

Faculté des sciences

Purification et caractérisation de L,D-transpeptidases d'*Escherichia coli*

Auteur : Alexander Stephany

Promoteur : Pr. Patrice Soumillion

Lecteurs : Pr. Jean-François Collet et Pr. Pascal Hols

Encadrant : Gol Mohammad Dorrazehi

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en
Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Année académique 2020-2021

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé tout au long de mon parcours.

Un grand merci à mon promoteur, Professeur P. Soumilion, pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour l'attention et le soutien qu'il a porté à ce projet, ainsi que pour ses conseils avisés qui ont permis de mener à terme ce travail.

Merci évidemment à Gol, mon encadrant, qui m'a guidé avec pédagogie tout au long de ce mémoire. Merci à lui pour sa patience, sa disponibilité, l'attention et le temps qu'il a consacré à ce projet et également de m'avoir fait profiter de son expérience scientifique.

Je remercie également les lecteurs, Pr. Jean-François Collet et Pr. Pascal Hols qui s'intéresseront à ce mémoire, ainsi que les membres de mon jury, pour l'intérêt porté au fruit de mon travail.

Je tiens aussi à remercier Damien, Brigitte, et tous les autres membres de l'équipe du laboratoire BGM, qui m'ont accueilli en leur sein. Une équipe pleine de personnes intéressantes et enrichissantes tant au niveau personnel qu'intellectuel. Ce fut un véritable plaisir de travailler à leurs côtés, grâce à la bonne humeur et le climat d'entraide qui règne au sein du laboratoire. Je leur souhaite beaucoup de succès pour la suite de leurs doctorats, post-docs, ou carrières scientifiques.

Merci aussi à mes co-mémorants*es, Amandine, Martin et Denis, ainsi qu'aux autres étudiants rencontrés lors de mon parcours avec qui j'ai partagé d'agréables moments.

Pour finir, je suis reconnaissant à ma famille, mes amis et évidemment ma compagne Sarah pour leurs encouragements et leur soutien continu à étudier ce que je voulais et de m'avoir permis de prendre confiance en moi.

A vous tous, merci !

Abstract

The use of antibiotics is the main method in the fight against bacterial infections. A preferential target is the bacterial envelope, more specifically the peptidoglycan matrix and the enzymes in charge of its biosynthesis. Nevertheless, bacteria have developed a series of resistance mechanisms, thus making the search for new molecules and targets essential. This requires a thorough understanding of the structure, biosynthesis, regulation, degradation and recycling of the bacterial envelope.

The assembly of the envelope notably involves transpeptidation reactions which, on the one hand, cross-link the peptidoglycan by bridging peptide strands (also called muropeptides) and, on the other hand, attach the peptidoglycan to proteins anchored in the outer membrane. The enzymes responsible for these reactions are D,D-transpeptidases and L,D-transpeptidases.

In *Escherichia coli*, three L,D-transpeptidases are responsible for the formation of connections between the peptidoglycan and the outer membrane via Braun's lipoprotein also known as Lpp. This link is formed between the protein's C-terminal lysine and the meso-diaminopimelic acid (mDAP) in the 3rd position of a muropeptide. It is generally accepted that transpeptidation takes place from a tetrapeptide substrate with release of a C-terminal D-Alanine but this has never been experimentally demonstrated and recent observations in our laboratory suggest that the reaction rather requires a pentapeptide strand with release of a D-Alanyl-D-Alanine dipeptide.

In this context, the aim of this work is to characterize these L,D-transpeptidases of *E. coli* and to identify the substrates of these enzymes.

To this end, the genes of three L,D-transpeptidases were cloned into cytoplasmic and periplasmic expression vectors, fused to a sequence encoding a poly-histidine tail. The purification protocol was optimized. The purified proteins showed no activity on molecular substrates mimicking donor muropeptides and the C-terminal acceptor end of Lpp. Different results suggest that the cysteine at the active center of these L,D-transpeptidases is subject to covalent modification in both the cytoplasm and the periplasm. However, the nature of this modification could not be identified. Overall, this work highlights biochemical challenges for the study of three L,D-transpeptidases of *E. coli* and provides evidences of an unknown modification of the active site which could have a mechanistic importance in the biology of these enzymes. One hypothesis would be that, in their catalytic cycle, these enzymes exist mainly in an acylated form.

Résumé

L'utilisation des antibiotiques est la méthode principale dans la lutte contre les infections bactériennes. Une cible préférentielle est l'enveloppe bactérienne, plus spécifiquement la matrice de peptidoglycane et les enzymes en charge de sa biosynthèse. Néanmoins, les bactéries ont développé une série de mécanismes de résistance, rendant la recherche de nouvelles molécules et de cibles essentielle. Cet objectif requiert une compréhension approfondie de la structure, de la biosynthèse, de la régulation, de la dégradation et du recyclage de l'enveloppe bactérienne.

L'assemblage de l'enveloppe fait notamment intervenir des réactions de transpeptidations qui, d'une part, réticulent le peptidoglycane par pontage entre brins peptidiques (aussi appelés mucopeptides) et, d'autre part, attachent le peptidoglycane à des protéines ancrées dans la membrane externe. Les enzymes en charge de ces réactions sont les D,D-transpeptidases et les L,D-transpeptidases.

Chez *Escherichia coli*, trois L,D-transpeptidases sont responsables de la formation de connexions entre le peptidoglycane et la membrane externe par l'intermédiaire de la lipoprotéine de Braun aussi appelée Lpp. Ce lien est formé entre la lysine C-terminale de la protéine et l'acide méso-diaminopimélique (mDAP) en 3ème position d'un mucopeptide. Il est généralement accepté que la transpeptidation a lieu au départ d'un substrat tetrapeptidique avec libération d'une D-Alanine C-terminale mais ceci n'a jamais été démontré expérimentalement et des observations récentes au laboratoire suggèrent que la réaction nécessite plutôt un brin pentapeptidique avec libération d'un dipeptide D-Alanyl-D-Alanine.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de caractériser ces L,D-transpeptidases d'*E. coli* et d'identifier les substrats de ces enzymes.

Pour ce faire, les gènes de trois L,D-transpeptidases ont été clonés dans des vecteurs d'expression cytoplasmique et périplasmique, fusionnés à une séquence encodant une queue de poly-histidine. Le protocole de purification a été optimisé. Les protéines purifiées n'ont montré aucune activité sur des substrats moléculaires mimant les mucopeptides donneurs et l'extrémité acceptrice C-terminale de Lpp. Différentes analyses semblent suggérer que la cystéine du centre actif de ces L,D-transpeptidases soit sujette à une modification covalente aussi bien dans le cytoplasme que dans le périplasme. Toutefois, la nature de cette modification n'a pas pu être identifiée. Globalement, ce travail met en évidence les défis biochimiques pour l'étude de trois L,D-transpeptidases d'*E. coli* et fournit les preuves d'une modification inconnue du site actif qui pourrait avoir une importance mécaniste dans la biologie de ces enzymes. Une hypothèse serait que, dans leur cycle catalytique, ces enzymes existent principalement sous une forme acylée.

