidiques formant ainsi un véritable réseau maillé entourant la bactérie. Dans la littérature scientifique, ce réseau maillé est appelé « *sacculus* ». La rigidité de la structure est directement proportionnelle au nombre de liaisons interpeptidiques (Vollmer, 2015).

Comme explicité précédemment, des variations de PG existent (notamment au sein des séquences peptidiques). Dans le cas de la bactérie *Escherichia coli*, la séquence d'acides aminés qui composent la chaîne peptidique est la suivante : L-alanine, D-acide glutamique, Meso-acide diaminopimelique et enfin D-alanine (**figure 3B**).



1.2.2. Biosynthèse du peptidoglycane

La biosynthèse du PG se déroule en 3 phases : une phase cytoplasmique suivie de deux phases membranaires (**tableau 1**).

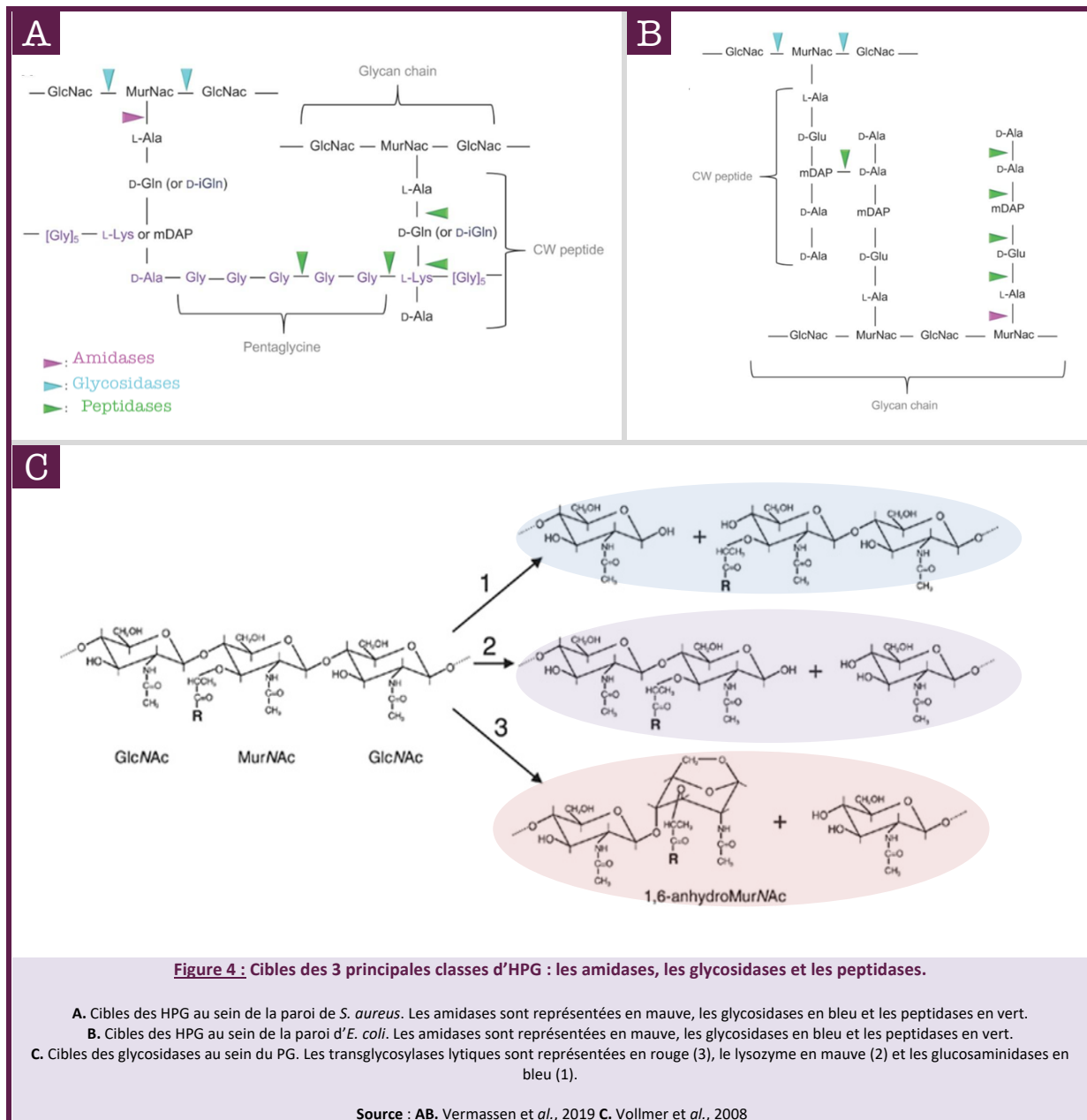


La paroi n'est pas une structure fixe. Durant la croissance bactérienne, le PG est dégradé. Cette dégradation s'accompagne d'un phénomène de recyclage (*turn-over*) permettant à la cellule de réutiliser les résidus issus de la dégradation pour synthétiser du nouveau PG. L'équilibre entre la synthèse et le processus de *turn-over* est essentiel, la moindre dérégulation serait néfaste pour la bactérie, allant même jusqu'à provoquer la lyse.

1.3. Les hydrolases du peptidoglycane

Historiquement, c'est le microbiologiste écossais Sir Alexander Fleming qui découvre la première hydrolase du PG en 1921. Il observe une substance capable de lyser les bactéries sur boîte de Pétri (BP) et baptise cette dernière « lysozyme ». Les hydrolases du PG (HPG) sont en réalité des enzymes capables de dégrader le PG des bactéries. Elles sont souvent constituées de 2 domaines distincts : l'un est catalytique et situé à l'extrémité N-terminale, l'autre permet la liaison (*Cell Wall Binding Domain, CBD*) au PG et est situé à l'extrémité C-terminale. Le domaine catalytique est relativement conservé au sein des HPG, contrairement au *CBD*. Ces enzymes sont produites par tous les êtres vivants, des virus jusqu'à l'homme et sont spécifiques d'un type de liaison (Vollmer *et al.*, 2008). Il existe des hydrolases s'attaquant uniquement aux PG des bactéries Gram + (**figure 4A**) et d'autres qui sont spécifiques du PG des Gram - (**figure 4B**). Le PG étant formé de 2 composantes, l'une glucidique, l'autre peptidique, une première subdivision peut être faite : les hydrolases spécifiques de la composante peptidique et les hydrolases spécifiques de la composante glucidique (**tableau 2**).

P E P T I D I Q U E S	Peptidases (Endo – et Carboxy –)		N-Acetylmuramyl-L-alanine amidases	
	Ces enzymes sont capables de cliver des liaisons peptidiques. Une distinction est faite entre les endopeptidases et les carboxypeptidases. Les premières sont spécifiques des liaisons inter-peptidiques. Les secondes clivent spécifiquement la dernière D-alanine de la séquence peptidique du PG. Outre la spécificité du type de liaison, les peptidases possèdent une spécificité pour la configuration (D ou L) d'un acide aminé (figures 4A et 4B).		Ces enzymes clivent la liaison amide entre MurNAc et le côté N-terminal du premier acide aminé de la chaîne peptidique, le L-alanine (figures 4B et 4B). Ces amidases sont retrouvées chez la bactérie sous forme d'autolysines. Elles existent aussi chez les bactériophages sous forme d'endolysines. Un peptide signal permet aux autolysines de traverser la membrane interne. Ce peptide signal est absent de la séquence des endolysines.	
G L U C I D I Q U E S	N-Acetyl-muramidase : Lysozymes	N-Acetyl-muramidase : Transglycosylase lytique	N-Acetyl-glucosaminidase	
	Ces enzymes sont très répandues dans le monde du vivant (voir 1.6. Le lysozyme). Elles clivent les liaisons glycosidiques (β 1-4) entre les résidus GlcNAc et MurNAc, toujours après ce dernier (figure 4C).	Tout comme les lysozymes, ces enzymes clivent la liaison β 1-4 après un résidu MurNAc. Cependant, le mécanisme est différent et aboutit à la formation d'un résidu 1,6 – anhydroMurNAc propre aux transglycosylases lytiques (figure 4C).	Les N-Acetyl-glucosaminidases sont répandues chez les bactéries. Elles hydrolysent les liaisons glycosidiques après le résidu GlcNAc (figure 4C).	
	Tableau 2 : Hydrolases du PG.			
Les peptidases et les amidases sont spécifiques de la composante peptidique du PG, tandis que les lysozymes, les transglycosylases lytiques et les glucosaminidases sont spécifiques de la composante glucidique.				
Source : Vollmer <i>et al.</i> , 2008				



1.4. L'amidase AmiC

Cinq amidases existent chez *E. coli* : AmiA, AmiB, AmiC, AmiD et AmpD. Elles sont constituées d'un domaine catalytique lié à un domaine de liaison au PG (*Cell-wall binding domain, CBD*). Trois se révèlent d'une importance capitale pour la division : AmiA, AmiB et AmiC. Ces enzymes permettent de cliver le PG du septum entre deux cellules filles lors de la division. Lorsqu'*E. coli* est dépourvue de ces amidases, elle continue d'être viable, mais le PG septal n'étant plus clivé, cela engendre la formation de chaînettes (**figures 5B et 5C**).

Il a également été démontré que la délétion d'AmiC génère 20 à 30 % de phénotype en chaînettes tandis que la délétion d'AmiA n'en génère que 5 à 10 %. La délétion d'AmiB ne génère quant à elle aucun phénotype en chaînettes (Heidrich et al., 2001).

AmiB et AmiC sont localisées au niveau du septum tandis qu'AmiA se retrouve de manière diffuse dans le périplasma. Cette différence de localisation s'explique par la structure de ces 3 amidases. AmiB et AmiC sont toutes deux pourvues d'un domaine AMIN à l'inverse d'AmiA (**figure 5A**). Il a été démontré que le domaine AMIN (**figure 5D**) est responsable de la localisation de la protéine au septum lors de la division cellulaire.

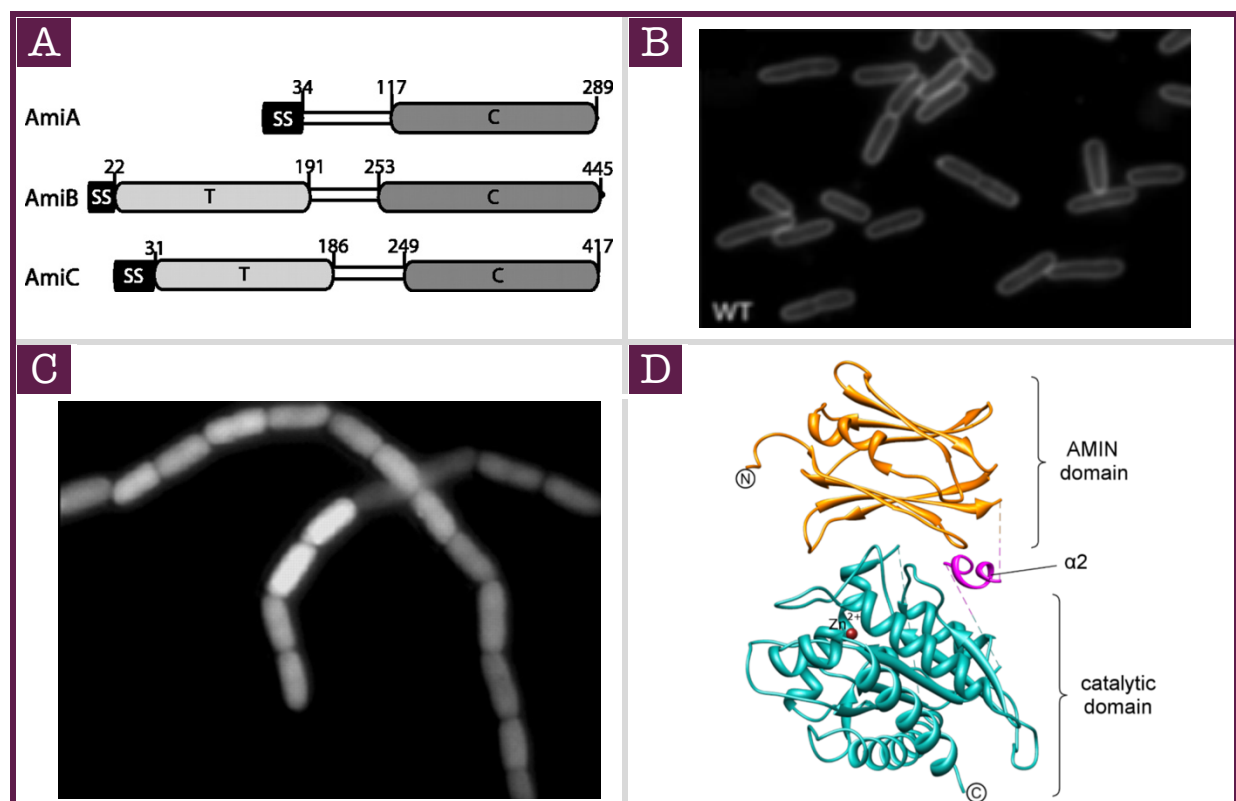


Figure 5 : Structure et fonctions de l'amidase C au sein d'*E. coli*.

- A. Structure simplifiée des amidases AmiA, AmiB et AmiC. SS représente le peptide signal, T représente le domaine AMIN et C le domaine catalytique.
 B. Cellules sauvages d'*E. coli* observées durant la division cellulaire.
 C. Mutants d'*E. coli* dépourvus des amidases AmiA, AmiB et AmiC observés durant la division. La formation de chaînes indique que ces 3 amidases sont importantes pour la séparation des cellules filles.
 D. Structure cristallographique d'AmiC. L'enzyme présente un domaine AMIN en orange, un domaine catalytique en bleu et un linker en rose.

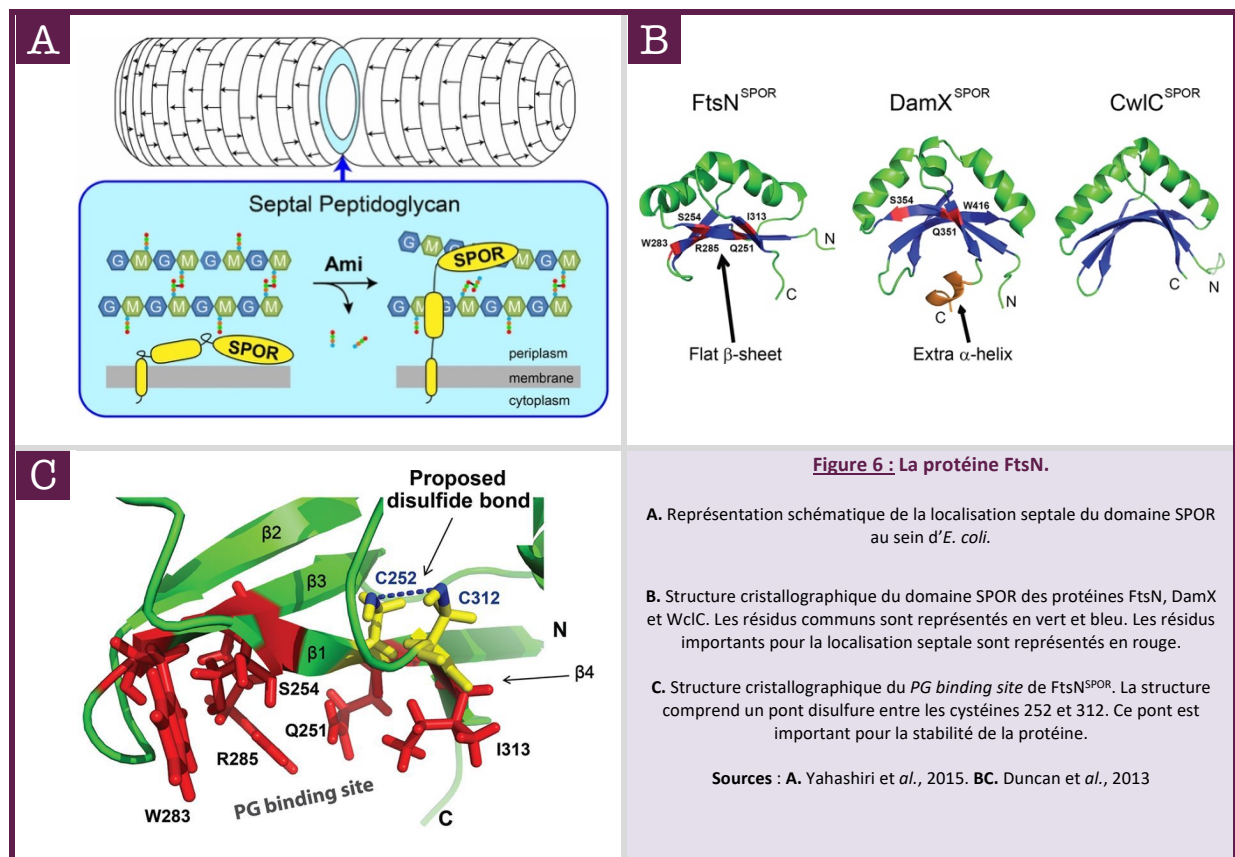
Sources : A. Peters et al., 2011. BC. Priyadarshini et al., 2007. D. Rocaboy et al., 2013

1.5. La protéine FtsN

Bien qu'étant une protéine de régulation sans activité propre, la protéine FtsN est néanmoins essentielle à la division cellulaire d'*E. coli*. Des études ont démontré qu'elle joue un rôle dans la stabilité du divisome¹ et permet la régulation de la synthèse du PG septal en modulant l'activité de PBP1b². Elle est en grande majorité périplasmique, bien qu'elle possède un segment transmembranaire. En C-terminal, la protéine possède un domaine SPOR (Yahashiri et al., 2015).

1.5.1. Le domaine SPOR

La taille de ce domaine est d'approximativement 75 acides aminés. Sa structure comporte 4 feuillets β et 2 hélices α . Il n'est pas spécifique de la protéine FtsN. Chez *E. coli*, 4 protéines impliquées dans la division cellulaire possèdent ce domaine : DamX, DedD, FtsN et RlpA (figure 6B). Durant la division cellulaire, FtsN est recrutée au septum. L'action des amidases sur le PG septal aboutit à la formation de régions où les chaînes glycanes sont dénudées de la composante peptidique (figure 6A). Ces régions servent de points d'ancrage au domaine SPOR (Yahashiri et al., 2015). Un pont disulfure entre les cystéines 252 et 312 stabilise la structure de la protéine (figure 6C).



¹ Le divisome est un complexe multiprotéique essentiel à la division bactérienne.

² PBP1b (Penicillin Binding Protein 1b) est une enzyme de la famille des acyl-sérine transférases. Elle est partie responsable de la polymérisation du PG septal.

1.6. Les lysozymes

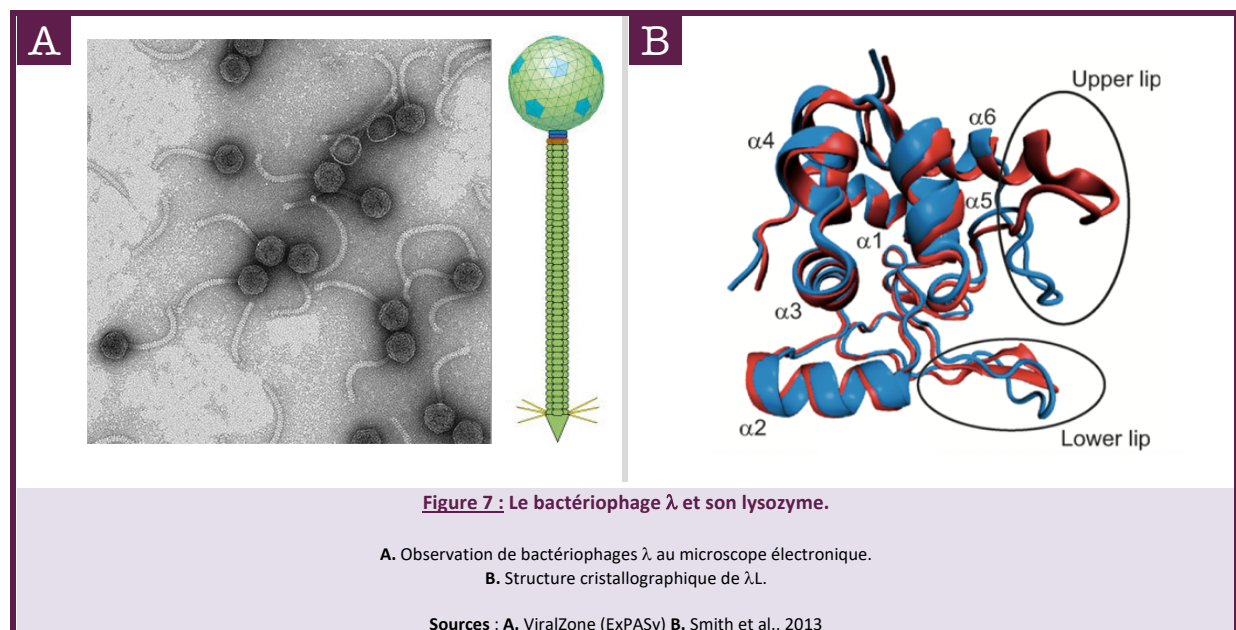
Les lysozymes sont des protéines produites par tous les êtres vivants, de la bactérie à l'homme en passant par les phages. Bien qu'il existe différents lysozymes, une caractéristique est commune : la capacité à cliver les liaisons glycosidiques de type β 1-4.