Abbreviations

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Å	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
C-terminal	Carboxy-terminal
Cys	Cystéine
D.O.	Densité optique
dNTP	Mélange des 4 déoxyribonucléotides triphosphates
DTNB	5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque)
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IgG	Immunoglobulines de type G
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Ldt, L,D Tase	L,D-transpeptidases
Lpp	Lipoprotéine de Braun
mDAP	Méso-diaminopimélique
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MS	Spectrométrie de masse
NAG, ou GlcNAc	N-acétyl-glucosamines
NAM ou MurNAc	N-acétyl-muramiques
N-terminal	Animo-terminal
pb	Paire de bases
PBP	Penicillin binding protein
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PG	Peptidoglycane
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
SL	Smart ladder
TAE	Tampon Tris acétate, Acide acétique et EDTA
Tris	Tri(hydroxyméthyl)aminométhane

Table des matières

I.	Introduction	1
	Peptidoglycane, structure et synthèse	1
	Structure du peptidoglycane	1
	Synthèse et maturation du peptidoglycane	3
	Rôle des transpeptidases périplasmiques	5
	D,D-transpeptidases (D,D-TPases)	5
	L,D-transpeptidases (Ldt ou L,D-TPases)	6
	L,D-transpeptidases d' <i>Escherichia coli</i>	9
II.	Objectif et stratégie	11
III.	Résultats expérimentaux	13
	Analyse bioinformatique des 3 L,D-transpeptidases	13
	Construction des vecteurs d'expression de L,D-transpeptidases	15
	Expression et purification des L,D-transpeptidases	18
	Caractérisation de l'activité des transpeptidases	21
	Réactions de transpeptidations	21
	Mesure de l'activité de la cystéine du centre actif via titration d'Ellman	23
	Masse totale des L,D-transpeptidases	23
	Détection du site actif des transpeptidases	24
IV.	Discussion et Perspectives	27
	Un mécanisme hypothétique de protection des Ldt d' <i>E. coli</i>	30
V.	Conclusion	32
VI.	Matériels et méthodes	33
	Souches bactériennes et conditions de croissance	33
	Manipulation d'ADN et de plasmides	33
	Construction de plasmides d'expression	35
	Amplification	35
	Restriction	36
	Ligation	36

Assemblage Gibson.....	36
PCR sur colonies	36
Purification d'ADN.....	37
Extraction d'ADN plasmidique.....	37
Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	37
Electroporation.....	38
Transformation chimique	38
Purification des L,D-transpeptidases.....	39
Vecteur d'expression	39
Expression cytoplasmique : lyse cellulaire	39
Extraction périplasmique : extraction	39
Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	40
Western Blot	40
Purification.....	40
Caractérisation de l'activité des L,D-transpeptidases	41
Détermination des cystéines actives par détection de thiols.....	41
Réaction de transpeptidation	41
Solutions utilisées	42
VII. Bibliographie	43
VIII. Figures supplémentaires.....	50

I. Introduction

Peptidoglycane, structure et synthèse

Structure du peptidoglycane

Les bactéries, organismes unicellulaires anucléés, sont entourées d'une enveloppe bactérienne qui est séparée du cytoplasme par la membrane plasmique. On peut diviser les bactéries en 2 catégories selon leur coloration Gram. Cette classification permet d'identifier les bactéries en fonction de l'organisation de leurs enveloppes.

Chez les bactéries Gram-positives la membrane plasmique est entourée d'une matrice de peptidoglycane épaisse d'environ 35nm, avec divers glycopolymères liés à cette matrice. Chez les bactéries Gram-négatives, dont *E. coli* fait partie, l'enveloppe est constituée de deux membranes séparées par un espace périplasmique. La membrane interne est similaire à la membrane plasmique trouvée chez les bactéries Gram-positives, tandis que la membrane externe possède un caractère plus imperméable du fait de sa composition. Au sein de l'espace périplasmique, on retrouve également une fine couche de peptidoglycane d'une épaisseur variant entre 2 et 8 nm.

Le peptidoglycane (PG) est une macromolécule dynamique dont le maintien et la biosynthèse sont étroitement régulés. Situé à l'extérieur de la membrane plasmique dans presque toutes les bactéries, il détermine leurs morphologie (Salton et al., 1951; Weidel et al., 1960), protège les cellules du stress osmotique et permet de maintenir l'intégrité cellulaire lors de la division et de la croissance, sans quoi il en résulterait une lyse cellulaire (Ghuysen, 1968). Il joue également un rôle essentiel dans le maintien de la forme cellulaire et sert d'échafaudage pour l'ancrage de protéines et d'autres biopolymères constituant l'enveloppe bactérienne (Dramsi et al., 2008). Le fait que le PG ainsi que les enzymes nécessaires à sa biosynthèse sont trouvés presque exclusivement chez les bactéries, en fait des cibles de choix pour les antibiothérapies (Schleifer & Kandler, 1972).

Comme son nom l'indique, le PG est constitué de brins de glycanes assemblés par alternance de monomères de N-acétyl-glucosamine (NAG, ou GlcNAc) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM ou MurNAc) liés par des liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$, et de brins peptidiques attachés sur le résidu D-lactyle des unités MurNAc (Figure 1).

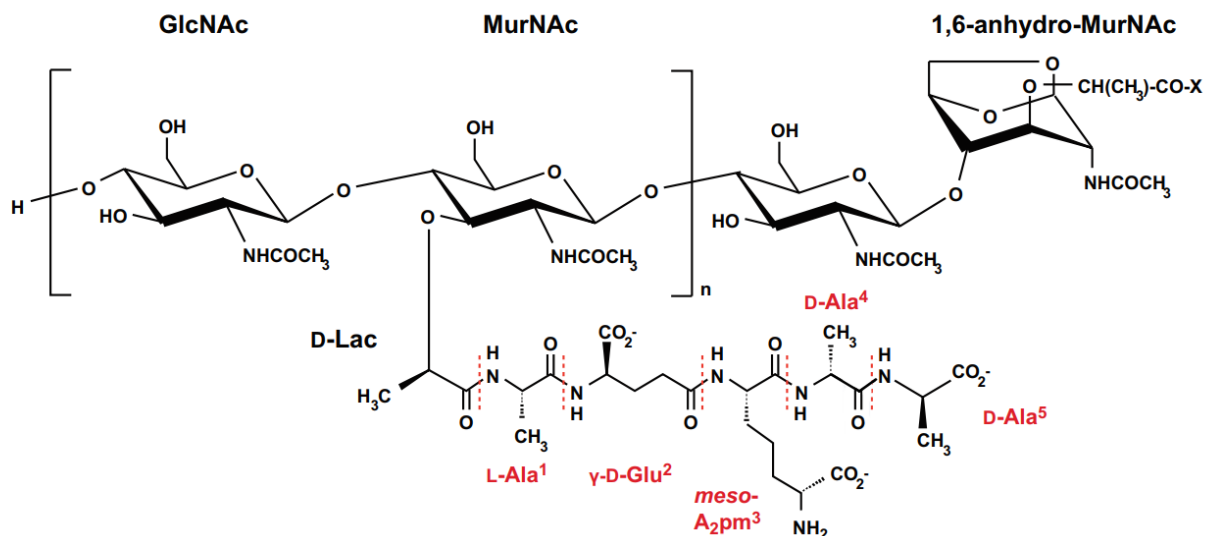


Figure 1. Structure d'un brin de peptidoglycane. Le brin consiste en une alternance de résidus GlcNAc et MurNAc lié par des liaisons glycosidiques, la chaîne est terminée par une anhydroMurNAc. D-Lac représente le groupe lactyl de MurNAc qui connecte les résidus peptidiques (séparés par les pointillés rouges) au brin. (Lecoq, 2012)

Chez les bactéries à Gram négatives, la longueur moyenne d'un brin de glycane se situe habituellement entre 20 et 40 unités disaccharidiques (Quintela et al., 1995) et peut varier en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de cultures (Glauner et al., 1988). Ces brins sont organisés en couches successives et disposés parallèlement à la membrane interne.

Ces brins de glycanes sont connectés par des branchements oligopeptidiques liés aux groupements N-acétyl-muramiques et pontés avec les oligopeptides d'autres brins (Höltje, 1998). Ces oligopeptides appelés mucopeptides permettent de réticuler les brins d'un même plan ou de connecter les couches d'oligosaccharides. La composition des oligopeptides varie en fonction des espèces, mais le précurseur rencontré le plus souvent chez les bactéries à Gram négative est un pentapeptide constitué de L-alanyl-D-isoGlu-méso-diaminopimelyl-D-alanyl-D-alanine, trouvé entre autres chez *E. coli* (Figure 1). Lors de la réticulation, cette alanine en 5ème position est généralement éliminée (Vollmer, Blanot, et al., 2008) au profit d'un lien peptidique formé généralement entre le groupe carboxyl du D-Ala en position 4 et le groupe amine libre de l'acide diaminopimélique en position 3 d'un autre oligopeptide. L'élimination de la D-Alanine C-terminale peut aussi se faire par simple hydrolyse, ce qui permet de contrôler le niveau de réticulation. Il existe cependant une multitude de variations au niveau de la base peptidique, des pontages peptidiques et de la composition des brins de glycanes.

Synthèse et maturation du peptidoglycane

L'assemblage de la couche de peptidoglycane se fait en trois étapes principales. Tout d'abord, via une suite d'étapes enzymatiques au sein du cytoplasme, il y a synthèse du précurseur UDP-MurNAc-[pentapeptide] qui est ensuite attaché à un lipide (undecaprenyl-phosphate ou C55-P) par l'enzyme membranaire *MraY* afin de former le lipide I, ancré dans la face interne de la membrane plasmique. La protéine *MurG* rajoute alors une molécule GlcNAc afin de former le undecaprenyl pyrophosphate-MurNAc-[pentapeptide]-GlcNAc aussi appelé lipide II (Figure 2)(Scheffers & Tol, 2015). Ce précurseur lipide II est ensuite transloqué du côté externe par un mécanisme de flippase. Récemment, il a été montré que, chez *E. coli*, cette fonction est remplie par la protéine *MurJ* (Sham et al., 2014). La délétion de *MurJ* induit l'accumulation de précurseur du peptidoglycane dans le cytoplasme. Du côté périplasmique, le lipide II est utilisé pour la synthèse du PG. L'incorporation dans la matrice de peptidoglycane se fait via des réactions de transglycosylations (TG) ou de transpeptidations (TP) afin d'allonger la chaîne oligosaccharidique ou de former les pontages peptidiques entre les chaînes, respectivement.

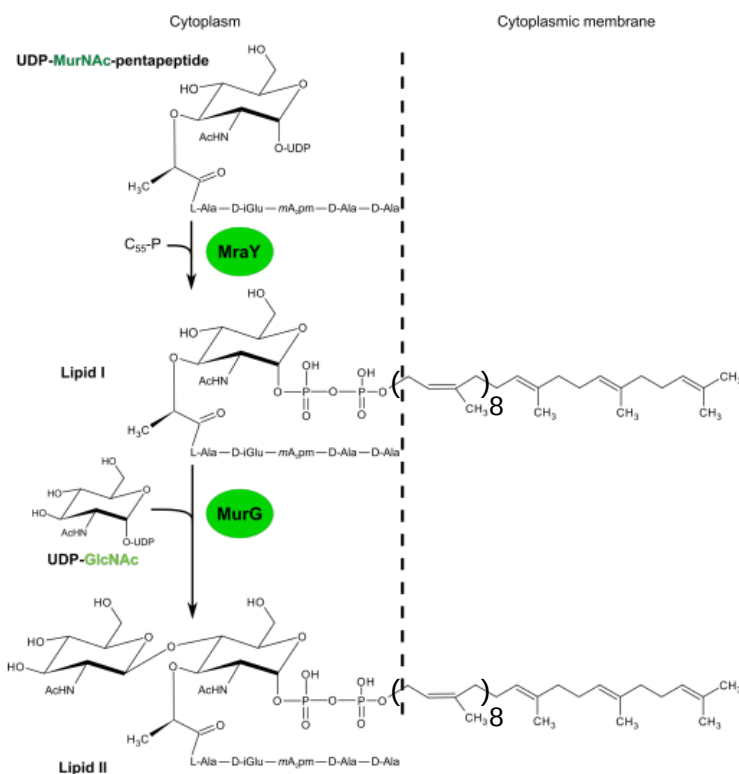


Figure 2. Synthèse du précurseur lipide II. Tout d'abord, l'UDP-MurNAc [pentapeptide] est attaché au undecaprenyl phosphate (C55-P) par *MraY* pour générer le lipide I. Ensuite, *MurG* ajoute l'UDP-GlcNAc, ce qui conduit à la formation du lipide II. Bien qu'il ne soit pas présenté ici, *MraY* est inséré dans la membrane cytoplasmique tandis que *MurG* est probablement associé à la membrane par un patch hydrophobe. (Jean, 2015)

Chez *E. coli*, les réactions de TG seraient réalisées par la protéine monofonctionnelle MtgA, et les PBP ou protéines liant la pénicilline ("penicillin binding proteins") de classe A (Goffin & Ghuysen, 1998; Sauvage et al., 2008). Ces dernières sont bifonctionnelles car elles possèdent également un domaine transpeptidase en charge des pontages peptidiques et qui est la cible des antibiotiques de type pénicilline, d'où leur nom de PBP. Deux autres transpeptidases, des PBP de classe B sont aussi impliquées. Ces protéines sont localisées dans le périplasme et ancrées à la membrane interne via une hélice α , N-terminale (Sung et al., 2009).

Les PBP peuvent être classées en deux catégories en fonction de leurs masses moléculaires ; celles ayant une masse moléculaire élevée (HMW-PBPs), bifonctionnelles, contenant un domaine D,D-transpeptidase (TPase) et un autre domaine transglycosilase (TGase) pour la classe A ou de fonction inconnue pour la classe B ; et celles ayant une petite masse moléculaire (LMW-PBPs) ne contenant qu'un domaine catalytique de type D,D-carboxypeptidase (CPase), DD-transpeptidase (TPase) ou DD-endopeptidase (EPase).

La formation des brins de glycanes est initiée via la formation d'un lien glycosidique β -1,4 entre 2 molécules de lipide II. S'en suit une étape d'élongation où des lipides II sont successivement consommés pour ajouter des unités MurNAc[pentapeptide]-GlcNAc à la chaîne oligosaccharidique en formation. Après chaque formation de lien β -1,4 un lipide (undecaprényl-pyrophosphate) est relâché, ce qui induit un changement de conformation des PBP de et permet l'ajout d'un nouveau substrat lipide II (Lovering et al., 2007). Les transpeptidases qui agissent ensuite pour la réticulation de la matrice seront détaillées dans la section suivante.