1.6.1. Le phage λ

Le bactériophage λ est un virus à ADN double brin spécifique d'*E. coli* (**figure 7A**). Il est tempéré, c'est-à-dire qu'il est capable d'alterner cycle lytique et cycle lysogénique contrairement à son homologue le plus connu, le phage T4 (uniquement lytique). D'autres structures permettent la distinction entre ces 2 virus, notamment la présence d'une queue contractile chez le phage T4 (permet l'injection du génome lors de l'infection) qui s'avère absente du phage λ . Chez ce dernier, l'injection du génome se fait par simple diffusion. Lors de la réplication du virus, des HPG sont produites afin de lyser la paroi bactérienne et permettre aux virions de s'échapper de la cellule. L'une de ces enzymes n'est autre que le lysozyme.

1.6.2. Le lysozyme du phage λ

Le lysozyme du phage λ (λ L) est une enzyme monomérique de 158 acides aminés qui catalyse le clivage des liaisons glycosidiques entre les résidus MurNAc et GlcNAc. Contrairement aux autres lysozymes qui hydrolysent ces liaisons, le mécanisme de clivage de λ L implique une transglycosylation intramoléculaire formant un résidu 1,6 — anhydroMurNAc à l'instar des transglycosylases lytiques. Du point de vue structurel, λ L reste similaire aux autres lysozymes. Sa structure cristallographique (**figure 7B**) révèle 2 domaines reliés entre eux par une hélice α (α 3). Le premier domaine est constitué de 2 feuillets β (eux-mêmes formés par 6 brins β) et d'une hélice alpha (α 2). Le second domaine est formé de 4 hélices α (α 1, α 4, α 5 et α 6). Le site actif se trouve entre ces 2 domaines.

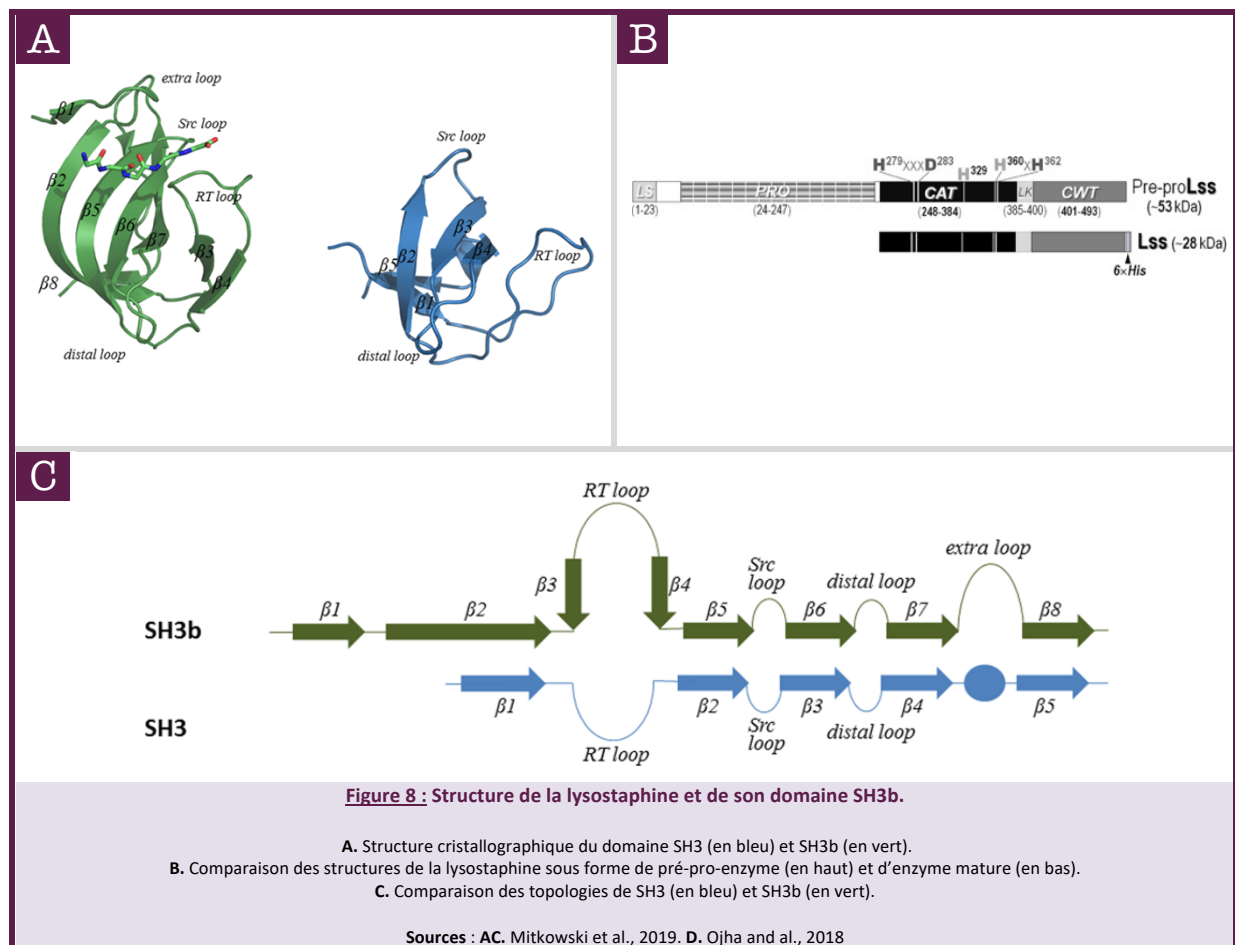


1.7. La lysostaphine

C'est en 1964 que Schindler et Schuhardt, 2 chercheurs du département de microbiologie de l'université du Texas, isolent une substance lytique à partir d'une souche de *Staphylococcus simulans*. Cette substance s'avère spécifique du genre *Staphylococcus* et ils décident donc de lui attribuer le nom de lysostaphine. Cette substance est en réalité une endopeptidase zinc-dépendante qui clive spécifiquement le pont pentaglycine présent dans la paroi des *S. aureus* (Iversen et Grov, 1973).

La lysostaphine est synthétisée sous forme d'une pré-pro-enzyme de 53 kDa contenant un peptide signal, une région PRO, un domaine catalytique, un linker et un domaine de liaison au PG, appelé *Cell Wall Targeting (CWT)*. Différentes étapes de maturation permettent d'atteindre la taille finale de 27 kDa. Dès lors, la protéine n'est plus constituée que d'un domaine catalytique (N-terminal) lié au domaine CWT (C-terminal) par le linker (**figure 8B**).

Le domaine de liaison CWT possède une structure très proche du domaine SH3-like bactérien (appelé SH3b), qui possède lui-même une analogie structurale avec le domaine SH3 (*SRC Homology 3*) présent chez les organismes eucaryotes (**figure 8A**). Ce dernier est un module qui permet la reconnaissance des motifs riches en prolines. Sa structure 3D montre un grand sillon dont le fond et les parois sont tapissés de résidus aromatiques, hautement conservés (**figure 8C**). C'est dans ce sillon que s'insèrent les motifs riches en prolines (Mayer et al., 1993).



1.8. Fonctions des hydrolases du peptidoglycane

In vivo, les hydrolases du PG jouent plusieurs rôles primordiaux pour la bactérie, tant pour la croissance que pour la division (**tableau 3**).

Fonction	Description
Régulation de la croissance bactérienne	Les HPG lysent les liaisons au sein du PG permettant à la bactérie d'y insérer des sous-unités (pentapeptide-MurNAc-GlcNAc) afin d'agrandir le <i>sacculus</i> et permettre à la bactérie de croître (Shockman et Høltje, 1994).
Induction de β -lactamases	Les transglycosylases lytiques interviennent durant le <i>turn-over</i> du PG et produisent un résidu 1,6 — anhydromuropeptide. Des études ont montré que l'accumulation de ce dernier induit des β -lactamases (Jacobs et al., 1997).
Séparation des cellules filles durant la division	Les amidases clivent le PG septal durant la division cellulaire, libérant ainsi les 2 cellules filles (1.4. L'amidase AmiC).
Sporulation et germination	Chez <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium</i> , les HPG interviennent notamment pour hydrolyser le PG de la cellule mère afin de libérer l'endospore. Elles interviennent également pour dégrader le PG formant la couche externe de l'endospore pour permettre la germination (Foster et Popham, 2002).
Assemblage de structures transmembranaires	Chez <i>E. coli</i> , les pores qui se trouvent dans le PG ont une taille uniforme et laissent passer des molécules de 50 à 100 kDa. L'étude des <i>clusters</i> génétiques codant pour de larges structures telles qu'un flagelle a révélé l'existence de séquences qui codent pour des HPG de type transglycosylases lytiques. Ces HPG spécialisées permettent d'élargir les pores afin de permettre l'insertion de structures traversant la paroi (Koraimann, 2003).
Réactivation de cellules dormantes	<i>Micrococcus luteus</i> peut entrer dans un état VBNC (<i>Viable But Non-Culturable</i>) durant lequel il ne se divise plus. L'ajout de <i>resuscitation-promoting factor</i> (<i>RpfA</i>) dans le milieu permet de réactiver la prolifération cellulaire (Mukamolova et al., 1998). L'analyse cristallographique de ces <i>RpfA</i> a révélé une structure similaire aux N-Acetyl-muramidases (Mukamolova et al., 2006).
Formation de <i>biofilms</i>	<i>Lactococcus lactis</i> est un agent formant des biofilms. Lorsqu'une des autolysines majeures de ce dernier est inactivée (<i>AcmA</i>), celui-ci forme de longues chaînes incapables d'adhérer à une surface. L'addition de lysozyme brise ces chaînes et améliore sensiblement l'adhérence (Mercier et al., 2002).

Tableau 3 : Liste non exhaustive des différents rôles des hydrolases du PG.

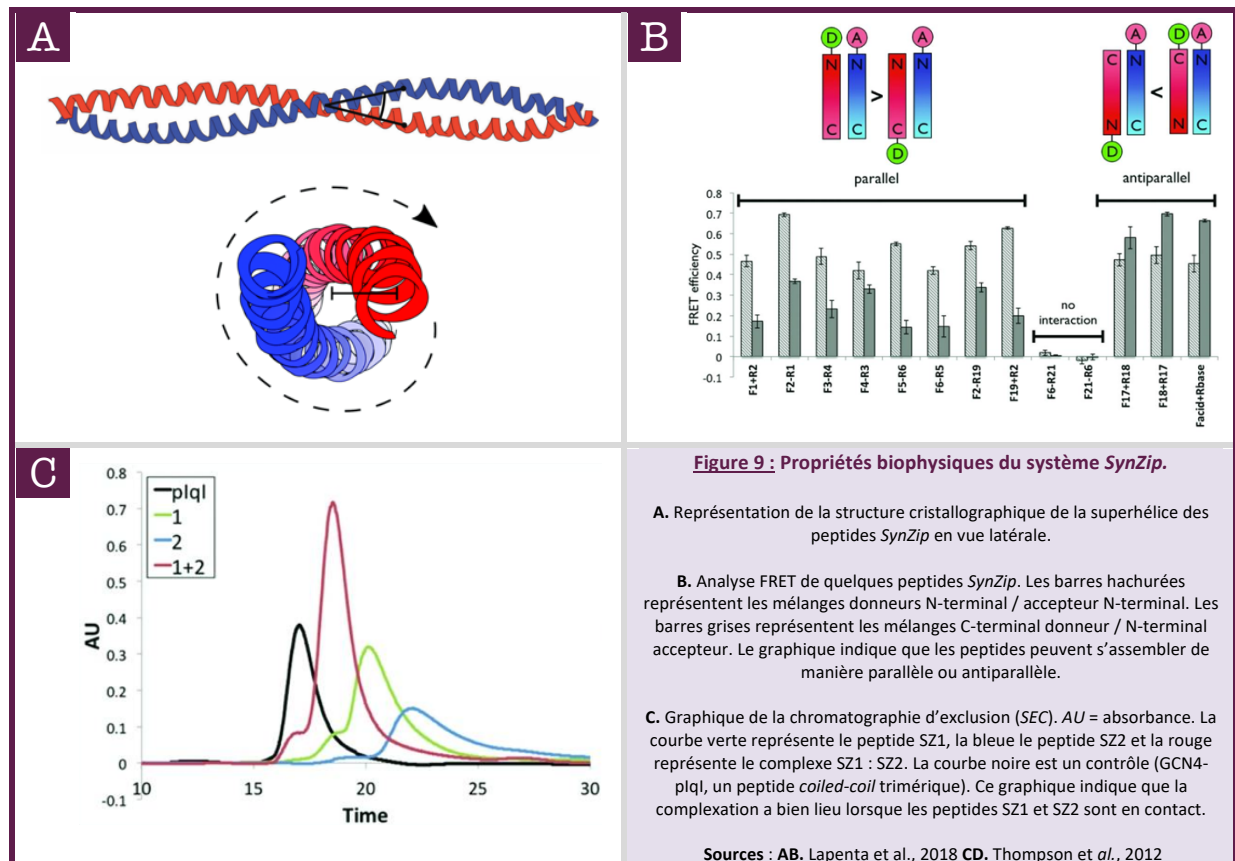
Source : Vollmer et al., 2008

1.9. Le système *SYNZIP*

Les peptides *SynZip* sont des peptides synthétiques de structure *coiled-coil*, c'est-à-dire que leur structure est un enchaînement d'hélices α formant une superhélice (**figure 9A**). Ils sont liés à une protéine à travers un *linker* permettant une certaine flexibilité. Au total, 22 *SynZips* ont été synthétisés et 27 paires ont été caractérisées (états d'oligomérisation, orientation des hélices et affinités) par différentes techniques dont la cristallographie, la chromatographie d'exclusion et la *fluorescent resonance energy transfer* (**figures 9A, 9B et 9C**). Ces peptides présentent donc l'avantage d'être diversifiés, bien caractérisés et interagissent entre eux de manière non covalente avec une bonne affinité ($K_D < 10$ nM pour le complexe SZ1 : SZ2). Ils facilitent grandement les combinaisons de domaines (*Thompson et al., 2012*). Un protocole expérimental est imaginé à des fins d'illustration. Dans ce dernier, 100 domaines catalytiques doivent être combinés avec 100 domaines de *binding* pour produire des protéines chimères. Pour ce faire, l'expérimentateur dispose de 2 solutions :

- 1 Exprimer chaque protéine chimère possible, soit $n = 100^{100} = 10\ 000$ possibilités.
- 2 Greffer un peptide *SynZip* sur chaque domaine, il suffira par la suite de combiner 2 domaines pour qu'ils s'associent entre eux. Nombre total de protéines à exprimer : 200.

Ce système réduit considérablement le nombre de protéines à exprimer. Il permet la construction et le *screening* rapide de multiples combinaisons de *CBD* et de domaines catalytiques pour sélectionner les protéines chimères fonctionnelles en vue d'une application médicale ou industrielle.

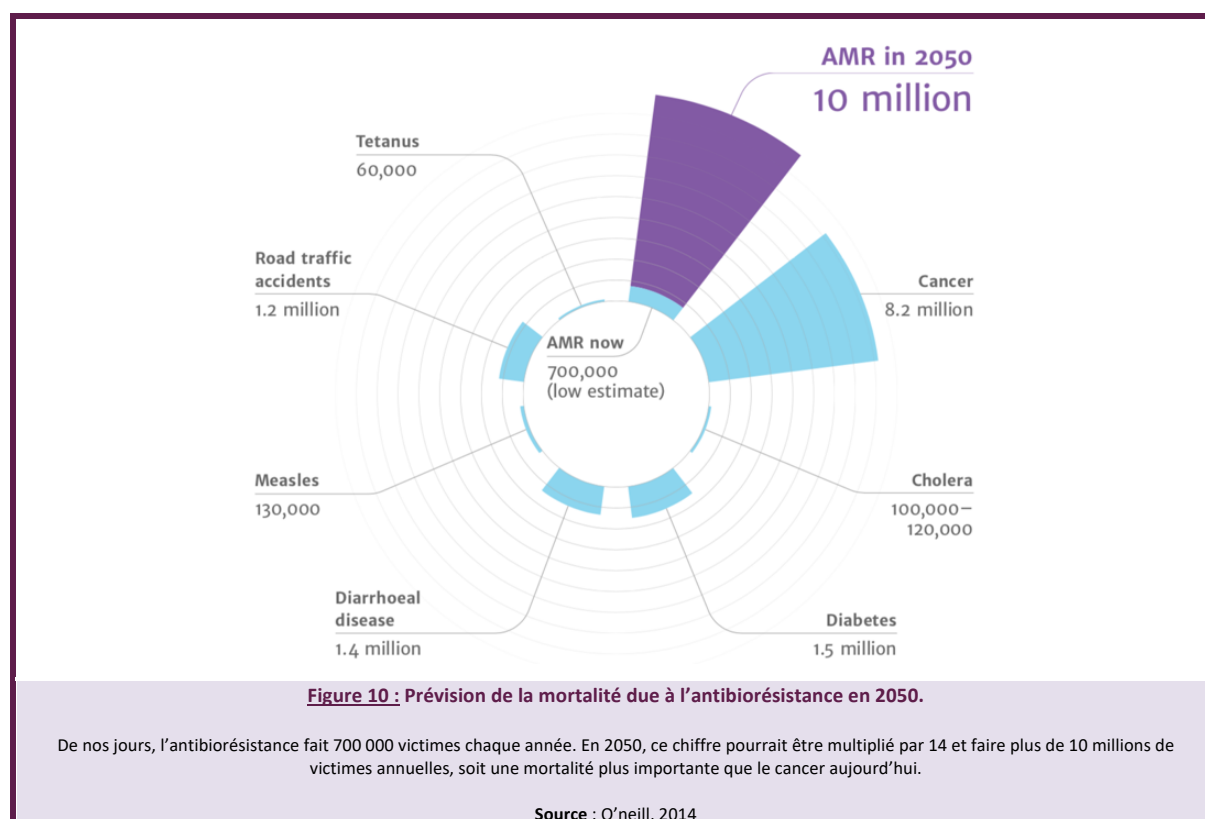


Objectifs

2.1. La résistance aux antibiotiques

A l'origine, les antibiotiques sont des molécules synthétisées de manière naturelle par les microorganismes. L'exemple le plus connu est celui de la pénicilline découverte en 1928 par Alexander Fleming. Cette substance naturellement synthétisée par le champignon *Penicillium notatum* est capable d'inhiber la croissance des bactéries environnantes. Son efficacité remarquable a conduit à une utilisation massive souvent injustifiée, créant une pression de sélection sur les populations bactériennes (l'antibiotique tue les bactéries sensibles, laissant le champ libre aux bactéries résistantes afin qu'elles prolifèrent). C'est seulement 3 ans après sa commercialisation que les premières souches résistantes à la pénicilline font leur apparition.

Au fil du temps, les infections bactériennes sont devenues de plus en plus difficiles à combattre. Aujourd'hui, la principale menace vient des entérobactéries sécrétrices de β -lactamases à spectre élargi (*eBLSE*). Ce mécanisme de résistance est inquiétant pour 2 raisons : d'une part, il est plasmidique, ce qui lui assure une diffusion à la fois horizontale et verticale ; d'autre part le réservoir potentiel est majeur puisque chaque animal à sang chaud est porteur d'entérobactéries au sein de son tube digestif. Aujourd'hui plus que jamais, il est nécessaire de développer des agents capables de s'attaquer spécifiquement à une bactérie pathogène tout en épargnant les bactéries symbiotiques. Un rapport publié en 2014 prédit qu'en 2050, la mortalité annuelle due à l'antibiorésistance sera supérieure à la mortalité annuelle due au cancer actuellement (**figure 10**). En d'autres termes, si rien n'est fait aujourd'hui pour contrer l'antibiorésistance, une personne en sera victime toutes les 3 secondes d'ici 30 ans (O'neill, 2016). La recherche avance cependant et plusieurs agents ont été mis au point : phages, lysines, anticorps ou encore peptides, tous sont porteurs d'espoir pour lutter contre ce problème majeur de santé publique.



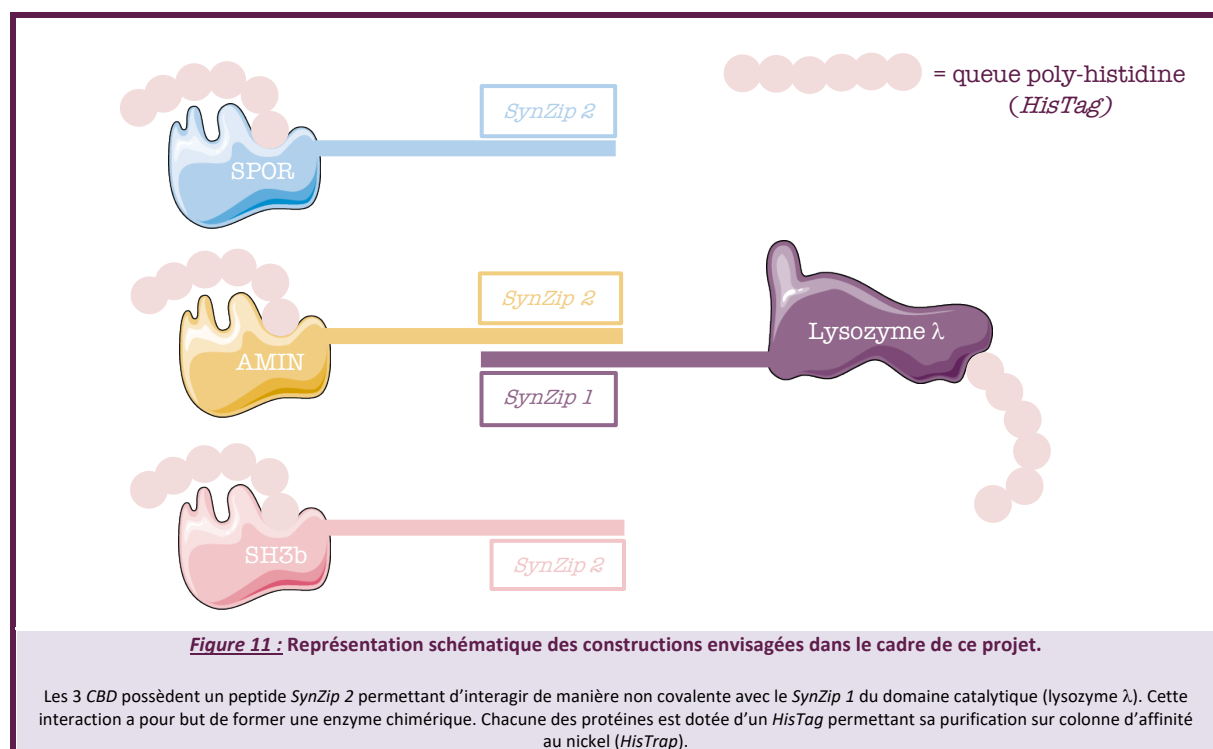
2.2. Les enjeux de la recherche

Le principal frein à la phagothérapie est le risque de mutation *in vivo* des virus. L'idée de ce projet est donc de tirer parti de la spécificité des phages tout en évitant ce risque de mutation. Les lysines représentent un excellent candidat dont l'efficacité *in vivo* a plusieurs fois été démontrée. En 2010, une lysine chimérique s'est avérée plus efficace que le traitement conventionnel (mupirocine) pour la décolonisation cutanée de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) (Pastagia *et al.*, 2010). Les lysines ne sont cependant pas limitées à un usage cutané, une étude a démontré l'efficacité de l'endolysine ClyS (*chimeric lysin for staphylococci*) pour lutter contre une septicémie provoquée par injection intrapéritonéale de SARM chez un modèle murin (Daniel *et al.*, 2010).

Le but de ce projet est donc de créer des protéines chimères constituées d'un domaine catalytique lié à un CBD grâce au système SynZip. Pour ce faire, 3 CBD ont été utilisés : le domaine SPOR de la protéine FtsN, le domaine SH3b de la lysostaphine et le domaine AMIN de l'amidase C (figure 11). Une étude précédente a tenté d'exprimer différents domaines catalytiques (CHAP, M23 et λ L). Cependant, ce dernier fut le seul à être soluble et sera par conséquent le seul domaine catalytique exprimé. En théorie, combiner un domaine catalytique avec un CBD permettrait d'augmenter son activité et pourrait même lui conférer une certaine spécificité pour une bactérie. Les 2 objectifs pour vérifier cette hypothèse sont les suivants :

- 1 L'expression et la purification des 3 CBD et du lysozyme.
- 2 La caractérisation des protéines (au SEC-MALS et fonctionnelle).

Ce projet de recherche s'inscrit dans la lignée d'un ensemble de travaux dont le but à long terme est de mettre au point une collection d'HPG capables de s'attaquer spécifiquement à une bactérie, et ce, de manière efficace pour combattre une infection *in vivo*.





Matériel et méthodes

3.1. Matériel

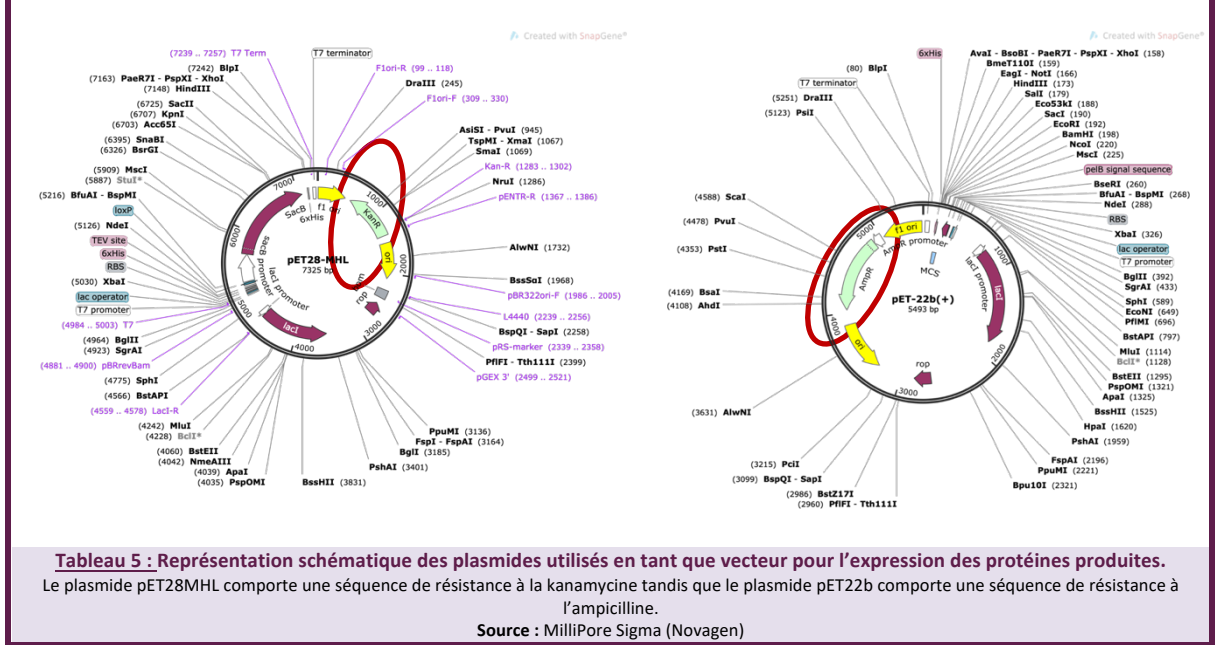
3.1.1. Souches bactériennes

Souche	Génotype
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int ::(lacI::PlacUV5 ::T7 gene1) i21 Δnin5</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	/

Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées.

3.1.2. Plasmides

Plasmide	Taille (pb)	Description
pET22b	5493	Il s'agit d'un plasmide contenant une séquence qui code pour une β— lactamase. La bactérie ayant acquis le plasmide devient résistante à l'ampicilline. Ce plasmide est utilisé pour la production de protéines sans <i>histag</i> .
pET28MHL	7325	Il s'agit d'un plasmide contenant une séquence qui code pour une résistance à la kanamycine. Ce plasmide est utilisé pour la production de protéines avec <i>histag</i> .



3.1.3. Enzymes

Enzyme	Firme / référence	Description
<i>Benzonase Nuclease</i>	Novagen	Endonucléase qui dégrade l'ADN et l'ARN. Lors de la lyse des bactéries, des acides nucléiques sont libérés. Or ces acides nucléiques sont visqueux en solution. L'ajout de benzonase permet de réduire cette viscosité.

Tableau 6 : Enzymes utilisées.
Source : MilliPore Sigma (Novagen)

3.1.4. Milieux de culture

Milieu	Composition (par litre de milieu)
LB (<i>Luria Bertani</i>)	10 g tryptone 5 g <i>yeast extract</i> 10 g NaCl (20 g agar si nécessaire)
SOC (<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>)	20 g tryptone 5 g <i>yeast extract</i> 0,6 g NaCl 1,9 g KCl 2 g MgCl ₂ 2,5 g MgSO ₄ 4g glucose
MH (<i>Mueller Hinton</i>)	3g peptones 17,5g hydrolysats de caséine 1,5g amidon

Tableau 7 : Milieux de culture utilisés.

3.1.5. Antibiotiques

Antibiotiques	Concentration	Description
Ampicilline	100 µg/mL	Antibiotique de la classe des β-lactamines, utilisé pour sélectionner les bactéries ayant acquis le plasmide pET22b lors d'une transformation.
Kanamycine	50 µg/mL	Antibiotique de la classe des aminosides qui interfère avec l'activité des ribosomes, conduisant ainsi à un dysfonctionnement de la synthèse protéique. Dans ce cas-ci, il est utilisé pour sélectionner les bactéries ayant acquis le plasmide pET28MHL.

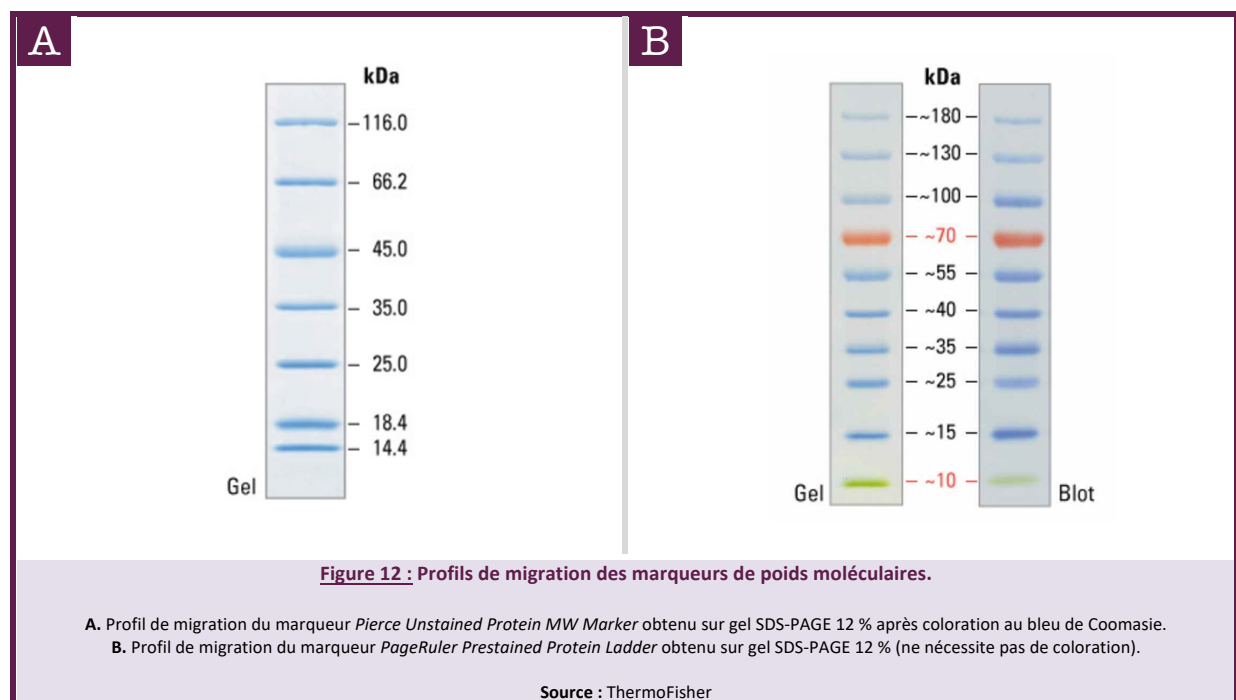
Tableau 8 : Antibiotiques utilisés.

3.1.6. Gel SDS-PAGE

	Composition
Gel à 6 %	2 mL acrylamide 2,5 mL tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 100 µL SDS 10 % 5,4 mL H ₂ O 10 µL TEMED 100 µL APS 10 %
Gel à 15 %	7,5 mL acrylamide 3,75 mL tris-HCl 1,5 M (pH 8,5) 150 µL SDS 10 % 3,6 mL H ₂ O 15 µL TEMED 150 µL APS 10 %

Tableau 9 : Composition des gels SDS-PAGE.

3.1.7. Marqueurs de poids moléculaires



3.1.8. Solutions et tampons

Solution	Composition/firme
Imidazole	Concentration stock à 4 M
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside Concentration stock à 1 M
<i>PageBlue Protein Staining Solution</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i> (24620)
Tampon de protéine (TP1)	30 mM Tris/HCl (pH 7,5) 300 mM NaCl 10 % Glycérol
Tampon de protéine 0,7 % CHAPS ³ (TP2)	30 mM Tris/HCl (pH 7,5) 300 mM NaCl 10 % Glycérol 0,7 % CHAPS
Tampon de lyse	30 mM Tris/HCl (pH 7,5) 300 mM NaCl 10 % Glycérol 2 mM MgSO ₄ 1,5 U/mL benzonase
Tampon de perméabilisation	TP1 saturé en chloroforme
Tampon phosphate 50 mM	1M Na ₂ HPO ₄ 1M NaH ₂ PO ₄
Tampon TGS	Tris-HCl 25 mM Glycine 192 mM SDS 0,1% pH = 8,5

Tableau 10 : Solutions et tampons utilisés.

³ CHAPS, ou 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate est un détergent non dénaturant.

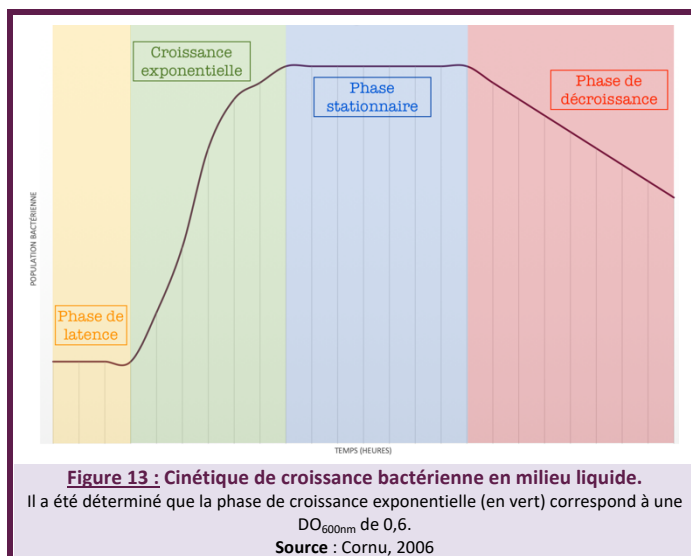
3.2. Méthode d'expression et de purification

3.2.1. Transformation de cellules compétentes

Des bactéries compétentes, *E. coli* BL21 (DE3), sont transformées par choc thermique avec les plasmides recombinants suivants : pET28MHL-SZ2-AMIN, pET28MHL-SZ2-SPOR, pET28MHL-SZ2-SH3b et pET28MHL-Lysozyme-SZ1.

Ces bactéries se trouvent dans la banque de cellules du *CIP* à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Elles doivent être dégelées à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min avant utilisation. Pour la transformation, 100 ng de plasmide sont ajoutés au tube contenant les bactéries et placé à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 30 min avant d'être rapidement transféré dans un bain-marie à $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 45 sec. Le tube est ensuite à nouveau placé à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 2 min. Pour finir, 500 μL de milieu SOC y sont transférés afin de permettre la croissance bactérienne sans pour autant induire la production de la protéine (**Annexe 01**). Ce tube est incubé durant 1 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation à 250 RPM. Durant ce temps, 4 BP contenant du milieu LB-Agar sont préparées et supplémentées en ampicilline à une concentration finale de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pour le plasmide pET22b) ou en kanamycine à une concentration finale de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (pour le plasmide pET28MHL). Après incubation, 125 μL de la suspension bactérienne sont étalés en masse sur chaque boîte. Ces boîtes sont incubées durant 24 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Expression de la protéine



La production des protéines nécessite la remise en suspension des bactéries dans 1 L de milieu LB pour chaque domaine produit. Cependant, il est déconseillé de passer directement d'une colonie à un volume de production aussi grand. En effet, la phase de croissance serait tellement lente qu'il faudrait induire la culture durant la nuit. Pour pallier à ce problème de *timing*, les bactéries sont remises en suspension dans 25 mL de milieu LB supplémenté de l'antibiotique adéquat et la suspension est incubée 24 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation (250 RPM).

Le lendemain, 10 mL de pré-culture sont transférés dans un erlenmeyer contenant 1 L de milieu LB supplémenté d'ampicilline ou de kanamycine. Cet erlenmeyer est placé à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation (250 RPM) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) atteigne une valeur de 0,5 - 0,6 (phase exponentielle) (**figure 13**). L'erlenmeyer est alors immédiatement placé à $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation (250 RPM) durant 1 h. Au terme de cette incubation, l'IPTG est ajouté à une concentration finale de 1 mM afin d'induire la synthèse de protéines (**Annexe 01**). L'incubation de ces erlenmeyers se fait à $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ sous agitation (250 RPM) durant 1 nuit.

3.2.3. Extraction de la protéine

La première étape de l'extraction consiste à récupérer les cellules bactériennes. Les suspensions bactériennes sont transférées dans des fioles adaptées à la centrifugeuse puis centrifugées à 6380 g à 15 °C pendant 15 min.

Les protéines étant cytoplasmiques, le surnageant est constitué principalement de milieu LB et est éliminé. Le culot est remis en suspension dans du tampon de lyse, auquel 5 µL de benzonase sont ajoutés. Le tout est passé 4 fois au disrupteur (pression entre 1500 et 2000 bars). Lorsque les cellules sont lysées, la protéine d'intérêt est libérée dans le milieu. Il est à noter que la couleur de la suspension bactérienne doit virer au brun, signe que les cellules sont bien lysées. Durant cette étape, il est indispensable de maintenir le tube sur glace afin de contrer au mieux l'échauffement du liquide. En cas d'élévation trop importante de la température, la protéine produite peut précipiter.

La prochaine étape consiste à séparer les résidus de cellules lysées du milieu contenant la protéine d'intérêt. La suspension est transférée dans une fiole adaptée à la centrifugeuse (*Beckman Coulter*) puis centrifugée à 18 000 g, à 4 °C pendant 20 min. Le surnageant récolté est directement filtré (0,45 µm) pour éliminer les résidus restants. La solution obtenue est appelée « extrait soluble ». Le culot est quant à lui remis en suspension dans du tampon de lyse.

3.2.4. Purification de la protéine sur colonne d'affinité

La protéine produite est marquée par un *histag* (6 histidines consécutives possédant une forte affinité pour le nickel). Le principe de la purification est simple : l'extrait soluble contenant la protéine est mis en contact avec 1 mL de résine (billes de silice *coatées* de sulfate de nickel) durant 30 min à 4 °C sous agitation afin d'augmenter la probabilité d'interaction entre les deux entités. La protéine d'intérêt

Tampons d'élution	Volume colonne
TA	20
TA + imidazole 20 mM	20
TA + imidazole 50 mM	10
TA + imidazole 80 mM	10
TA + imidazole 100 mM	10
TA + imidazole 200 mM	5
TA + imidazole 500 mM	10

Tableau 11 : Concentrations d'imidazole utilisées pour la purification de la protéine.