La matrice obtenue après l'assemblage du peptidoglycane est soumise à une maturation et un recyclage constant. Le recyclage implique le clivage du PG par des hydrolases : les fragments de PG peuvent être libérés dans le milieu ou être recyclés et réincorporés dans les précurseurs cytoplasmiques. Les liens glycosidiques sont clivés par les N-acétylglucosaminidases, des lysozymes et les transglycosilases lytiques tandis que les liens amides des muropeptides et peptidiques entre les acides aminés sont hydrolysés par les amidases, endopeptidases et carboxypeptidases respectivement (Vollmer, Joris, et al., 2008).

La maturation du PG implique aussi des modifications chimiques du PG, notamment via des N-déacétylations des GlcNAc et MurNAc (Raymond et al., 2005), O-acétylations de fonctions alcools des saccharides (Vollmer, 2008; Wang et al., 2017) et amidations de carboxylates des muropeptides (Mahapatra et al., 2005). Les bactéries utilisent une batterie d'enzymes afin de remplir toutes ces fonctions de synthèses et de maturations. Leurs régulations et fonctions sont très spécifiques mais, collectivement, elles couvrent toutes les conditions de croissances. De plus, les bactéries possèdent des enzymes de réparation du PG endommagé (Pazos et al., 2017).

Rôle des transpeptidases périplasmiques

D,D-transpeptidases (D,D-TPases)

Dans la majorité des bactéries, on retrouve principalement deux types de pontages entre les mucopeptides. Le plus courant, de type 4-3, est une connexion entre le groupe carboxyl de la D-alanine en 4^{ème} position d'un brin donneur et le résidu d'acide méso-diaminopimélique (mDAP) en 3^{ème} position d'un brin accepteur (Figure 3). Ce sont les domaines D,D-transpeptidases des PBP qui créent ces liaisons. Ces domaines sont capables de reconnaître la configuration DD des deux alanines terminales des précurseurs pentapeptidiques. Les PBP clivent l'alanine terminale via une attaque nucléophile d'une sérine sur le carbonyl du lien peptidique entre les deux D-alanines pour former un acyle-enzyme intermédiaire qui va ensuite transférer le groupement acyle sur le groupe amine de la chaîne latérale de l'acide méso-DAP d'un autre mucopeptide.

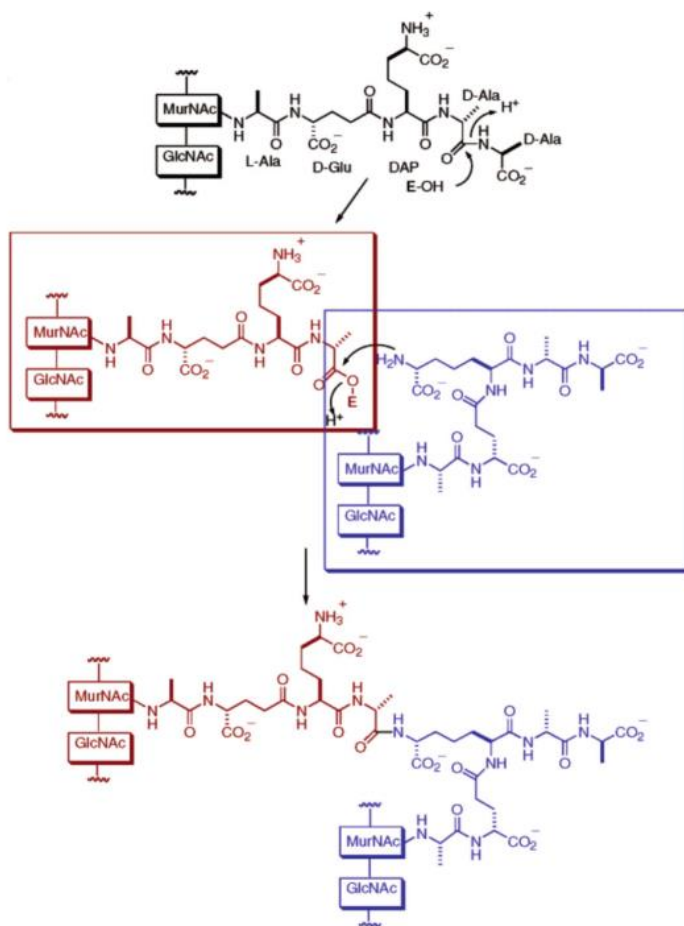


Figure 3. Etapes principales du mécanisme de transpeptidation formant les liens 4-3 et catalysé par les DD-transpeptidases (E-OH). Une attaque nucléophile via la sérine du centre catalytique sur la liaison entre le peptide 4 et 5, mène à la formation d'un acyl-enzyme (cadre rouge) et libération de la D-alanine en position 5. L'amine du mDAP en troisième position du brin accepteur, après déprotonation s'ajoute au carbone du carbonyl final, ce qui induit la dé-acylation de l'enzyme, générant ainsi un lien peptidique entre le D-Ala en 4^{ème} position (brin rouge) et l'acide diaminopimélique qui est en conformation D. (Jean, 2015)

Ces PBP sont la cible des antibiotiques de la classe des bêta-lactames tels que les pénicillines qui agissent en mimant le brin donneur de la liaison peptidique et en réagissant de manière covalente irréversible avec la sérine nucléophile du site actif. Un déséquilibre dans le ratio de synthèse/recyclage du PG peut induire une augmentation de la synthèse de β -lactamase qui permettra à la bactérie de résister à ces antibiotiques (Höltje, 1998; Jacobs et al., 1997).

L,D-transpeptidases (Ldt ou L,D-TPases)

Un autre type de liaison moins courant est une connexion entre deux résidus en position 3 du peptide. Ce sont des liens avec un pontage 3-3 entre les deux résidus méso-DAP, la formation de ce lien peptidique est catalysée par les L,D-transpeptidases (Figure 4).

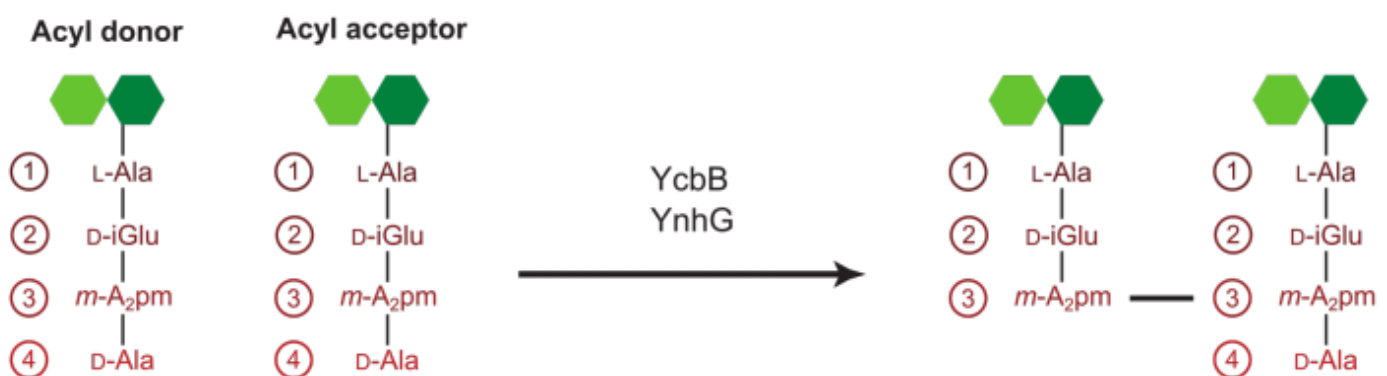


Figure 4. Réaction de transpeptidation formant les liens 3-3 et catalysée par certaines L,D-transpeptidases. Il est généralement accepté que la réticulation entre le carbonyle du résidu en position 3 de la tige donneuse, tetrapeptidique et le groupe amine de la chaîne latérale du résidu en position 3 de la tige acceptrice, par YcnB et YnhG (LdtD et LdtE chez *E. coli*). (Jean, 2015)