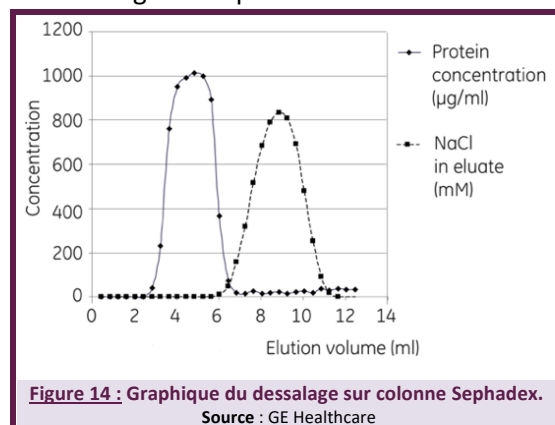
marquée par l'*histag* s'accroche aux billes *coatées* avec une grande affinité. Des impuretés peuvent également se lier aux billes avec une faible affinité. Cette suspension (billes de silice + extrait) est filtrée sur une colonne contenant un filtre qui retient les billes de silice et, avec elles, la protéine d'intérêt. Le liquide qui s'écoule au travers de cette colonne, appelé *flow through (FT)*, ne contient pas (ou du moins en théorie) de protéine d'intérêt. Pour s'en assurer, le liquide est récolté dans un

tube et sera ultérieurement déposé sur gel d'électrophorèse. Lorsque tout le FT s'est écoulé, des volumes déterminés de tampons d'élution sont passés sur la colonne. Ces tampons d'élution contiennent une concentration croissante d'imidazole⁴ (**tableau 11**). Toutes ces fractions sont récoltées et déposées sur gel acrylamide (15 %) afin, d'une part, de s'assurer de la présence de la protéine et d'autre part d'en contrôler la pureté. Les fractions les plus pures sont rassemblées et dessalées sur colonne *Sephadex* afin d'éliminer l'imidazole et ainsi accroître grandement la stabilité de la protéine.

⁴ L'imidazole possède une forte affinité pour le nickel. Il entre en compétition avec les impuretés et les décroche des billes *coatées*. A faible concentration, seul les impuretés ayant 1 ou 2 histidine sont décrochées. A partir de 200 mM, les protéines ayant 6 histidines consécutives sont décrochées progressivement.

3.2.5. Dessalage de la protéine

Le dessalage de la protéine se fait sur une colonne Sephadex (GE Healthcare). Il s'agit d'une colonne



de type tamis moléculaire qui permet de soustraire l'imidazole du milieu où se trouve la protéine. La résine contenue dans la colonne est conservée dans de l'éthanol (20 %). Avant utilisation de la colonne, il est nécessaire de chasser cet éthanol en éluant un volume de 25 mL d'eau milli-q⁵. Vingt-cinq mL de tampon A sont ensuite élués sur la colonne afin de l'équilibrer. Lorsque ces deux étapes de préparation sont réalisées, la colonne est prête à recevoir l'échantillon. Il existe cependant quelques points à respecter :

- Le volume maximum d'échantillon que peut dessaler la colonne est de 2,5 mL par *run*⁶.
- Le tampon doit être à température ambiante, sous peine d'endommager la résine contenue dans la colonne.

L'échantillon est donc déposé sur la colonne (volume de 2,5 mL) et pénètre la résine. Le *FT* n'est pas récolté (il contient uniquement du tampon). Une fois que l'échantillon a entièrement pénétré la résine, 3,5 mL de tampon A sont élués sur la colonne et le *FT* est récupéré dans un tube (contenant la protéine dessalée) (**figure 14**).

3.2.6. Concentration de la protéine

Idéalement, la concentration de la protéine doit être de 1 mg/mL. En pratique, la concentration obtenue après purification est nettement inférieure et avoisine les 0,2 mg/mL⁷. Afin de concentrer l'échantillon, il existe des solutions commercialisées par Merck Millipore : les systèmes Amicon Ultra. Il s'agit d'un tube contenant un filtre basé sur le

Protéine	Corrélation ABS-Conc.
6H – SZ2 – AMIN	1 mg / mL \Leftrightarrow 0,614
6H – SZ2 – SPOR	1 mg / mL \Leftrightarrow 0,836
6H – LYSO – SZ1	1 mg / mL \Leftrightarrow 1,258
6H – SZ2 – SH3b	1 mg / mL \Leftrightarrow 1,660

Tableau 12 : Corrélation absorbance/concentration des protéines.
Source : ExPASy

principe du tamis moléculaire. Dans un premier temps, 10 mL de tampon A sont transférés sur le filtre et le tube est centrifugé à 3000 g pendant 15 min à 4 °C afin d'équilibrer le filtre. Le *FT* est éliminé et l'échantillon à concentrer est chargé sur le filtre. Le tube est ensuite centrifugé à 3000 g, à 4 °C par *run* de 5 min. L'absorbance (280 nm) de la solution est mesurée après chaque purification et la concentration est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot l \cdot C$)⁸. Le tableau ci-dessus (**tableau 12**) montre la corrélation entre l'absorbance et une concentration de 1 mg/mL. Pour vérifier la présence d'agrégats, l'échantillon est analysé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 320 nm. Une valeur nulle ou très faible indique l'absence d'agrégats.

⁵ L'eau milli-q est une eau ultra pure produite par un système de filtration combiné au principe d'osmose inverse.

⁶ Un « *run* » est défini comme étant l'enchaînement de 3 étapes : le passage de 2,5 mL d'échantillon, l'éluat de 3,5 mL de tampon et l'élimination du NaCl via passage de 10 mL de tampon. Ces 3 étapes constituent ainsi un « *run* ».

⁷ La concentration varie d'un échantillon à un autre. La concentration obtenue pour le lysozyme est 3x supérieure à celle obtenue pour le domaine AMIN.

⁸ A : absorbance, ϵ : coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, l : largeur de cuve en cm, C : concentration de la solution en mol/L.

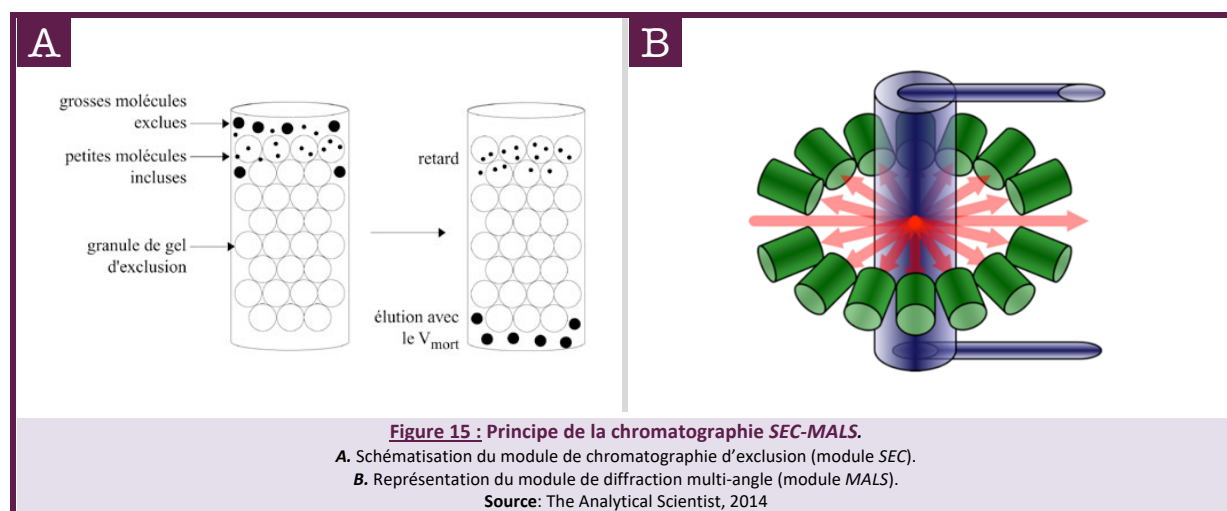
3.3. Méthode de caractérisation par *SEC-MALS*

Chacune des 4 protéines synthétisées possède un peptide de liaison. Ainsi, les domaines AMIN, SPOR et SH3b intègrent un peptide *SynZip 2* tandis que le lysozyme intègre un peptide *SynZip 1*. Les études effectuées précédemment (Thompson et al., 2012) ont démontré que les *SynZip 1* et *2* s'assemblent de manière parallèle et avec une haute affinité. En pratique, il demeure nécessaire de vérifier si l'appairage des deux protéines s'est effectué sans anomalie. Pour ce faire, l'échantillon est analysé par chromatographie *SEC-MALS*.

3.3.1. Principe de la chromatographie *SEC-MALS*

La chromatographie *SEC-MALS* est formée de 2 modules :

- Le module SEC (*Size Exclusion Chromatography*) : il s'agit d'une chromatographie d'exclusion de taille permettant la séparation des différentes composantes d'un échantillon sur base de leur taille moléculaire. Le principe est le suivant : l'échantillon est élué dans un capillaire, lui-même composé d'une matrice inerte formée de granules poreuses. Les molécules dont la taille est supérieure à la taille des pores ne peuvent pénétrer les granules. Elles sont exclues et sont donc éluées rapidement. Quant aux molécules dont la taille est plus petite que le diamètre des pores, elles sont capables de pénétrer les granules et sont ainsi « retardées » (figure 15A).
- Le module MALS (*Multi Angle Light Scattering*) : il s'agit d'un détecteur permettant l'analyse des fractions séparées par le module *SEC*. Trois paramètres sont mesurés : la diffusion de lumière en diffraction laser statique (LS), l'indice de réfraction (RI) et l'absorbance dans la gamme des ultraviolets (UV). La combinaison de ces 3 paramètres permet de déterminer une masse moléculaire approximative ainsi que l'état d'oligomérisation d'une protéine (figure 15B).



En pratique, il est nécessaire d'équilibrer l'appareil avec le même tampon que la protéine (tampon A) avant d'injecter l'échantillon. Lorsque cette étape est réalisée, 150 μ L d'échantillon sont injectés dans l'appareil après avoir encodé les différents paramètres (coefficient d'extinction molaire, taille, concentration) dans le logiciel de gestion. Le débit est réglé sur 0,7 mL/min. La durée d'un *run* est de 40 min.

3.4. Méthode de caractérisation fonctionnelle

Lorsque les protéines sont synthétisées et que les complexes sont formés, il est nécessaire d'en tester l'activité. Les protéines doivent être testées tant sur des bactéries Gram + (*S. aureus*) que Gram - (*E. coli*). Or il existe une différence structurelle entre ces deux types de bactéries, induisant une adaptation du mode opératoire en fonction du type de bactérie (**tableau 13**).

<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Les bactéries ont été mises en suspension dans 25 mL de milieu Mueller Hinton (MH). Le PG étant directement accessible, il n'est pas nécessaire de traiter les cellules avec un agent perméabilisant. Lorsque la DO _{600nm} est de 0,6, la suspension est centrifugée (3000g, 15min, 15°C) et les culot cellulaire est directement remis en suspension dans du tampon phosphate. Le volume est ajusté afin de fixer une DO _{600nm} à 1.	Les bactéries ont été mises en suspension dans 25 mL de milieu LB. Les cellules présentent une membrane externe. Il est donc nécessaire de les traiter avec un agent perméabilisant pour que la protéine puisse accéder au PG sous-jacent. Le culot cellulaire obtenu après centrifugation (3000g, 15min, 15°C) est donc remis en suspension dans du tampon de perméabilisation (3.1.8. Solutions et tampons) durant 45 min sous agitation lente. Après centrifugation (3000g, 15min, 15°C), le culot est nettoyé 2 fois avec du tampon phosphate et la DO _{600nm} est ajustée à 1.

Tableau 13 : Comparaison de la méthode de préparation des cellules (Gram + et Gram -).

3.4.1. Turbidity reduction assay (TRA)

Pour réaliser le *turbidity reduction assay*, 250 µL de suspension bactérienne tamponnée (tampon phosphate, DO ajustée à 1) sont transférés dans les puits d'une microplaque. S'il s'agit de bactéries Gram -, de l'EDTA, à une concentration finale de 1 µM, est ajouté. L'EDTA n'est pas nécessaire pour les bactéries Gram +. Un volume de 50 µL de protéines est ajouté. Dans le cas des complexes, le volume de chaque protéine est ajusté en fonction de la concentration afin d'obtenir, *in fine*, une stœchiométrie équivalente. La plaque est ensuite déposée sur le lecteur de microplaques avec les conditions suivantes : incubation à 37 °C et lecture de la DO_{600nm} toutes les 2 min durant 1 h.

3.4.2. Growth inhibition assay (GIA)

Pour ce test, 250 µL de suspension bactérienne (dans le milieu LB) en croissance (DO = 0,4) sont transférés dans les puits d'une microplaque en présence d'1 µM d'EDTA s'il s'agit de bactéries Gram -. Cinquante µL de protéines sont ajoutés. La DO_{600nm} est suivie au lecteur de microplaque. Théoriquement, si la protéine possède une quelconque activité, la densité optique devrait stagner. Dans le cas contraire, elle devrait augmenter exponentiellement.

3.4.3. Test d'hydrolyse sur PG marqué au RBB

Pour ce test, du PG, issu de la bactérie *E. coli* et préalablement marqué au *Remazol Brilliant Blue (RBB)*, est utilisé. Vingt µL de PG marqué sont incubés avec 80 µL de l'hydrolase à tester durant 24 h à 37 °C sous agitation (250 RPM). Si l'enzyme est active, le PG-RBB est clivé et libère des produits solubles (*RBB*) dans le surnageant. L'absorbance mesurée (595 nm) après centrifugation (14 000 g, 10 min) dans le surnageant est donc directement proportionnelle à l'activité enzymatique des hydrolases testées.



Résultats et discussions

4.1. Expression et purification

Des bactéries (*E. coli* BL21) ont été transformées avec le plasmide contenant la séquence qui code pour les protéines. Ces cellules ont ensuite été mises en culture à 37 °C durant la nuit dans un milieu de culture LB. Le lendemain, 10 mL de cette suspension bactérienne sont transférés dans 1 L de milieu LB. La DO_{600nm} est surveillée jusqu'à atteindre 0,4 – 0,6. La production de la protéine est ensuite induite avec 1 mM d'IPTG (**Annexe 01**) et la culture est incubée à 18 °C durant la nuit sous agitation. Le lendemain, les cellules sont séparées du milieu par centrifugation. Ces cellules sont mises en suspension dans du tampon de lyse et sont lysées au disrupteur. Le culot est à nouveau séparé du milieu par centrifugation. Les protéines d'intérêt exprimées sont toutes porteuses d'un *histag* permettant une purification sur colonne d'affinité au nickel. Le surnageant est donc filtré (0,45 µm) puis purifié sur cette dernière. L'élution se fait par concentration croissante d'imidazole (20, 50, 80, 100, 200 et 500 mM). Chaque fraction de l'élution a été analysée sur gel SDS-PAGE 15 % coloré au bleu de Coomassie afin d'en déterminer la pureté. Les résultats sont exprimés ci-dessous pour chacun des domaines produits.

L
Y
S
O

Cette protéine possède une taille de 27 kDa (avec l'*histag*). L'analyse du gel (**figure 16**) indique que la protéine est présente à la taille attendue. Cependant, une part importante de cette dernière est perdue dans le *FT*, probablement dû à un volume de matrice trop faible. Aucune autre bande n'est présente sur le gel, la protéine est donc pure. La concentration a été évaluée à 0,87 mg/mL au spectrophotomètre (280 nm).

A
M
I
N

Cette protéine possède une taille de 23 kDa (avec l'*histag*). L'analyse du gel (**figure 17**) indique qu'une seule bande est présente (la deuxième bande correspond au front de migration). La protéine est présente à la taille attendue et sa pureté est correcte. La concentration a été évaluée à 1,36 mg/mL au spectrophotomètre (280 nm).

S
P
O
R

Cette protéine possède une taille de 17,7 kDa (avec l'*histag*). L'analyse du gel (**figure 18**) indique que 2 traits sont présents : l'un aux alentours de 15 kDa (correspond à la protéine d'intérêt) et l'autre aux alentours de 12 kDa. Ce dernier pourrait être une dégradation du domaine SPOR. Aucun autre trait n'est présent sur le gel, la protéine est donc pure. La concentration a été évaluée à 1,02 mg/mL au spectrophotomètre (280 nm).

S
H
3
b

Cette protéine possède une taille de 21,2 kDa (avec l'*histag*). L'analyse du gel (**figure 19**) indique que la protéine est présente à la taille attendue. Cependant, la faible intensité des bandes suggère que la protéine est très diluée. Par ailleurs, l'analyse du *FT* montre la présence d'une bande intense correspondant à la protéine SH3b. Le volume de la matrice *HisTrap* a probablement été insuffisant. Cette dernière a donc été saturée, la majorité de la protéine n'étant pas retenue et passant dans le *FT*. Un problème de conformation de la protéine peut également empêcher la queue poly histidine de se fixer efficacement sur la matrice et expliquer pourquoi la protéine se retrouve dans le *FT*. Aucune autre bande n'est présente sur le gel, ce qui indique que la protéine est pure. La concentration a été évaluée à 0,42 mg/mL au spectrophotomètre (280 nm).

L'analyse des gels met en évidence les fractions les plus pures (entre 50 et 500 mM d'imidazole) de chaque protéine afin de retirer l'imidazole par tamis moléculaire sur colonne *Sephadex*.

Par ailleurs, la comparaison des gels entre eux révèle des bandes d'intensité très variable pour un même volume déposé (15 µL). Parmi les 4 protéines produites, 3 ont fait l'objet d'une concentration sur système *Amicon* (*cut-off* à 10 kDa) par étape de centrifugation de 5 min à 3500 g (4 °C). Ces 3 protéines sont le domaine AMIN, SPOR et SH3b. Elles se sont avérées instables durant cette phase de concentration, formant des agrégats après la troisième étape. Le processus de concentration a dès lors été arrêté.

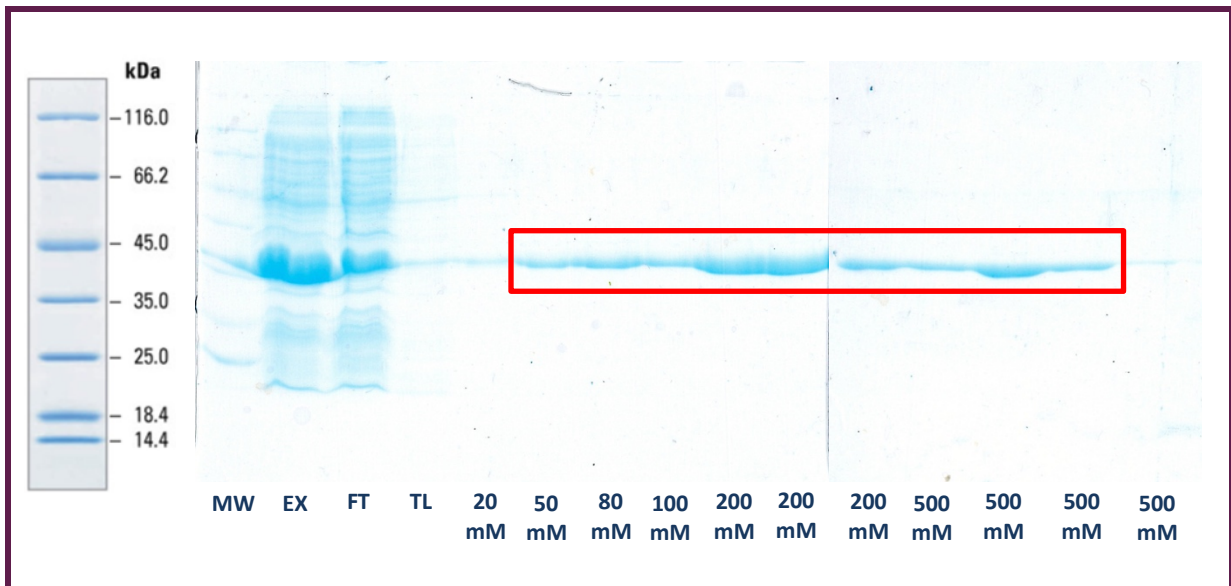


Figure 16 : Gel SDS-PAGE 15 % de la purification du lysozyme λ sur colonne d'affinité au nickel (*HisTrap*).