Lorsque les pontages de types 3-3 ont été découverts dans le PG de mycobactéries, on ne connaissait pas encore les enzymes responsables de ces réactions (Wietzerbin et al., 1974). Une souche d'*Enterococcus faecium* mutante ayant acquise une résistance à l'ampicilline via l'absence de lien 4-3 a permis d'élucider cette question (Mainardi et al., 2002). Ces cellules étaient dépourvues des liens D,D formés par les PBP (Figure 3), et avaient remplacé ceux-ci par des liens 3-3 formés par des L,D-transpeptidases, insensibles aux β -lactames (Figure 4) (Mainardi et al., 2005). Bien que la formation de ce type de lien constitue un mécanisme de résistance aux pénicillines, il a été montré que les Ldt (L,D-transpeptidases) sont inhibées par les antibiotiques de type carbapénèmes. Ce mécanisme d'inhibition est analogue à celui des β -lactames et procède par une acylation de la cystéine nucléophile de ces enzymes (Dubée et al., 2012). Néanmoins il a été montré qu'en présence d'une concentration subléthale de carbapénèmes le niveau d'expression des Ldt est augmenté, ce qui pourrait compenser l'effet inhibiteur des antibiotiques (Van Laar et al., 2015).

Ces liens 3-3 pourraient aussi fournir une rigidité accrue au PG et ainsi permettre une résistance accrue sous certaines conditions de stress (Goffin & Ghuysen, 1998). Il est aussi possible que, lorsque la synthèse de précurseurs de pentapeptides est limitée, la formation de ce type de liaison serve à stabiliser un PG moins

abondant. Par exemple, chez *M. tuberculosis*, la proportion de liens 3-3 peut atteindre jusqu'à 80% durant sa phase stationnaire (Lavollay et al., 2008). Un mécanisme de sécrétion de toxine chez *Salmonella enterica* basé autour de la protéine TtsA, nécessite la modification du PG par une L,D-transpeptidase via la formation de ces liens 3-3 (Geiger et al., 2018). TtsA est une muramidase qui facilite la translocation de la toxine à travers le PG. L'hypothèse est que TtsA forme un dimère au sein duquel les monomères sont maintenus ensemble par des mucopeptides liés par un pontage de type L,D (Geiger et al., 2020).

Par ailleurs, les Ldt deviennent essentielles chez *E. coli*, lorsque le transport de liposaccharides vers la membrane externe est réduit suite à la délétion du gène *lptC*. Les cellules produisent alors une proportion accrue de pontages 3-3 afin de survivre à des conditions de stress (Morè et al., 2019).

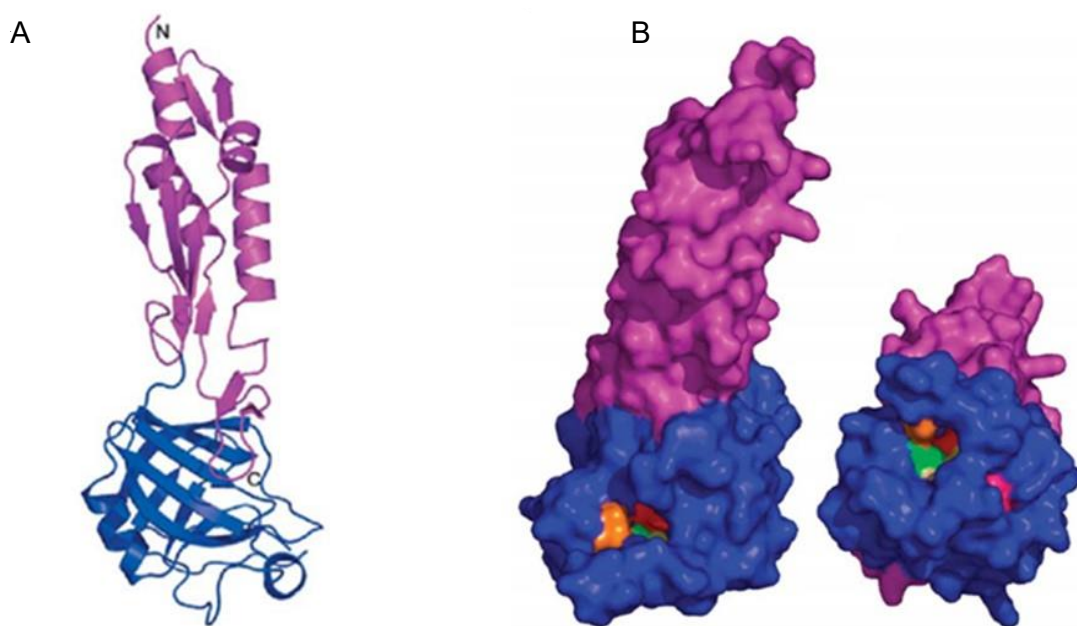


Figure 5. Structure d'une L,D-transpeptidase. A) Structure cristalline de la L,D-transpeptidase d'*Enterococcus faecium* (Ldtfm217), avec le domaine N-terminal (magenta), composé de 9 brins β et 4 hélices α , une hypothèse est que ce domaine sert de piédestal pour placer la partie C-terminale à proximité des chaînes de PG. Le domaine C-terminal (bleu) est composé de 10 brins β , organisé en sandwich β avec 2 feuillets de 5 brins de chaque côté. B) Représentation moléculaire de la L,D-transpeptidase (Ldtfm217) avec le domaine N-terminal (magenta), le domaine C-terminal (bleu), avec la poche catalytique qui comprend la triade de résidus Cys442 (rouge) et His421 (jaune) et Asp422 (rose). Ils sont accessibles via 2 orientations, car séparés par deux feuillets β supposés d'être impliqués dans la fixation du brin accepteur. On y retrouve aussi une Ser439 (vert), une His440 (orange). (Biarrotte-Sorin et al., 2006)

Les Ldt sont aussi responsables de l'incorporation d'acides aminés D non canoniques dans le peptidoglycane (Cava et al., 2011). Il a été montré qu'une augmentation du taux de ces isomères D d'acides aminés, qui ne sont pas des constituants normaux du PG, peut avoir des effets inhibiteurs sur la croissance des cellules bactériennes (Kobayashi et al., 1948), plus particulièrement sur le métabolisme du PG (Horcajo et al., 2012). Ces acides aminés-D non canoniques sont incorporés via une attaque par l'amine de l'acide aminé sur la liaison formant l'acyl-enzyme, ils sont alors observables en 4ème position dans les mucopeptides, et y inhibent les réactions de transpeptidations (Tsuruoka et al., 1984)

Certaines L,D-transpeptidases sont aussi responsables de la formation de liaisons covalentes entre le PG et la lipoprotéine de Braun, aussi appelée Lpp, ancrée dans la membrane externe (Figure 6).