Volume approximatif de la colonne : 2 mL. MW = marqueur de poids moléculaire. EX = extrait soluble. FT = *flow through*. TL = décrochage avec solution tampon sans imidazole. Les puits suivants représentent la concentration croissante en imidazole (20, 50, 80, 100, 200 et 500 mM à différents volumes). Les *flow through* des concentrations de 200 et 500 mM d'imidazole ont été fractionnées par aliquotes de 2 mL. Seul 1 aliquote sur 2 est déposé sur gel.

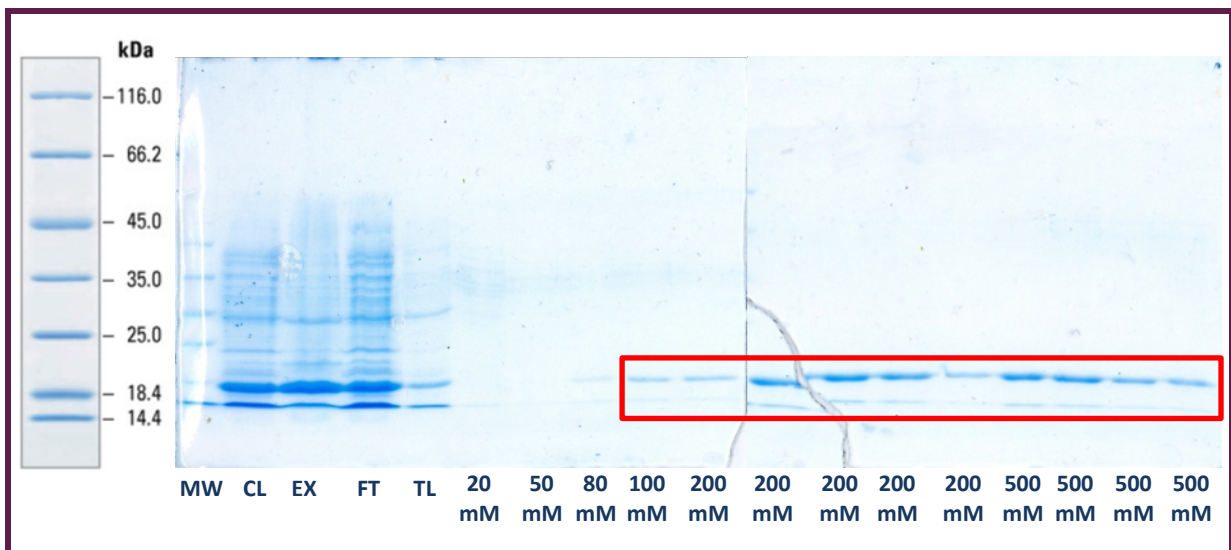


Figure 17 : Gel SDS-PAGE 15 % de la purification du domaine AMIN sur colonne d'affinité au nickel (*HisTrap*).

Volume approximatif de la colonne : 3 mL. MW = marqueur de poids moléculaire. CL = culot lysé. EX = extrait soluble. FT = *flow through*. TL = décrochage avec solution tampon sans imidazole. Les puits suivants représentent la concentration croissante en imidazole (20, 50, 80, 100, 200 et 500 mM à différents volumes). Les *flow through* des concentrations de 200 et 500 mM d'imidazole ont été fractionnées par aliquotes de 2 mL. Seul 1 aliquote sur 2 est déposé sur gel.

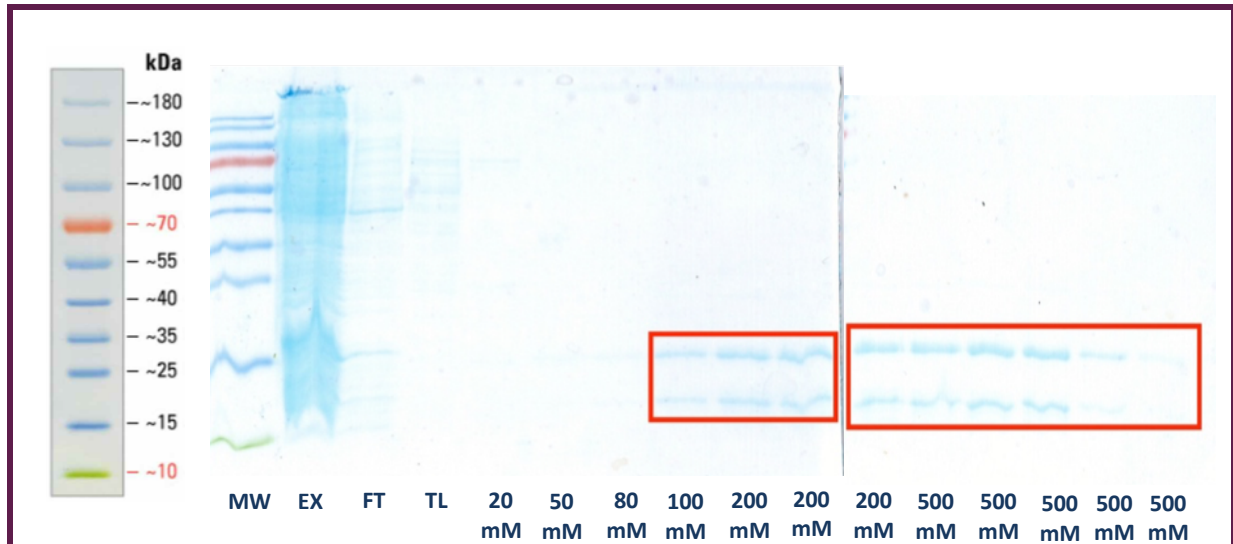


Figure 18 : Gel SDS-PAGE 15 % de la purification du domaine SPOR sur colonne d'affinité au nickel (*HisTrap*).

Volume approximatif de la colonne : 2 mL. MW = marqueur de poids moléculaire. FT = *flow through*. TL = décrochage avec solution tampon sans imidazole. Les puits suivants représentent la concentration croissante en imidazole (20, 50, 80, 100, 200 et 500 mM à différents volumes). Les *flow through* des concentrations de 200 et 500 mM d'imidazole ont été fractionnées par aliquotes de 2 mL. Seul 1 aliquote sur 2 est déposé sur gel.

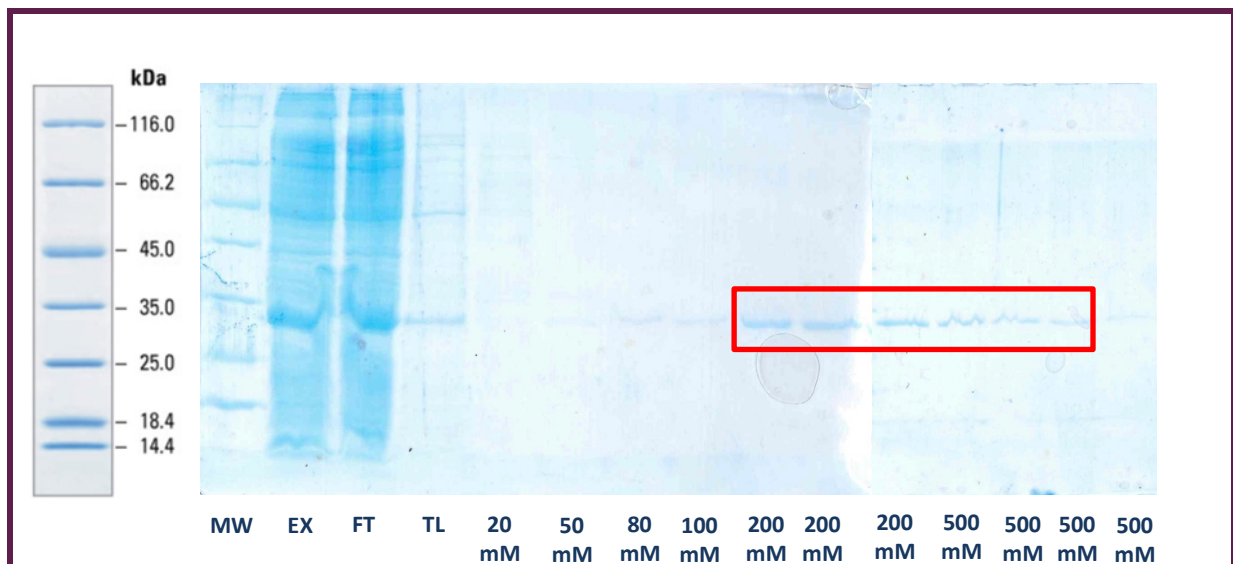


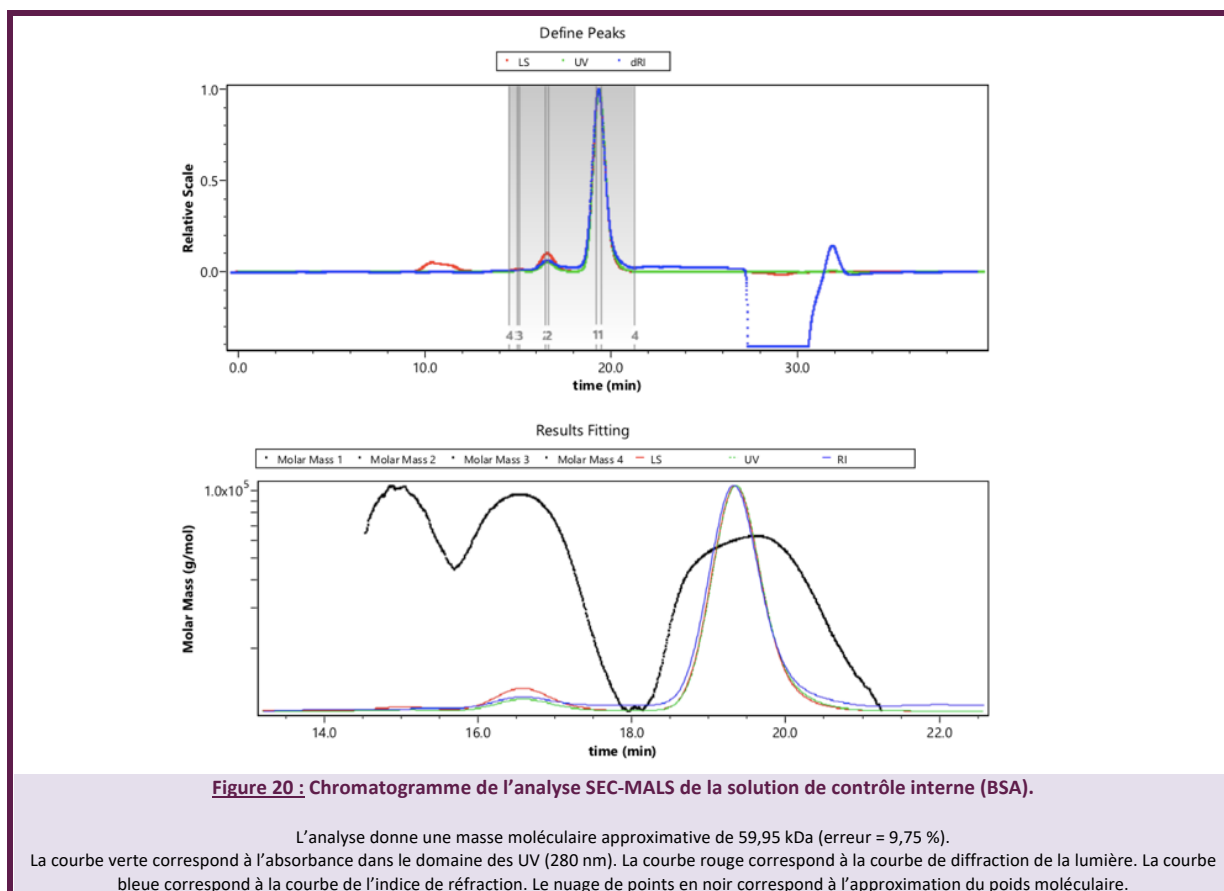
Figure 19 : Gel SDS-PAGE 15 % de la purification du domaine SH3b sur colonne d'affinité au nickel (*HisTrap*).

Volume approximatif de la colonne : 1 mL. MW = marqueur de poids moléculaire. EX = extrait soluble. FT = *flow through*. TL = décrochage avec solution tampon sans imidazole. Les puits suivants représentent la concentration croissante en imidazole (20, 50, 80, 100, 200 et 500 mM à différents volumes). Les *flow through* des concentrations de 200 et 500 mM d'imidazole ont été fractionnées par aliquotes de 2 mL. Seul 1 aliquote sur 2 est déposé sur gel.

4.2. Caractérisation par SEC – MALS

La caractérisation SEC-MALS permet de déterminer une masse moléculaire approximative en mesurant 3 signaux : la diffusion de lumière (en diffraction laser statique), l'absorbance dans les UV et l'indice de réfraction. Théoriquement, le lysozyme (fusionné au peptide SZ1) est censé interagir avec un CBD (fusionné au peptide SZ2) afin de former un complexe. Cette analyse permet de s'assurer de cette complexation. En comparant les chromatogrammes des 2 protéines seules avec celui du complexe, un déplacement du pic d'éluion vers la gauche doit théoriquement être mis en évidence. En pratique, l'appareil est équilibré avec le tampon de la protéine. A la fin de cette étape, 150 μL d'échantillon à analyser sont injectés. L'appareil prélève automatiquement 100 μL d'échantillon, le restant étant récupéré en fin d'analyse pour être déposé sur gel SDS-PAGE 15 % afin de mieux interpréter les résultats.

Afin de pouvoir s'assurer de la validité des résultats obtenus par cette méthode, il est nécessaire d'analyser une protéine contrôle : l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette dernière existe à la fois sous forme de monomère, dimère et trimère en solution. Le chromatogramme obtenu indique que la protéine est éluée après 19 min. La masse atomique approximative donnée par l'appareil est de 59,99 kDa. Ce résultat est cohérent avec la masse moléculaire réelle de la BSA (66,43 kDa). L'état d'oligomérisation est également mis en évidence par la courbe noire : en partant de la droite, le premier pic correspond au monomère, le second au dimère et le dernier au trimère (**figure 20**).



L
Y
S
O

Le chromatogramme obtenu pour le lysozyme λ (**figure 21A**) indique un signal en diffraction laser statique (courbe rouge) aux alentours de 10 min. Ce signal n'est pas corrélé avec l'absorbance UV (courbe verte) ni l'indice de réfraction (courbe bleue). Il s'agit donc probablement de grosses particules agrégées qui se sont formées lors de l'étape de la concentration. Les courbes indiquent néanmoins l'éluion de la protéine à 21 min. Le poids moléculaire est de 43,8 kDa. La taille réelle du lysozyme étant de 25,77 kDa (**Annexe 06**), ce résultat présente une erreur de 41,17 %. Ce taux d'erreur peut être expliqué par l'état d'oligomérisation variable de la protéine en solution. Le lysozyme commercial est élué plus loin (27 min) avec une taille de 14 kDa, soit une erreur de 15,16 % (**figure 21B**). Ce résultat est cohérent dans la mesure où le lysozyme commercial possède un poids moléculaire plus faible que le lysozyme λ produit avec un *histag* et un *SZ1*.

A
M
I
N

Le chromatogramme obtenu pour le domaine AMIN seul indique un signal intense aux alentours de 12 min. Cette zone correspond aux molécules dont le poids moléculaire est si grand qu'elles sont exclues de la colonne. Or le domaine AMIN (dont la taille est proche de celle du lysozyme) est censé être élué aux alentours de 20 min. Cette observation indique donc que le domaine AMIN forme de gros agrégats protéiques (**figure 22A**). Le chromatogramme obtenu pour le complexe AMIN – Lysozyme est identique, excepté que ce dernier comporte un pic d'éluion aux alentours de 21 min. Ce pic correspond au lysozyme (**figure 22B**).

S
P
O
R
&
S
H
3
b

Dans un premier temps, ces 2 domaines ont été analysés dans le tampon de la protéine (TP1). Les signaux obtenus sont inexploitable (**Annexes 08 et 09**), indiquant que la protéine est soit absente de l'échantillon, soit trop diluée. Or le gel SDS-PAGE 15 % réalisé en parallèle du SEC-MALS indique que les 2 protéines sont bien présentes (**figure 25**). A ce stade, la piste privilégiée est celle de l'agrégation des protéines (qui serait survenue durant l'étape de concentration). Par ailleurs, l'appareil SEC-MALS est doté d'un filtre 0,1 μm en entrée. Si l'agrégation des protéines est si importante qu'elles forment des agrégats de taille supérieure à 0,1 μm , il est envisageable que les protéines soient retenues à l'entrée de l'appareil. Pour s'en assurer, l'analyse est réitérée dans un tampon contenant 0,7 % v/v de CHAPS (TP2). Ce détergent non dénaturant permet de séparer les agrégats protéiques. Les signaux obtenus sont légèrement plus exploitables, confirmant que les protéines sont agrégées (**figures 23A et 24A**). Les chromatogrammes obtenus pour les complexes SPOR – Lysozyme et SH3b – Lysozyme montrent un pic correspondant au pic du lysozyme aux alentours de 21 min (**figure 23B et 24B**).

La comparaison des différents chromatogrammes entre eux ne révèle aucun déplacement de pic vers la gauche et par conséquent aucune formation de complexe. Il semblerait que les différentes protéines soient agrégées à tel point qu'aucune interaction n'est possible entre *SZ1* et *SZ2*.

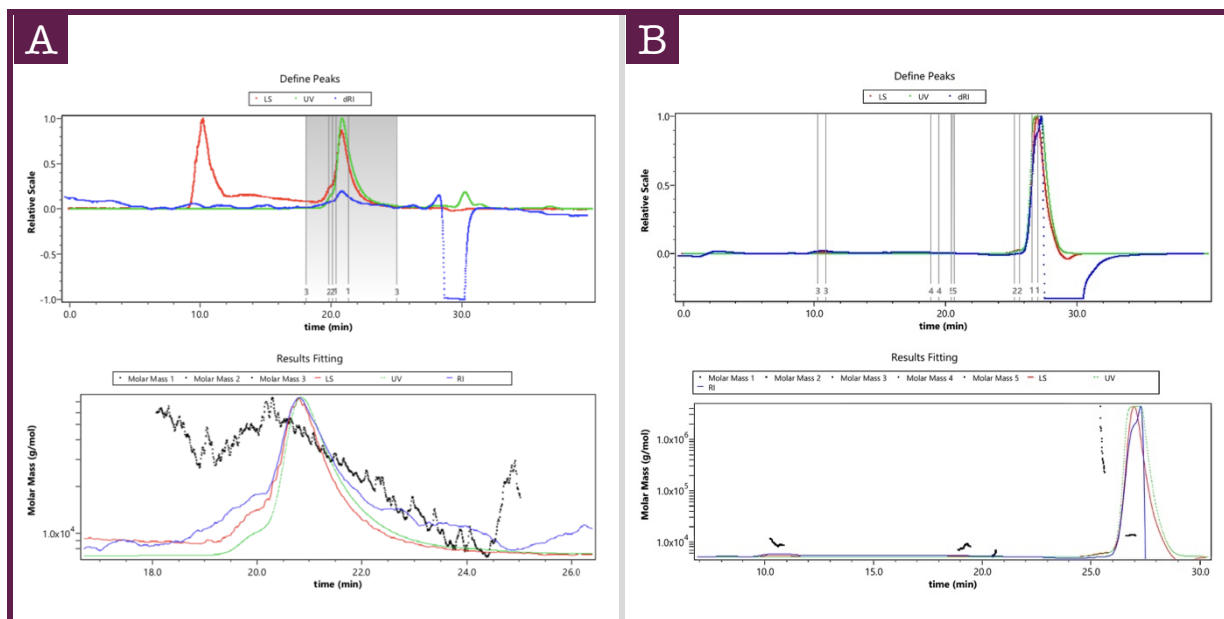


Figure 21 : Chromatogramme de l'analyse SEC-MALS du lysozyme λ et du lysozyme HEWL⁹.

A. Analyse du lysozyme λ . L'analyse donne une masse moléculaire approximative de 43,8 kDa.

B. Analyse de la solution de lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL). L'analyse donne une masse moléculaire approximative de 14 kDa (erreur = 15,16 %). La courbe verte correspond à l'absorbance dans le domaine des UV (280 nm). La courbe rouge correspond à la courbe de diffraction de la lumière. La courbe bleue correspond à la courbe de l'indice de réfraction. Le nuage de points en noir correspond à l'approximation du poids moléculaire.

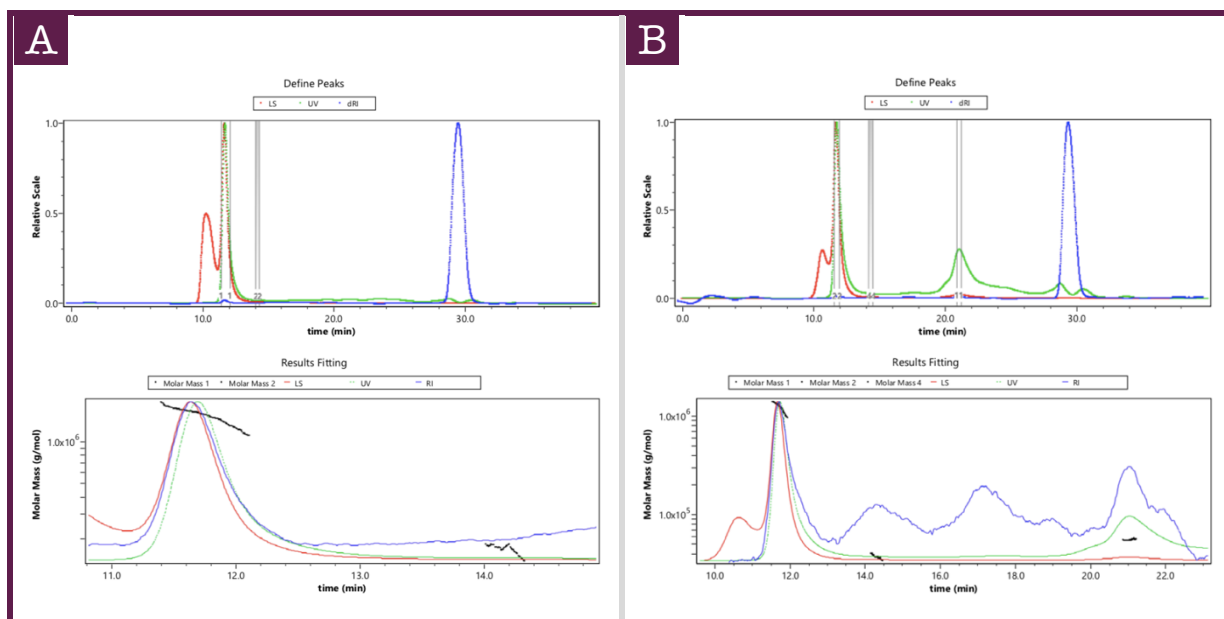


Figure 22 : Chromatogramme de l'analyse SEC-MALS du domaine AMIN seul et complexé au lysozyme.

A. Analyse du domaine AMIN seul. L'analyse donne une masse moléculaire approximative de 1573 kDa. Ce résultat indique un problème de conformation de la protéine ou une importante agrégation.

B. Analyse du domaine AMIN complexé au lysozyme.

La courbe verte correspond à l'absorbance dans le domaine des UV (280 nm). La courbe rouge correspond à la courbe de diffraction de la lumière. La courbe bleue correspond à la courbe de l'indice de réfraction. Le nuage de points en noir correspond à l'approximation du poids moléculaire.

⁹ HEWL : *Hen egg white lysozyme* (lysozyme du blanc d'œuf de poule).

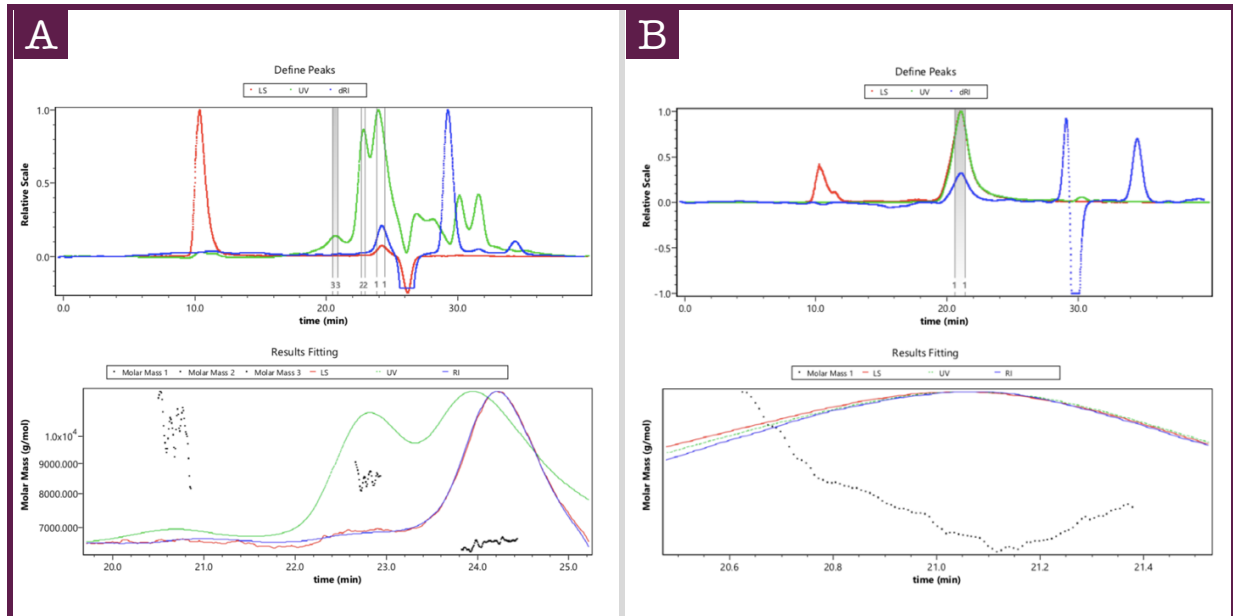


Figure 23 : Chromatogramme de l'analyse SEC-MALS du domaine SPOR seul et complexé au lysozyme.

A. Analyse du domaine SPOR seul. L'analyse donne une masse moléculaire approximative de 6,6 kDa.

B. Analyse du domaine SPOR complexé au lysozyme. Le pic 1 correspond au lysozyme seul.

La courbe verte correspond à l'absorbance dans le domaine des UV (280 nm). La courbe rouge correspond à la courbe de diffraction de la lumière. La courbe bleue correspond à la courbe de l'indice de réfraction. Le nuage de points en noir correspond à l'approximation du poids moléculaire.

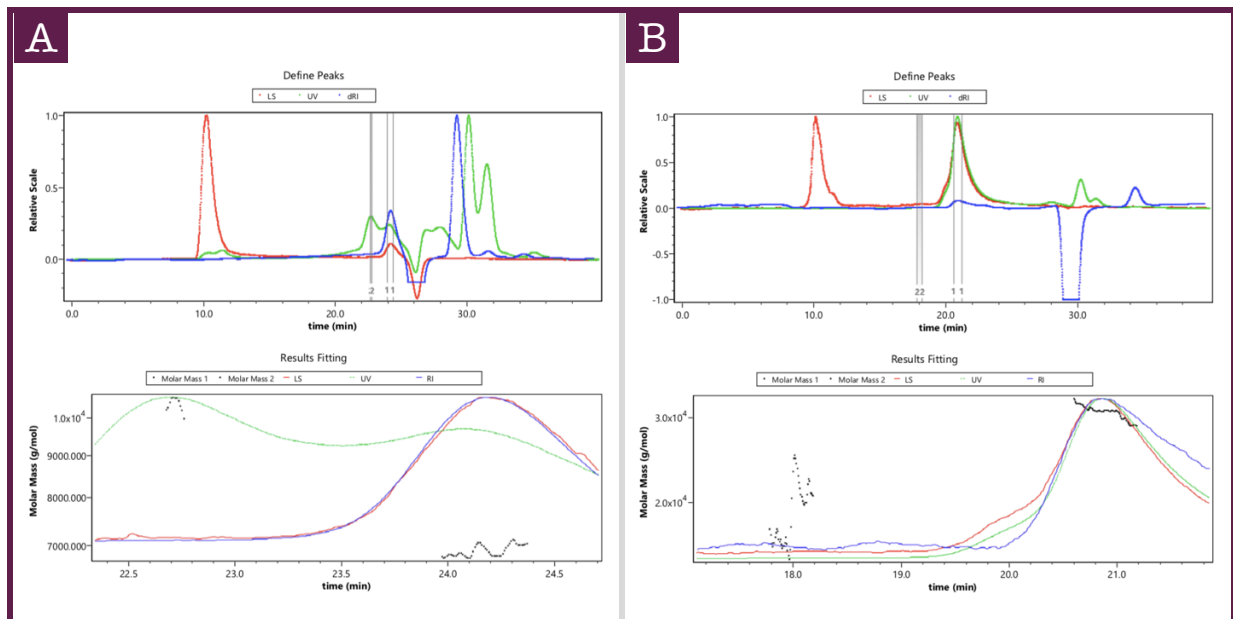
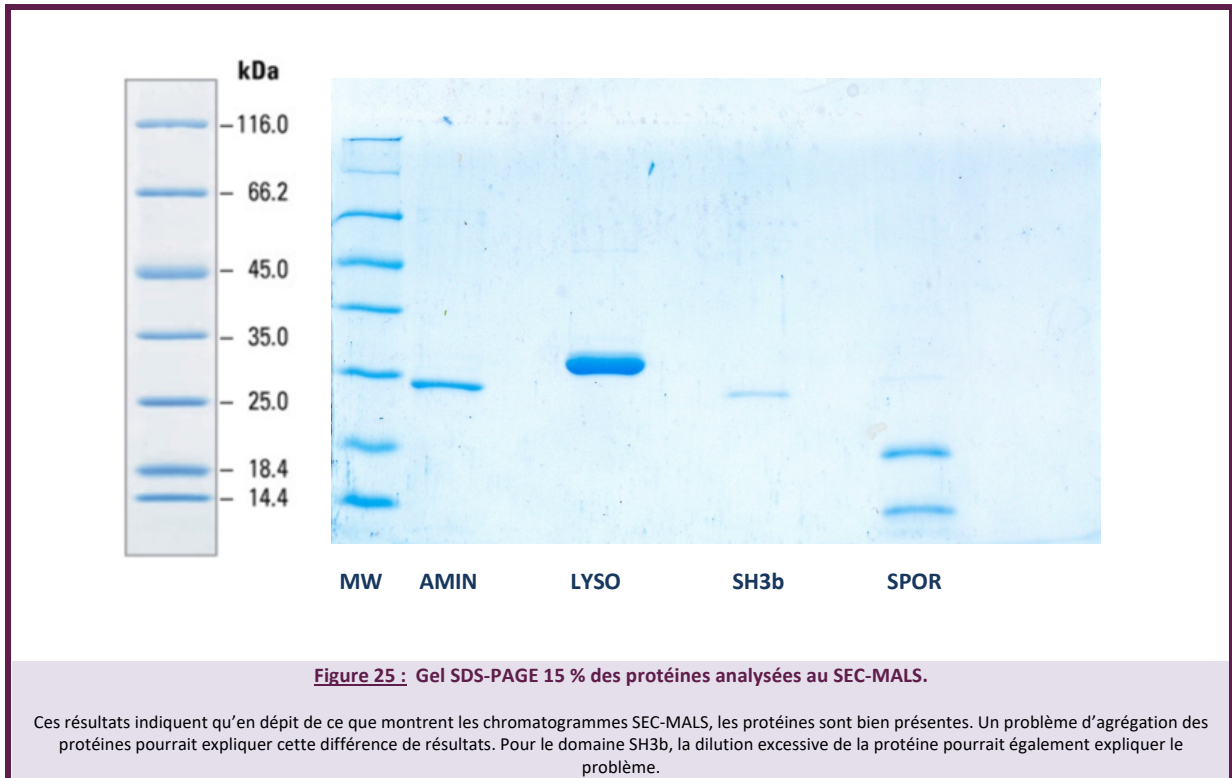


Figure 24 : Chromatogramme de l'analyse SEC-MALS du domaine SH3b seul et complexé au lysozyme.

A. Analyse du domaine SH3b seul. L'analyse donne une masse moléculaire approximative de 10,2 kDa.

B. Analyse du domaine SH3b complexé au lysozyme. Le pic 1 correspond au lysozyme seul.

La courbe verte correspond à l'absorbance dans le domaine des UV (280 nm). La courbe rouge correspond à la courbe de diffraction de la lumière. La courbe bleue correspond à la courbe de l'indice de réfraction. Le nuage de points en noir correspond à l'approximation du poids moléculaire.



4.3. Caractérisation fonctionnelle

Les hydrolases exprimées sont potentiellement actives sur le PG. Pour s'en assurer, 3 tests d'activité sont mis en place :

Turbidity reduction assay (in vivo)

Les hydrolases sont incubées avec une suspension bactérienne (en tampon phosphate) à 37 °C sous agitation. La DO_{600nm} est lue toutes les 2 minutes pendant 1 h. Si l'enzyme est active sur le PG, une lyse cellulaire doit être observée via une réduction de la DO. Pour s'assurer de la validité des résultats obtenus, 2 contrôles sont réalisés : la mutanolysine¹⁰ pour le contrôle positif et le tampon de la protéine pour le contrôle négatif.

Growth inhibition assay (in vivo)

Les hydrolases sont incubées avec une suspension bactérienne (en milieu nutritif) à 37 °C sous agitation. La DO_{600nm} est lue toutes les 30 minutes pendant 3,5 heures. Si l'enzyme est active sur le PG, la DO_{600nm} doit diminuer. Deux contrôles sont réalisés : l'ampicilline pour le contrôle positif et le tampon de la protéine pour le contrôle négatif.

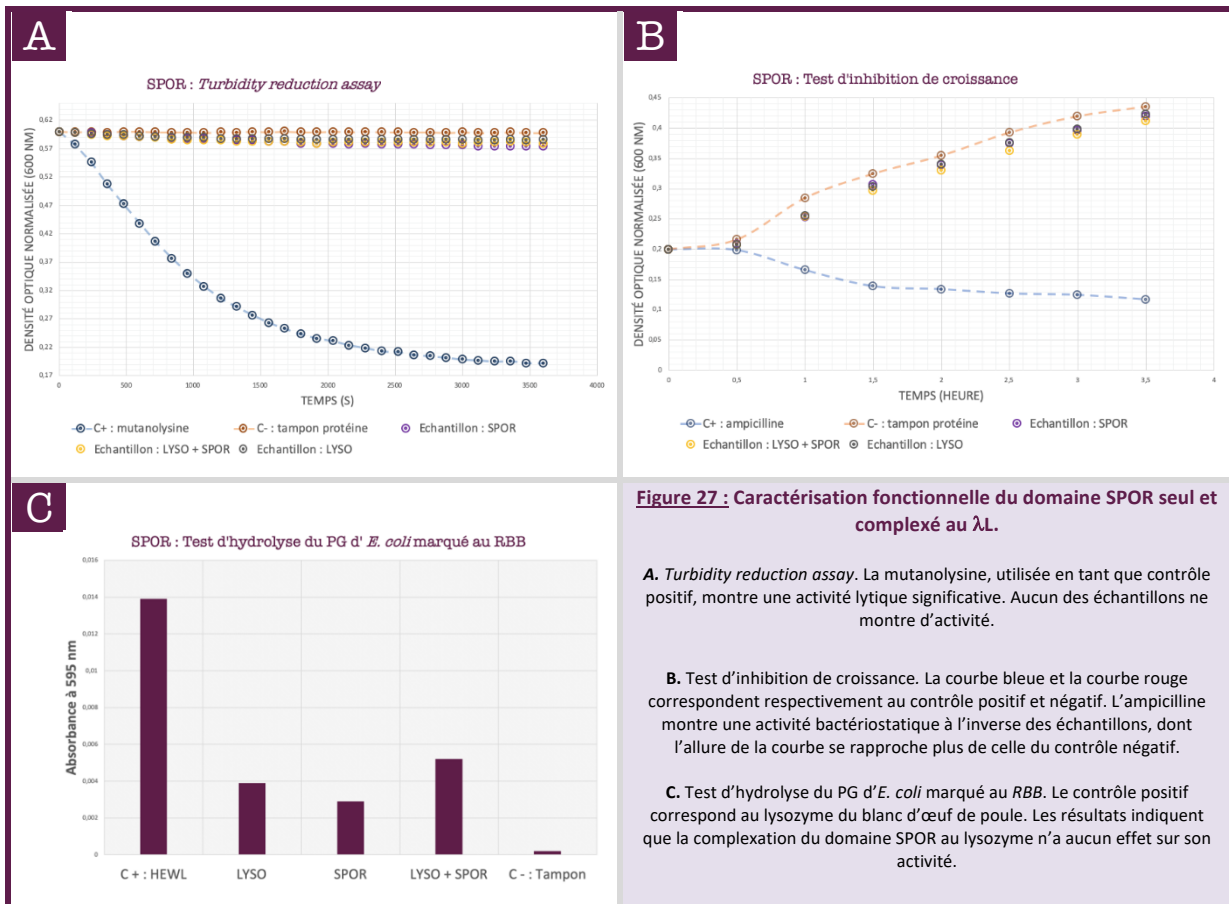
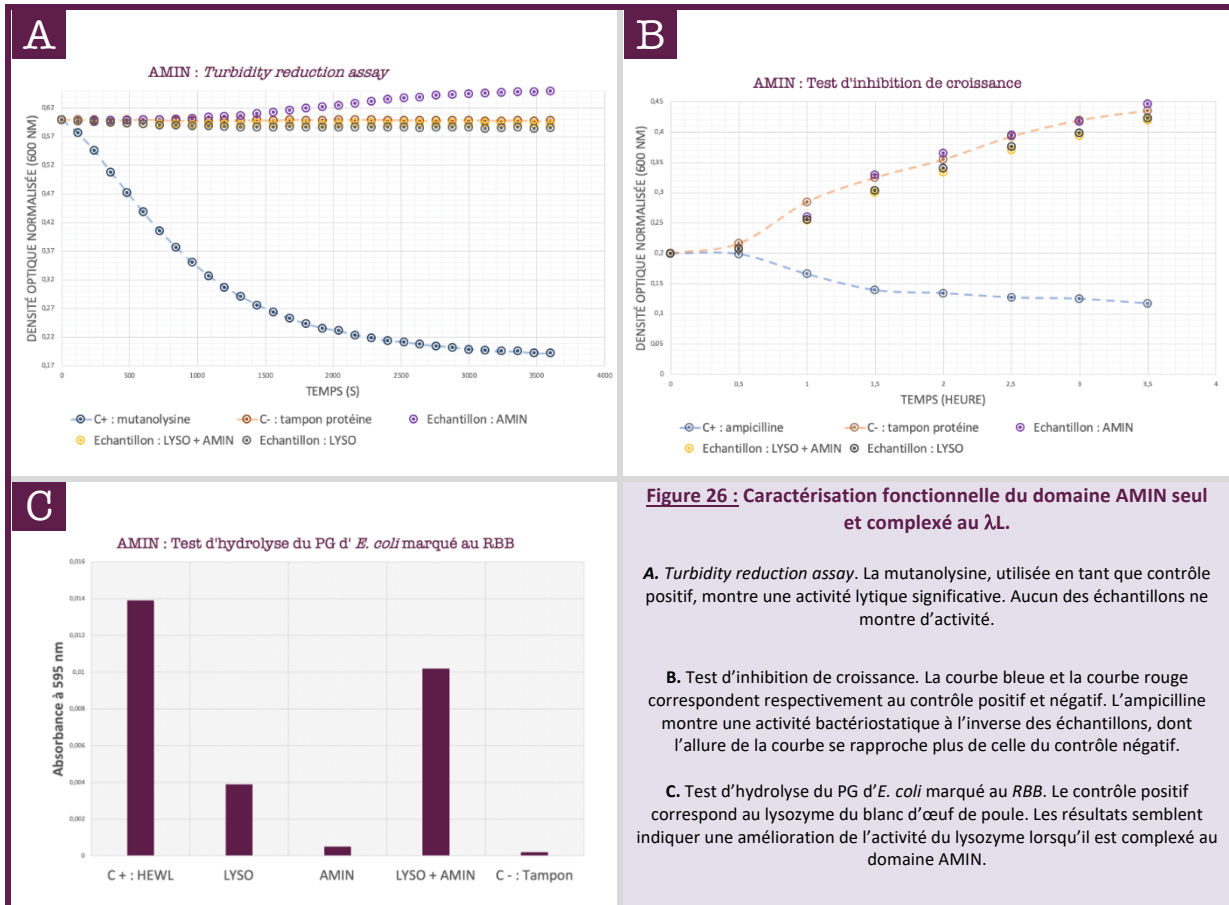
Test d'hydrolyse du PG d'*E. coli* marqué au RBB (in vitro)