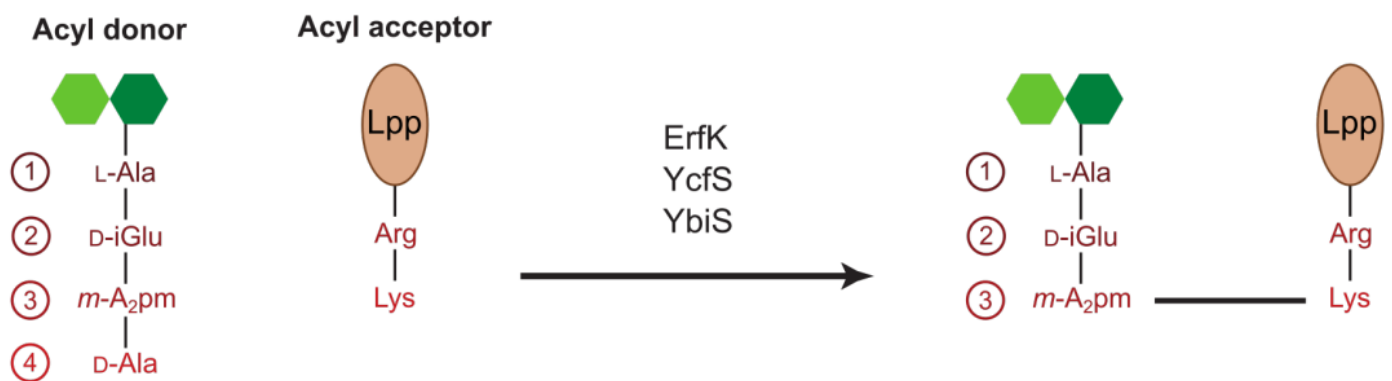


Figure 6. Réaction catalysée par les L,D-transpeptidases pour l'ancrage de la Lpp dans le PG. Les Ldt ErfK, YcfS et YbiS d'*Escherichia coli* catalysent la formation du lien peptidique entre le méso-DAP en troisième position du mucopeptide et l'amine ε de la lysine C-terminale. (Jean, 2015)

Lpp est la protéine la plus abondante de la membrane externe. Son précurseur comporte 78 résidus dont un peptide signal de 20 acides aminés. Il est synthétisé au sein du cytoplasme et est transloqué au travers de la membrane plasmique via la voie Sec (Hayashi & Wu, 1990). Le clivage du peptide signal génère une cystéine N-terminale qui est modifiée par un lipide complexe et la lipoprotéine traverse ensuite le périplasme grâce au système de transport Lol (Yokota et al., 1999) La protéine mature forme une hélice α qui s'assemble en trimère enroulé (Choi et al., 1986).

Il a été démontré que la Lpp contribue à la rigidité de l'enveloppe cellulaire car elle lie le PG de manière covalente chez les bactéries Gram- (Dramsi et al., 2008), et qu'elle contrôle la largeur de l'espace périplasmique (Mathélié-Guinlet et al., 2020).

On trouve la Lpp sous forme liée de manière covalente au PG ou sous forme libre, non connectée au PG. Certains travaux suggèrent que la forme libre est exposée à la surface cellulaire et est transmembranaire tandis que la forme liée est orientée vers le périplasme (Cowles et al., 2011). Environ un tiers des monomères de Lpp se trouvent par ailleurs attachés au PG via l'extrémité C-terminale (Braun, 1975), néanmoins ce ratio peut varier, car une augmentation de liaisons au PG a été observée lors de la phase stationnaire (Pisabarro et al., 1985). Chez *E. coli*, la protéine n'est pas essentielle car sa délétion n'est pas létale mais cela induit des défauts de perméabilité dans la membrane externe, la formation de vésicules ainsi qu'une sensibilité accrue à l'EDTA et à des colorants cationiques (Hirota et al., 1977). De plus des mutations affectant la fonction de la Lpp rendent les cellules plus sensibles à la vancomycine (Mathélié-Guinlet et al., 2020).

L,D-transpeptidases d'*Escherichia coli*

Chez *E. coli* il existe 5 L,D-transpeptidases différentes : LdtA, LdtB, LdtC, LdtD et LdtE (ErfK, YbiS, YcfS, YcbB et YnhG respectivement). Elles sont impliquées dans la formation de liens peptidiques de type 3-3 entre 2 brins de PG, ou de la liaison covalente entre la lipoprotéine de Braun et le PG (Magnet et al., 2007, 2008). Tout comme la Lpp, les L,D-transpeptidases d'*E. coli*, sont exportées du cytoplasme vers le périplasme par la voie Sec (Petersen et al., 2011), grâce à un peptide signal à l'extrémité N-terminale.

Au niveau structurel, les L,D-transpeptidases d'*E. coli* font partie de la super famille YkuD, basée sur une signature d'acides aminés hautement conservés. Cette signature constitue le domaine catalytique des Ldt d'*E. coli* et comprend notamment la cystéine nucléophile (Figure 5). Quatre des cinq (YbiS, YcfS, ErfK and YnhG) transpeptidases ont une taille aux alentours de 300 acides aminés, et partagent entre 42% et 62% d'identité de séquence entre elles. YcbB a une taille de 615 acides aminés, et présente seulement entre 11 et 17% d'identité avec les autres séquences (Sanders & Pavelka, 2013).

Chez *E. coli* les liens méso-DAP-méso-DAP entre les muopeptides constituent de 3 à 10% des pontages du PG (Schwarz et al., 1969). Une analyse de mutants de délétions a permis de montrer que LdtD et LdtE (YcbB et YnhG respectivement) sont responsables de la formation de ces liens (Figure 4) (Magnet et al., 2008).

Il a été montré que LdtD permet de développer un mécanisme de résistance aux β -lactames similaire à celui découvert chez *E. faecium* (Hugonnet et al., 2016) via l'augmentation du taux de pontage mDAP-mDAP qui fortifie le PG lorsque l'enveloppe est stressée. Ceci est probablement dû à la capacité des Ldt de reconnaître les centres L et D, ce qui les rend généralement insensibles aux β -lactames. Cette résistance serait possible grâce à une interaction de LdtD avec PBP1 et PBP5 en cas de stress de la membrane externe (Morè et al., 2019). En cas de changement dans la composition du PG, la voie d'activation Cpx est activée, ce qui résulte en une expression de LdtD augmentée, ce qui accroît le taux de pontages de type 3-3 (Bernal-Cabas et al., 2015).

Néanmoins, LdtD reste sensible aux antibiotiques de la classe des méropénèmes, qui agissent via une acylation du centre catalytique de l'enzyme afin d'en inhiber l'activité (Caveney et al., 2019).