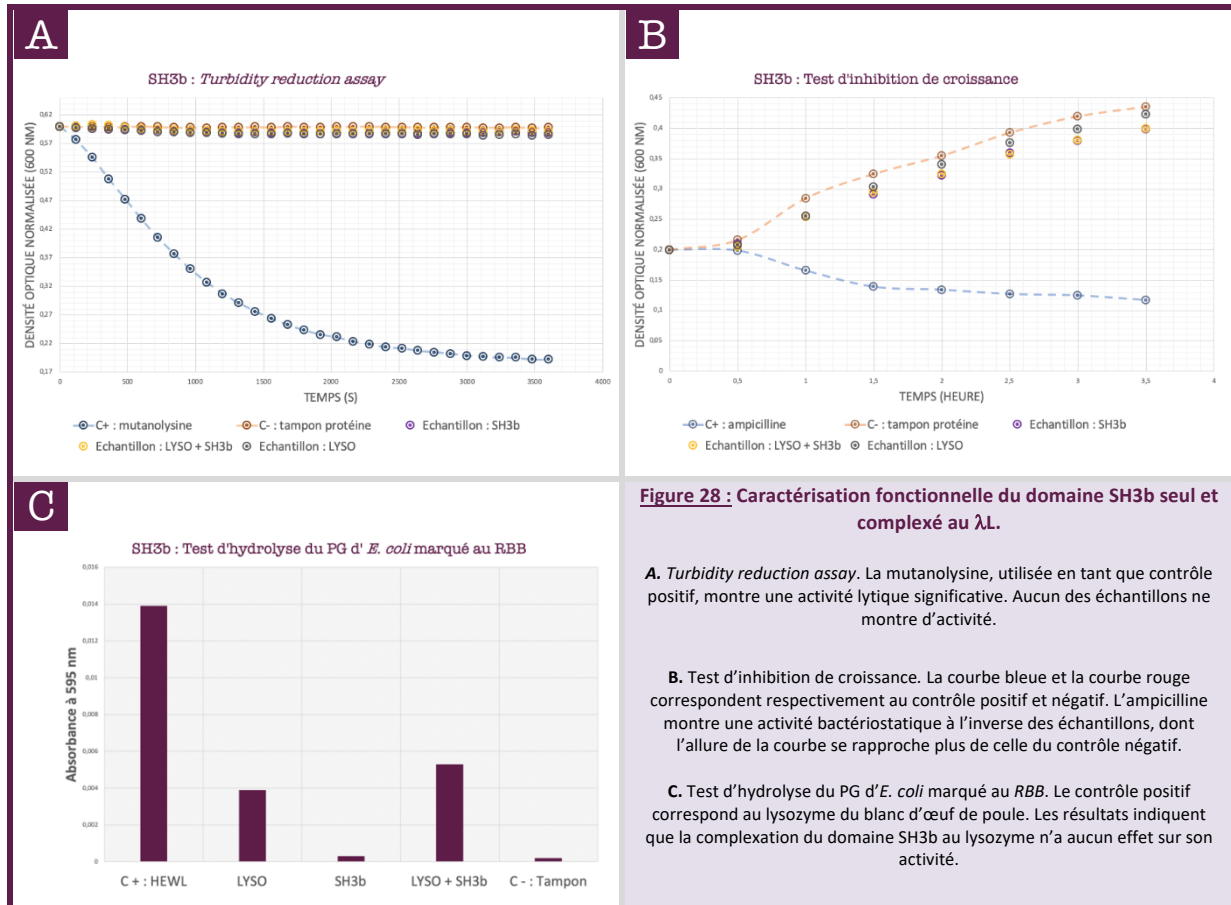
Les hydrolases sont incubées 24 h à 37 °C sous agitation avec du PG marqué. Si l'enzyme est active sur le PG, ce dernier sera clivé en libérant des produits solubles. L'absorbance du surnageant (séparé par centrifugation) est directement proportionnelle à l'activité enzymatique. Deux contrôles sont réalisés : le lysozyme du blanc d'œuf de poule (*HEWL*) pour le contrôle positif et le tampon de la protéine pour le contrôle négatif.

Chacun des domaines exprimés est testé d'une part individuellement et d'autre part en étant complexé au lysozyme, et ce pour les 3 tests. Les résultats sont exposés ci-dessous et illustrés **figures 26, 27 et 28**.

TRA	Aucune des protéines exprimées ne possède une activité lytique. Le résultat reste identique pour le complexe <i>CBD</i> — <i>LYSO</i> .
GIA	Aucune des protéines exprimées ne possède une activité lytique. Le résultat reste identique pour le complexe <i>CBD</i> — <i>LYSO</i> .
PG-RBB	L'activité lytique du lysozyme semble s'améliorer de manière significative lorsque ce dernier est complexé au domaine AMIN (figure 26C). Ce dernier ne possède pas d'activité propre à l'instar du domaine SH3b (du pont pentaglycine, absent du PG d' <i>E. coli</i>) (figure 28C). Le domaine SPOR possède une faible activité lytique, mais n'améliore pas l'activité du lysozyme lorsqu'il y est complexé (figure 27C).

¹⁰ La mutanolysine est un assemblage des 3 enzymes bactériolytiques sécrétées par *Streptomyces globisporus*, très active sur la paroi des bactéries G+.







Conclusions et perspectives

5.1. Expression et purification

Toutes les protéines exprimées sont solubles. Cependant, différentes problématiques ont été rencontrées durant cette première étape. Les protéines produites sont soit trop diluées, soit trop instables en solution. Pour rappel, l'induction a été réalisée *overnight* à 18 °C avec 1 mM d'IPTG afin d'améliorer la solubilité des protéines. Pour la purification, un ajustement du volume¹¹ de la matrice *HisTrap* est nécessaire pour arriver à retenir la majeure partie de la protéine d'intérêt du *FT* sans en altérer la pureté.

Concernant la stabilité et l'agrégation de la protéine dans le tampon, une mise au point est nécessaire pour déterminer les meilleures conditions de pH et de concentration en NaCl. Une étude récente est arrivée à la conclusion que le domaine SH3b est plus stable dans un tampon à 50 mM de NaCl (Zwaenepoel, 2018).

La nature des peptides utilisés est également intéressante à faire varier. Les protéines exprimées possèdent toutes soit SZ1 ou le SZ2. Au total, il existe 22 peptides SZ, présentant des caractéristiques différentes. Il serait intéressant d'utiliser d'autres couples (comme SZ5 et SZ6), ou encore de faire varier la taille du *linker* situé entre le peptide et la protéine. Augmenter la taille de ce dernier permet en théorie d'avoir plus de flexibilité et *in fine* une potentielle amélioration du repliement des protéines et du *binding*.

¹¹ Il ne suffit pas d'augmenter le volume de la matrice aveuglément. Procéder de la sorte permettrait certes de retenir plus de protéine, mais également plus d'impuretés. Par ailleurs, plus le volume de la matrice augmente, plus le volume de tampon d'élution nécessaire à l'élution augmente, réduisant considérablement la concentration finale de la protéine. Il y'a là un véritable ajustement à faire afin d'arriver au meilleur compromis entre la pureté et la concentration.

5.2. Caractérisation

Les problèmes rencontrés durant cette étape découleraient de ceux rencontrés pour l'étape précédente. Les protéines étant agrégées, il est tout à fait normal que le lysozyme soit en grande majorité inactif. Par ailleurs, ce problème d'agrégation des protéines empêche la formation du complexe CBD — Lysozyme (visible au *SEC-MALS*). Les résultats préliminaires obtenus *in vitro* sont tout de même encourageants et indiquent que la combinaison du domaine AMIN avec le lysozyme du phage λ possède une activité lytique plus importante que celle des deux domaines pris séparément.

Ces expériences devront néanmoins être répétées pour confirmer les observations effectuées. Il est également intéressant de réitérer l'expérience en utilisant d'autres PG marqués (notamment de souches Gram +) afin d'observer l'effet du domaine SH3b et du lysozyme.

Les tests *in vivo* (*TRA* et *GIA*) indiquent qu'une mise au point des conditions expérimentales devrait être effectuée. Le lysozyme possède une meilleure activité à pH plus acide, il serait dès lors intéressant de diminuer ce dernier pour en déterminer l'effet. La concentration des protéines est également un facteur important à faire varier.



Bibliographie

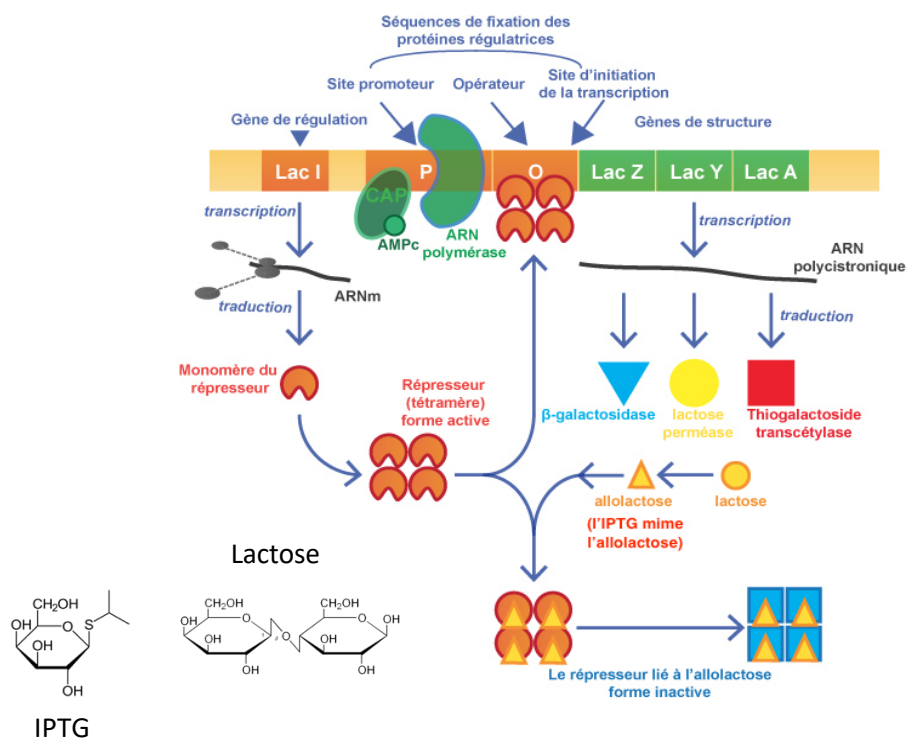
C	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CAMPBELL N., REECE J., URRY L., CAIN M., WASSERMAN S., MINORSKY P., JACKSON R., « <i>Biologie</i> », Pearson, 9^{ème} édition, 2012. ▪ CORNU M., « <i>Modélisation d'incertitudes et de variabilité en microbiologie quantitative alimentaire</i> », 2006.
D	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DANIEL A., EULER C., COLLIN M., CHAHALES P., GORELICK K., FISCHETTI A., « <i>Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant staphylococcus aureus</i> », 2010. ▪ DUNCAN T., YAHASHIRI A., ARENDS SJR., POPHAM D., WEISS D., « <i>Identification of SPOR domain amino acids important for septal localization, peptidoglycan binding and a disulfide bond in the cell division protein FtsN</i> », 2013.
F	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FARRAE-STOAKES S., (page consultee le 26 mai 2019). <i>Gram Positive Bacteria</i> [En ligne]. Adresse URL: www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Positive-Bacteria.aspx ▪ FLEMING A., « <i>On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special references to their use in the isolation of B. influenzae</i> », 1929. ▪ FOLTA-STOGNIUW E., « <i>Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance and refractive index detectors</i> », 2006. ▪ FOSTER SJ., POPHAM DL., « <i>Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers and capsules</i> » dans « <i>Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells</i> », p. 21 – 41, American Society for Microbiology, 2002.
G	<ul style="list-style-type: none"> ▪ GANDON S., « <i>Why be temperate: lessons from bacteriophage λ</i> », 2016.
H	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HANCOCK L., MURRAY B., Sillanpaa J., « <i>Enterococcal cell wall components and structures</i> », 2014. ▪ HEIDRICH C., TEMPLIN MF., URSINUS A., « <i>Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of Escherichia coli</i> » in « <i>Mol Microbiol</i>, vol. 41 », 2001. ▪ HJELM L., NILVEBRANT J., NYGREN P., NILSSON A., SEIJSING J., « <i>Lysis of staphylococcal cells by modular lysin domains linked via a non-covalent barnase-barstar interaction bridge</i> », 2019.
I	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IVERSEN OJ., GROV A., « <i>Studies on Lysostaphin: Separation and Characterization of Three Enzymes</i> », 1973.
J	<ul style="list-style-type: none"> ▪ JACOBS C., FRERE JM., NORMARK S., « <i>Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria</i> », 1997.
K	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KORAIMANN G., « <i>Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria</i> », 2003.
L	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LAPENTA F., AUPIC J., STRMSEK Z., JERALA R., « <i>Coiled coil protein origami: from modular design principles towards biotechnological applications</i> », 2018.
M	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MARESSO A., SCHNEEWIND O., « <i>Sortase as a target of anti-infective therapy</i> » in « <i>Pharmacological reviews</i> », Vol. 60, 2008. ▪ MAYER BJ., BALTIMORE D., « <i>Signalling through SH2 and SH3 domains</i> » in « <i>Trands cell biol</i> », 1993. ▪ MERCIER C., DURRIEU C., BRIANDET R., DOMAKOVA E., TREMBLAY J., BUIST G., KULAKAUSKAS S., « <i>Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation</i> », 2002. ▪ MITKOWSKI P., JAGIELSKA E., NOWAK E., BUJNICKI J., STEFANIAK F., NIEDZIALEK D., BOCHTLER M., SABALA I., « <i>Structural bases of peptidoglycan recognition by lysostaphin SH3b domain</i> », 2019. ▪ MOYES RB., REYNOLDS J., Breakwell DP., « <i>Differential staining of bacteria: Gram stain</i> » in « <i>Current protocols in microbiology</i> », 2009. ▪ MUKAMOLOVA GV., KAPRELYANTS AS., YOUNG DI., Young M., KELL DB., « <i>A bacterial cytokine</i> », 1998. ▪ MUKAMOLOVA GV., MURZIN AG., SALINA EG., DEMINA GR., KELL DB., KAPRELYANTS AS., YOUNG M., « <i>Muralytic activity of Micrococcus luteus Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation</i> », 2006.
O	<ul style="list-style-type: none"> ▪ O'NEILL J., « <i>Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations</i> » in « <i>The review on antimicrobial resistance</i> », 2014. ▪ OJHA S., IMTONG C., MEETUM K., SAKDEE S., KATZENMEIER G., ANGSUTHANASOMBAT C., « <i>Purification and characterization of the antibacterial peptidase lysostaphin from Staphylococcus simulans: Adverse influence of Zn²⁺ on bacteriolytic activity</i> », 2018.

P	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PARK PW., MECHAM R., « <i>Lyostaphin</i> » dans « <i>Handbook of Proteolytic Enzymes</i> », Elsevier, 3ème édition, 2013. ▪ PASTAGIA M., EULER C., CHAHALES P., FUENTES-DUCULAN J., KRUEGER J., FISCHETTI V., « <i>A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive Staphylococcus aureus stains</i> », 2010. ▪ PETERS N., DINH T., BERNHARDT T., « <i>A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators</i> » in « <i>Journal of bacteriology</i> », 2011. ▪ PRIYARARSHINI R., DE PEDRO M., YOUNG K., « <i>Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in Escherichia coli</i> » in « <i>Journal of bacteriology</i> », 2007.
R	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ROCABOY M., « <i>Structural and biochemical study of the proteins AmiC, NlpD and FtsW involved in the bacterial cell division</i> », 2013. ▪ ROCABOY M., HERMAN R., SAUVAGE E., REMAUT H., MOONENS K., TERRAK M., CHARLIER P., KERFF F., « <i>The crystal structure of the cell division amidase AmiC reveals the fold of the AMIN domain, a new peptidoglycan binding domain</i> », 2013.
S	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SCHMELCHER M., DONOVAN D., LOESSNER M., « <i>Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials</i> », 2012. ▪ SMITH LJ., BOWEN A., DI PAOLO A., MATAGNE A., REDFIELD C., « <i>The dynamics of lysozyme from bacteriophage lambda in solution probed by NMR and MD simulations</i> », 2013.
T	<ul style="list-style-type: none"> ▪ THOMPSON K., BASHOR C., LIM W., KEATING A., « <i>SYNZIP protein interaction toolbox: in vitro and in vivo specifications of heterospecific coiled-coil interaction domains</i> », 2012.
U	<ul style="list-style-type: none"> ▪ University of Zurich, (page consultee le 26 mai 2019). <i>Insect antibiotic provides new way to eliminate bacteria</i> [En ligne]. Adresse URL : www.rdmag.com/news/2018/11/insect-antibiotic-provides-new-way-eliminate-bacteria
V	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VERMASSEN A., LEROY S., TALON R., PROVOT C., POPOWSKA M., DESVAUX M., « <i>Cell wall hydrolases in bacteria: insight on the diversity of cell wall amidases, glycosidases and peptidases toward peptidoglycan</i> », 2019. ▪ VOLLMER W., « <i>Peptidoglycan</i> » in « <i>Molecular Medical Microbiology</i> », Elsevier, 2015. ▪ VOLLMER W., BERTSCHE U., « <i>Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli</i> », 2008. ▪ VOLLMER W., JORIS B., CHARLIER P., FOSTER S., « <i>Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases</i> », 2008.
W	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Willey JM., « <i>Prescott, Harley, & Klein's Microbiology</i> », 7^{ème} édition, 2008.
Y	<ul style="list-style-type: none"> ▪ YAHASHIRI A., JORGENSON M., WEISS D., « <i>Bacterial SPOR domains are recruited to septal peptidoglycan by binding to glycan strands that lack stem peptides</i> », 2015.
Z	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZWAENEPOEL M., « <i>Construction et caractérisation de lysines avec de nouvelles propriétés</i> », Université de Liège, 2018.



Annexes

La principale source de carbone des bactéries réside dans le catabolisme des sucres. La première enzyme qui agit est la lactose perméase, permettant l'entrée du lactose dans la cellule. Ensuite, le lactose est métabolisé en galactose et en glucose grâce à la β -galactosidase. Ces enzymes ne sont synthétisées par la bactérie que lorsque cette dernière en a besoin, autrement dit lorsqu'elle est en présence de lactose. Pour ce faire, la bactérie fait appel à un formidable outil de régulation : l'opéron lactose. L'opéron lactose est défini comme étant une unité d'ADN fonctionnelle regroupant des gènes (appelés gènes de structure) qui opèrent sous le signal d'un même promoteur. Il s'agit des gènes LacZ, LacY et LacA qui codent respectivement pour la β -galactosidase, la lactose perméase et la thiogalactoside transacétylase. L'opéron lactose est également constitué d'un promoteur et d'un opérateur.



En amont l'opéron lactose, il existe un gène de régulation (**Lac I**) qui possède une activité constitutive (exprimé peu importe le stade de croissance de la bactérie). Lac I exprime une protéine régulatrice (qui est en réalité un répresseur). Ce répresseur, dans sa forme tétramérique et à condition qu'il n'y ait pas d'allolactose dans le milieu, se fixe sur l'opérateur de l'opéron lactose et bloque l'ARN polymérase. Cela empêche la transcription des gènes LacZ, LacY et LacA, inhibant ainsi la production des enzymes nécessaires à la dégradation du lactose. En revanche, lorsque l'allolactose est présent, il complexe la protéine régulatrice et induit un changement de conformation. La protéine régulatrice perd son affinité pour l'opérateur et devient inactive. Il y a donc une levée de l'inhibition de l'opéron lactose, permettant à l'ARN polymérase de transcrire les gènes LacZ, LacY et LacA. L'IPTG, utilisé en tant qu'inducteur de la synthèse protéique, est en réalité un « mime » de l'allolactose. Cependant, l'IPTG possède un atome de soufre tandis que l'allolactose en est dépourvu. Ainsi, l'IPTG complexe la protéine régulatrice produite par Lac I, mais n'est pas le substrat de la β -galactosidase. Il n'est donc pas métabolisé et son action inductrice demeure constante au fil du temps, même à de très faibles concentrations.