Le deuxième rôle des L,D-transpeptidases est de catalyser la formation de liaisons covalentes entre le PG et les lipoprotéines de Braun (Figure 6). Chez *E. coli*, il est rempli par LdtA, LdtB et LdtC (YbiS, ErfK et YcfS respectivement)(Magnet et al., 2007). La délétion des gènes Ldt inhibent la croissance de cellules. En effet, dans un mutant de délétion triple LdtA, LdtB, LdtC, une perméabilité membranaire accrue est observée (Sanders & Pavelka, 2013). Les cystéines essentielles pour leurs activités sont maintenues dans leurs états réduits et actif, par DsbG (Depuydt et al., 2009), une oxidoreductase dimérique. Il a été montré que les Ldt sont la cible d'ions cuivre lors de la genèse de l'enveloppe bactérienne, ce qui inhibe leurs actions sans empêcher la croissance des cellules mais rend celles-ci plus sensibles au stress (Peters et al., 2018).

II. Objectif et stratégie

Comme mentionné ci-dessus, les L,D-transpeptidases sont impliquées dans l'homéostasie de l'enveloppe bactérienne. L'action des Ldt permet aussi d'évoluer pour résister à l'action des antibiotiques de la classe des β -lactames. De manière plus spécifique les L,D-transpeptidases d'*E. coli* permettent de former les liens de type 3-3, ainsi que d'ancrer les lipoprotéines de Braun dans le peptidoglycane, permettant ainsi de lier la membrane externe au peptidoglycane (Dramsi et al., 2008). A ce jour, il est généralement accepté que la réaction d'ancrage se produit à partir d'un substrat tetrapeptidique avec une D-Alanine comme groupe sortant, mais aucune expérience n'a réellement permis de prouver cette hypothèse (Magnet et al., 2007).

Au laboratoire, un projet de recherche concerne l'étude d'une D,D-CPase de *Thermosynechococcus elongatus*, et un variant toxique dont l'activité hydrolytique est accrue a été obtenu. Récemment, ce variant a été exprimé à faible niveau dans le périplasme d'*E. coli* et des échantillons de PG ont été analysés par un spécialiste de la caractérisation de PG. L'analyse de ces échantillons montre une disparition des mucopeptides pentapeptidiques tandis que la proportion de tetrapeptides ne varie pas. Ceci était attendu suite à l'action de la D,D-CPase. De manière plus surprenante, une diminution de 75% de l'ancrage de la lipoprotéine de Braun dans le PG est observée, ce qui est très probablement à l'origine du phénotype de sensibilité accrue au stress osmotique également observé pour cette bactérie.

Ces résultats suggèrent que la réaction d'ancrage de la Lpp catalysée par les L,D-transpeptidases fait intervenir un substrat pentapeptidique, avec un dipeptide D-Ala-D-Ala comme groupe sortant, et non pas un substrat tetrapeptidique (Figure 7).

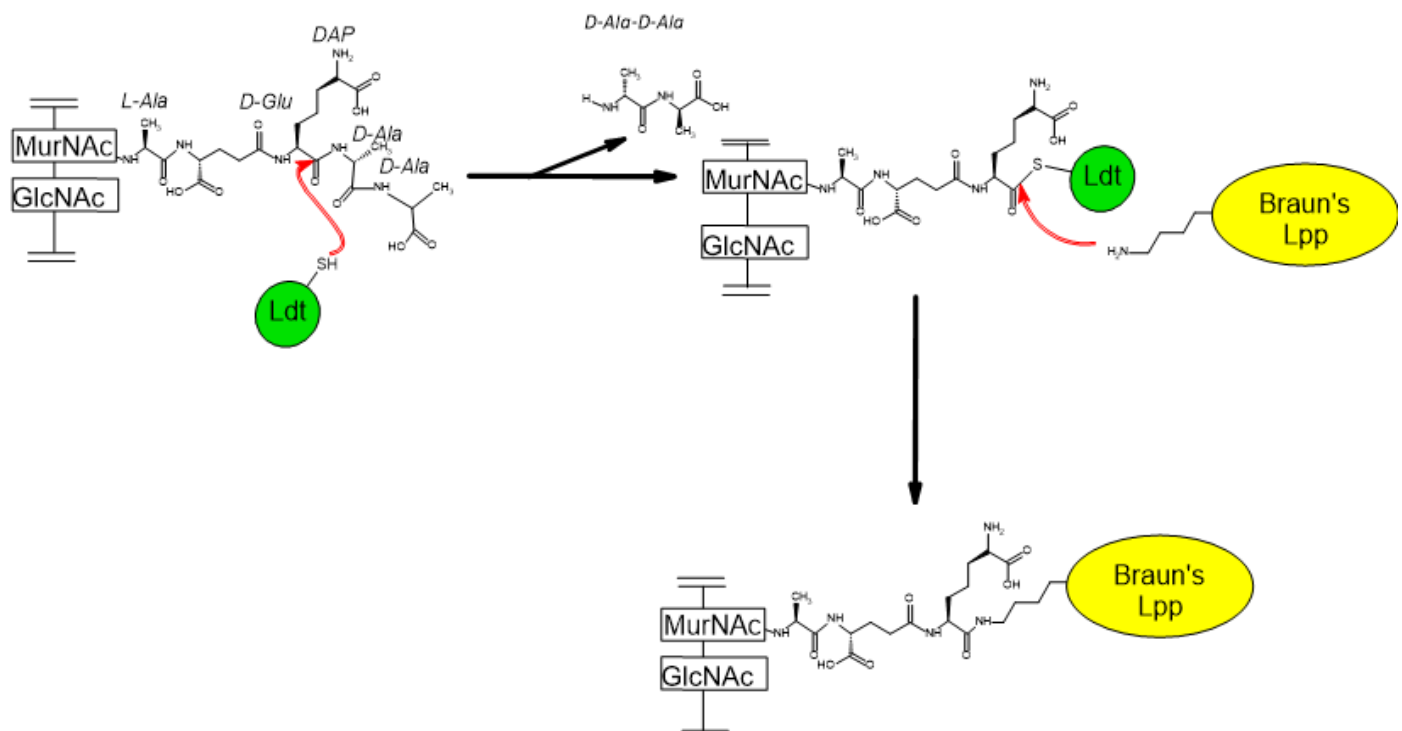


Figure 7, Hypothèse du mécanisme de transpeptidation formant les liaisons peptidiques entre la Lpp de Braun et les mucopeptides. Une attaque nucléophile via la cystéine du centre catalytique de la Ldt sur la liaison entre le méso-DAP en 3ème position et la D-alanine en 4ème position, mène à la formation d'un acyl-enzyme et libération du dipeptide D-Alanyl-D-Alanine. L'amine ϵ de la chaîne latérale de la lysine C-terminale, après déprotonation, s'ajoute au carbone du carbonyle α , ce qui induit la dé-acylation de l'enzyme, générant ainsi un lien isopeptidique entre le méso-DAP et la Lpp de Braun.

L'objectif de ce travail est donc de lever le voile sur la nature du substrat utilisé par les L,D-transpeptidases lors de l'ancrage des lipoprotéines de Braun dans la matrice de peptidoglycane.