6H-SZ2-AMIN

MHHHHHSSGRENLYFQGMARN
 AYLRKKIARLKKDNLQLERDEQN
 LEKI IANLRDEIARLENEVASHEQG
 AGSQVVAVRVWPASSYTRVTVES
 NRQLKYKQFALSNERVVVDIEDVNLN
 SVLKGMAAQIRADDPFIKSARVGQFDPQTVRMVFE
 LKQNVKPQLFALAPVAGFKERLVM
 DLYPA

6H-SZ2-SPOR

MHHHHHSSGRENLYFQGMARNAYLRKKIARLKKD
 NLQLERDEQNLEKI IANLRDEIARLENEVASHEQGA
 GSDERRWMVQCGSFRGAEQAETVRAQLAFEGFDS
 KITTNGWNRVVGIPVKGKENADSTLNRLKMAGHTN
 CIRLAAGG

6H-SZ2-SH3b

MHHHHHSSGRENLYFQGMARNAYLRKKIA
 RLKKDNLQLERDEQNLEKI IANLRDEIARLEN
 EVASHEQGAGSAGYGKAGGTVTPTPNTGWKT
 NKYGTLYKSESASFTPTNDIITRTTGPFRSMPQSGVL
 KAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGYTGNSTGQRIYLPVR
 TWNKSTNTLGVLWGTIK

6H-LYSO-SZ1

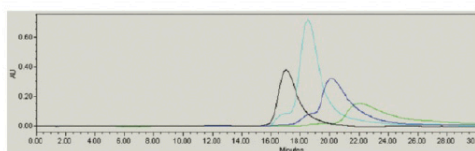
MHHHHHSSGRENLYFQGMVEINNQRKAFL
 DMLAWSEGTDNGRQKTRNHGYDVIVGGELF
 TDYSDHPRKLVTLNPKLKSTGAGRYQLLSR
 WWDAYRKQLGLKDFSPKSQDAVALQQIKERG
 ALPMIDRGDIRQAIDRCSNIWASLPGAGYG
 QFEHKADSLIAKFKEAGGTVREIDVGAGSNL
 VAQLENEVASLENENETLKKKNLHKKDLIAY
 LEKEIANLRKKIEE

Alignment:

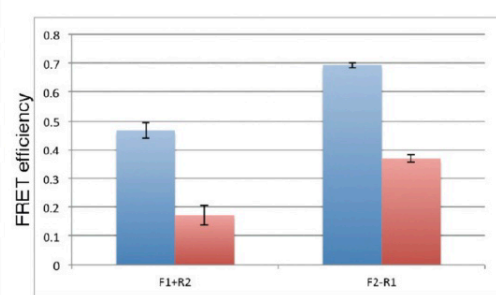
heptad position fg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdef
 SZ1 NL VAQLENE VASLENE NETLKKK NLHKKDL IAYLEKE IANLRKK IEE
 SZ2 AR NAYLRKK IARLKKD NLQLERD EQNLEKI IANLRDE IARLENE VASHEQ
 -from crystal structure

Interaction Data

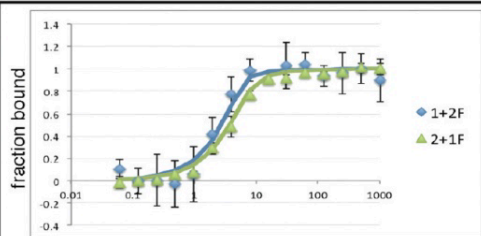
Protein microarray <i>arrayscore</i>	Y2H -Ura	Y2H -His	MAPK (fractional GFP intensity)	SEC	FRET	FP (K _d)
0/0.013	++	+++	0.237/0.329	dimer	parallel	< 10 nM
	slight growth variation			SZ2 monomer possibly interacts w/ column		



Oligomerization(SEC): black- trimer control, cyan-mixture, blue-SZ1, green-SZ2



Orientation(FRET): blue- N-donor:N-acceptor, red- C-donor:N-acceptor



Affinity(FP): "F" denotes labeled species

Interaction partners

SZ1: 7(y2h), 11(pa,y2h), 22(pa,y2h)
 SZ2: 8(y2h), 13(pa,y2h), 14(pa,y2h), 19(pa,y2h),
 20(pa,y2h)

Additional notes

structure available: 3HE5.pdb

Number of amino acids: 184

Molecular weight: 21087.11

Theoretical pI: 9.48

Amino acid composition:

Ala (A)	18	9.8%
Arg (R)	15	8.2%
Asn (N)	11	6.0%
Asp (D)	9	4.9%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	12	6.5%
Glu (E)	13	7.1%
Gly (G)	7	3.8%
His (H)	7	3.8%
Ile (I)	7	3.8%
Leu (L)	17	9.2%
Lys (K)	12	6.5%
Met (M)	5	2.7%
Phe (F)	7	3.8%
Pro (P)	7	3.8%
Ser (S)	10	5.4%
Thr (T)	3	1.6%
Trp (W)	1	0.5%
Tyr (Y)	5	2.7%
Val (V)	18	9.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 22

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 27

Atomic composition:

Carbon	C	932
Hydrogen	H	1493
Nitrogen	N	279
Oxygen	O	270
Sulfur	S	5

Formula: C₉₃₂H₁₄₉₃N₂₇₉O₂₇₀S₅

Total number of atoms: 2979

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	12950
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.614

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 33.35
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 89.02

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.503

Number of amino acids: 149

Molecular weight: 16873.93

Theoretical pI: 9.26

Amino acid composition:

Ala (A)	15	10.1%
Arg (R)	14	9.4%
Asn (N)	12	8.1%
Asp (D)	6	4.0%
Cys (C)	2	1.3%
Gln (Q)	7	4.7%
Glu (E)	13	8.7%
Gly (G)	13	8.7%
His (H)	8	5.4%
Ile (I)	7	4.7%
Leu (L)	12	8.1%
Lys (K)	9	6.0%
Met (M)	4	2.7%
Phe (F)	4	2.7%
Pro (P)	1	0.7%
Ser (S)	7	4.7%
Thr (T)	5	3.4%
Trp (W)	2	1.3%
Tyr (Y)	2	1.3%
Val (V)	6	4.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 19

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 23

Atomic composition:

Carbon	C	721
Hydrogen	H	1157
Nitrogen	N	237
Oxygen	O	221
Sulfur	S	6

Formula: C₇₂₁H₁₁₅₇N₂₃₇O₂₂₁S₆

Total number of atoms: 2342

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 14105
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.836, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 13980
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.828, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 35.46
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 71.48

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.832

Number of amino acids: 227

Molecular weight: 25778.09

Theoretical pI: 8.81

Amino acid composition:

Ala (A)	18	7.9%
Arg (R)	14	6.2%
Asn (N)	13	5.7%
Asp (D)	14	6.2%
Cys (C)	1	0.4%
Gln (Q)	11	4.8%
Glu (E)	17	7.5%
Gly (G)	19	8.4%
His (H)	10	4.4%
Ile (I)	12	5.3%
Leu (L)	23	10.1%
Lys (K)	20	8.8%
Met (M)	4	1.8%
Phe (F)	6	2.6%
Pro (P)	5	2.2%
Ser (S)	13	5.7%
Thr (T)	7	3.1%
Trp (W)	4	1.8%
Tyr (Y)	7	3.1%
Val (V)	9	4.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B) 0 0.0%

(Z) 0 0.0%

(X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 31

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 34

Atomic composition:

Carbon	C	1135
Hydrogen	H	1795
Nitrogen	N	337
Oxygen	O	341
Sulfur	S	5

Formula: C₁₁₃₅H₁₇₉₅N₃₃₇O₃₄₁S₅

Total number of atoms: 3613

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 32430

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.258, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 32430

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.258, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 26.47

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 79.56

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.752

Number of amino acids: 182

Molecular weight: 20436.92

Theoretical pI: 9.69

Amino acid composition:

Ala (A)	11	6.0%
Arg (R)	11	6.0%
Asn (N)	12	6.6%
Asp (D)	6	3.3%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	8	4.4%
Glu (E)	10	5.5%
Gly (G)	19	10.4%
His (H)	9	4.9%
Ile (I)	9	4.9%
Leu (L)	13	7.1%
Lys (K)	13	7.1%
Met (M)	4	2.2%
Phe (F)	3	1.6%
Pro (P)	6	3.3%
Ser (S)	11	6.0%
Thr (T)	17	9.3%
Trp (W)	4	2.2%
Tyr (Y)	8	4.4%
Val (V)	8	4.4%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 16

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 24

Atomic composition:

Carbon	C	897
Hydrogen	H	1406
Nitrogen	N	270
Oxygen	O	271
Sulfur	S	4

Formula: C₈₉₇H₁₄₀₆N₂₇₀O₂₇₁S₄

Total number of atoms: 2848

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 33920

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.660

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

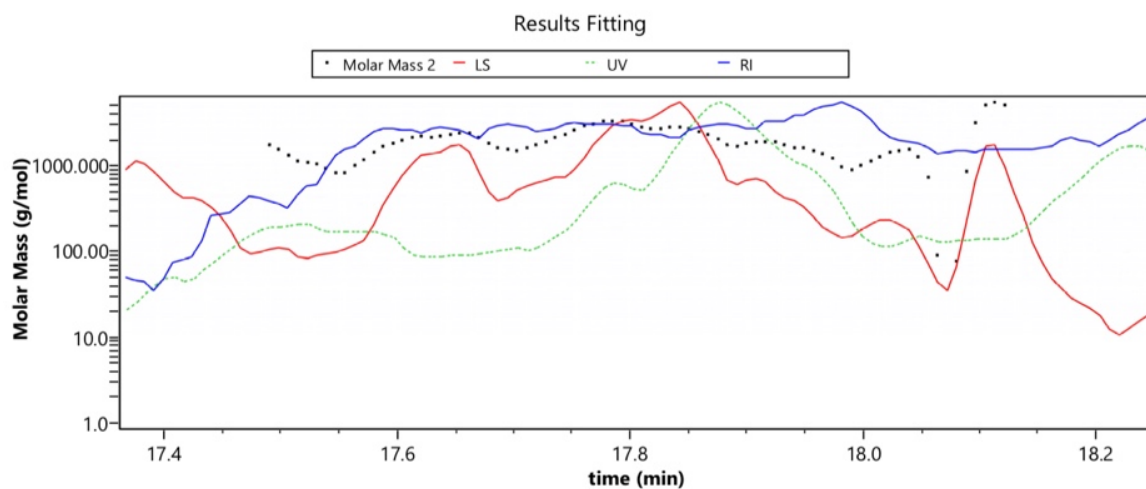
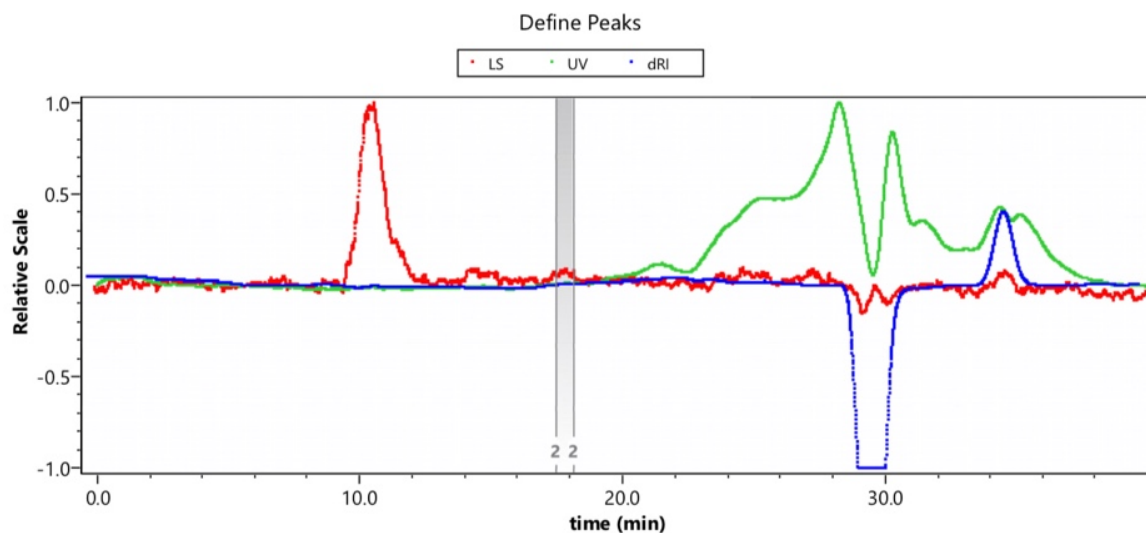
The instability index (II) is computed to be 34.16

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 65.93

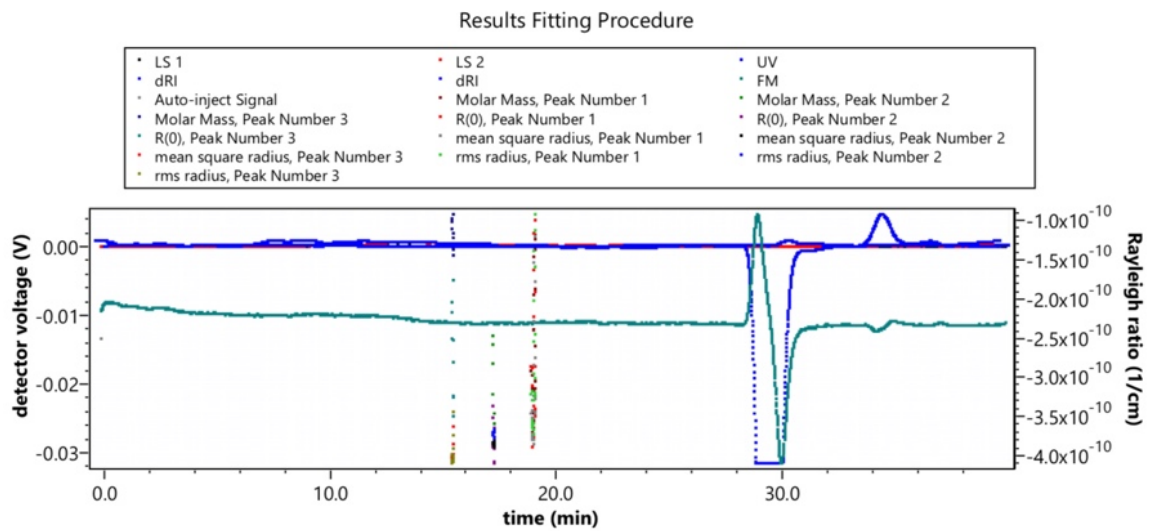
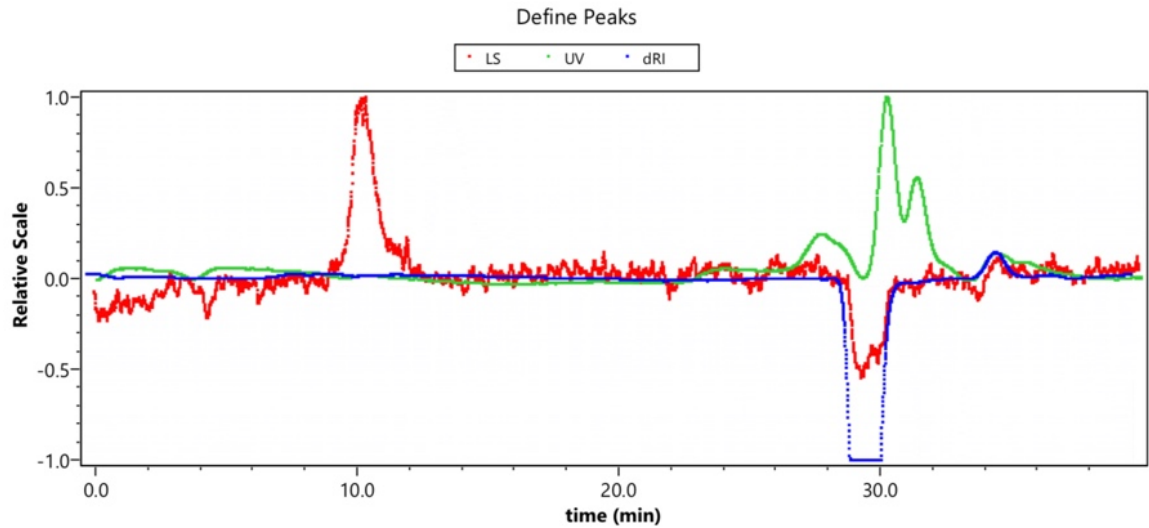
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.811

Dans un premier temps, le domaine SPOR a été analysé dans le tampon de la protéine. Cependant, le signal obtenu au terme de l'analyse n'est pas exploitable. Ceci peut s'expliquer par un échantillon trop dilué.



La courbe verte correspond à l'absorbance dans le domaine des UV (280 nm). La courbe rouge correspond à la courbe de diffraction de la lumière. La courbe bleue correspond à la courbe de l'indice de réfraction. Le nuage de points en noir correspond à l'approximation du poids moléculaire.

Dans un premier temps, le domaine SH3b a été analysé dans le tampon de la protéine. Cependant, le signal obtenu au terme de l'analyse n'est pas exploitable. Ceci peut s'expliquer par un échantillon trop dilué.



La courbe verte correspond à l'absorbance dans le domaine des UV (280 nm). La courbe rouge correspond à la courbe de diffraction de la lumière. La courbe bleue correspond à la courbe de l'indice de réfraction. Le nuage de points en noir correspond à l'approximation du poids moléculaire.

Construction et caractérisation d'hydrolases du peptidoglycane avec de nouvelles propriétés antibactériennes



La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui une problématique majeure de santé publique. En 2014, un rapport très alarmant a été publié par l'économiste Jim O'Neill. Ce rapport prédit qu'en 2050, la mortalité annuelle due à l'antibiorésistance sera supérieure à la mortalité annuelle due au cancer actuellement (plus de 10 millions). Ces chiffres alarmants soulignent la nécessité de relancer la recherche afin de mettre au point de nouveaux moyens pour combattre l'antibiorésistance. Différentes pistes ont été explorées ces dernières années (phages, enzymes, peptides...). La piste enzymatique se révèle particulièrement intéressante. Elle permet de tirer parti de l'efficacité de la machinerie enzymatique des bactériophages tout en évitant le risque de mutations *in vivo* de ces derniers.

Ce travail de fin d'études a été réalisé au centre d'ingénierie des protéines de Liège, dans le laboratoire « paroi et division cellulaire » sous la supervision du docteur Mohammed Terrak. Le but est d'étudier l'effet de la complexation d'un domaine de liaison au PG (*binding*) à un domaine catalytique. En théorie, cette complexation permettrait d'augmenter l'activité du domaine catalytique et pourrait même lui conférer une certaine spécificité. Pour y parvenir, de créer des protéines chimères constituées de 2 domaines sont produites. Trois domaines de *binding* sont analysés : le domaine AMIN de l'amidase C, le domaine SPOR de la protéine FtsN et le domaine SH3b de la lysostaphine. Un seul domaine catalytique est analysé : le lysozyme du phage lambda. Ce travail est scindé en deux objectifs :

Expression et purification

Des bactéries compétentes (*E. coli* BL21) sont transformées avec les plasmides contenant les séquences codant pour la protéine d'intérêt. Chacun des domaines est produit avec une queue poly-histidine qui permettra la purification sur colonne d'affinité ainsi qu'un peptide *coiled-coil* SYNZIP (SZ). Ce dernier permet à *Cell Wall Binding Domain* (possédant un SZ2) de former un complexe avec le lysozyme (possédant un SZ1).

Caractérisation

Avant de procéder aux tests d'activité des protéines produites, il faut s'assurer que les complexes CBD - Lysozyme se sont bien formés. Pour ce faire, une analyse par chromatographie d'exclusion stérique combinée à un détecteur de type *multi-angle light scattering* (MALS) est réalisée. Trois tests d'activités sont effectués pour chacun des CBD, seul ou complexé au lysozyme. Le premier est un *Turbidity Reduction Assay*, le second un *Growth Inhibition Assay* et le dernier un test d'hydrolyse sur PG marqué au *Remazol Brilliant Blue*.