Pour ce faire la première étape de ce travail sera la construction de plasmides d'expression comprenant les gènes de LdtA, LdtB et LdtC d'*E. coli* fusionnés avec un tag de purification polyhistidine (Figure 10.A). Notre objectif sera d'exprimer les trois L,D-transpeptidases avec et sans séquence signal afin d'obtenir une sécrétion dans le périplasme ou une simple expression dans le cytoplasme, ceci afin de pouvoir sélectionner le système offrant les meilleurs rendement et pureté en enzymes actives.

Les protéines seront exprimées dans *E. coli* et purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne. Afin de valider un des deux substrats hypothétiques, l'activité transpeptidase des Ldt d'*E. coli* sera testée avec des substrats moléculaires qui miment la partie peptidique (tétra ou penta peptidique) du peptidoglycane ainsi que l'extrémité C-terminale de la Lpp. Nous tenterons de détecter les produits de transpeptidation par spectrométrie de masse. Si le temps le permet, une étude enzymologique plus approfondie sera menée et nous évaluerons la possibilité de préparer les enzymes en grande quantité pour des études structurales par cristallisation.

III. Résultats expérimentaux

Analyse bioinformatique des 3 L,D-transpeptidases

Une analyse BlastP (Zhang et al., 2000) dans la banque donnée PDB (protein data bank) a été effectuée afin de déterminer la protéine de structure connue la plus proche des 3 Ldt d'*E. coli*. La L,D-transpeptidase de *Klebsiella pneumoniae* (PDB ID :4LZH) a ainsi été identifiée. Elle possède la signature d'acides aminés conservées, de la famille YkuD, qui constitue le domaine catalytique des Ldt d'*E. coli* (Figure 8.A). Un alignement de séquence multiple ClustalW des protéines montre qu'elles ont une taille similaire et elle partage 91% d'identité de séquence avec LdtB (Figure 8.B). La structure de 4LZH, d'une résolution de 1.9 Å, résolue en 2013 par un consortium de génomique, montre un site actif mal défini (Figure 9). Une densité électronique mal définie dans le prolongement d'une des 2 conformations de la cystéine nucléophile (Cys208) a été observée (F. Kerff/ULg, information personnelle).



Figure 8. Alignement de séquence entre L,D-transpeptidases.

A) Alignement de séquence des trois L,D-transpeptidases dans *E. coli* et de la L,D-transpeptidase de *K. pneumoniae*. Les résidus de signature comprenant le domaine catalytique que l'on trouve dans toutes les protéines de la famille YkuD sont encadrés en vert avec le site actif essentiel cystéine encadrée en rouge. B) Pourcentage de similarité de séquence entre les 4 protéines.

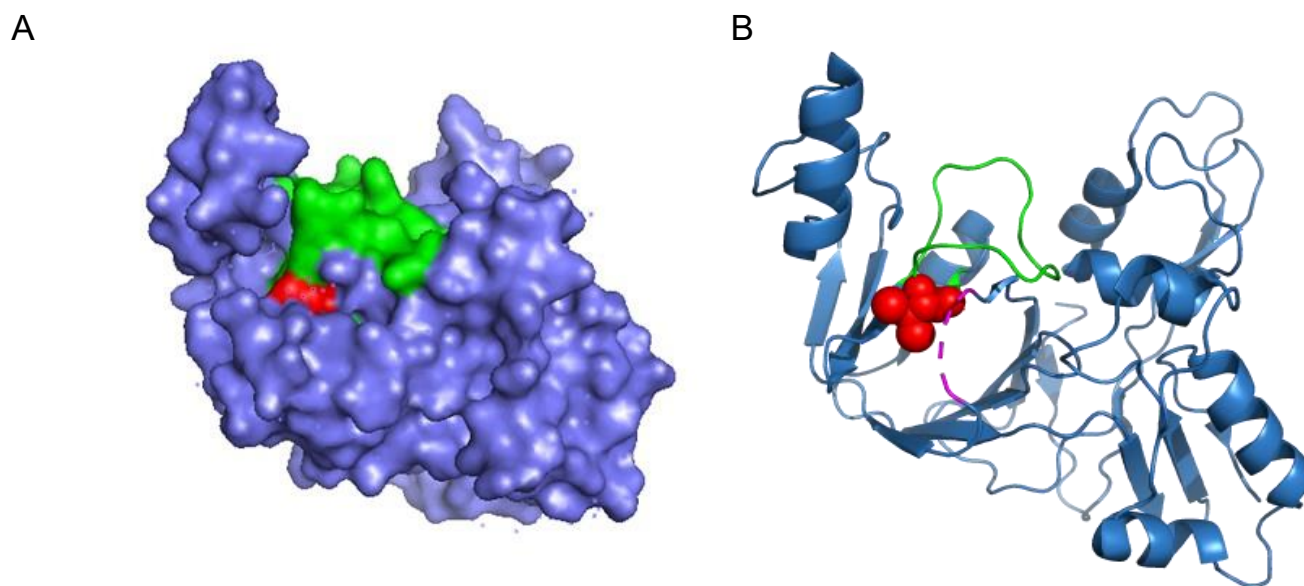


Figure 9. L,D-transpeptidase de *K.pneumoniae*.

A) Structure cristalline de la L,D-transpeptidase de *K. pneumoniae*. Les résidus de signature comprenant le domaine catalytique que l'on trouve dans toutes les protéines de la famille YkuD, en vert avec le site actif essentiel cystéine en rouge. B) Représentation moléculaire de la L,D-transpeptidase de *K. pneumoniae*. Les résidus de signature comprenant le domaine catalytique que l'on trouve dans toutes les protéines de la famille YkuD, en vert avec le site actif essentiel cystéine en rouge, une partie peptidique invisible en pointillé magenta. (PDB ID :4LZH)

Construction des vecteurs d'expression de L,D-transpeptidases

Au préalable de toute expérience de caractérisation ou purification, il a été nécessaire de construire des vecteurs d'expression afin de produire les L,D-transpeptidases. Dans le cadre de ce travail les gènes d'intérêt ont été insérés dans le vecteur d'expression pET-26b+ (Novagen, Cat. No. 691862-3). Celui-ci a permis la fusion du gène à une étiquette 6xHistag facilitant la purification, ainsi qu'une surexpression de la protéine via promoteur T7 inducible à l'IPTG dans des souches contenant le prophage DE3. Le vecteur contient un gène conférant la résistance à la kanamycine.

Les séquences codantes des L,D-transpeptidases ont été amplifiées à partir du génome d'*E. coli* Top10 (Tableau 3). Les gènes à destination des plasmides pET-26b+ *LdtA*, *LdtA+ss*, *LdtB*, *LdtB+ss*, *LdtC*, *LdtC+ss* (Figure 10.A) ont été amplifiés avec succès via l'utilisation de couples d'amorces PCR (Tableau 4) contenant une séquence additionnelle correspondant aux sites de restriction des endonucléases de restrictions ; *NdeI* et *XhoI* nécessaire pour une ligation via la T4 DNA ligase. Après vérification de l'amplification (Figure 10.B), les 6 gènes (*LdtA*, *LdtA+ss*, *LdtB*, *LdtB+ss*, *LdtC*, *LdtC+ss*), et les plasmides ont été digérés par les endonucléases (Tableau 7). Le plasmide ouvert a été extrait du gel. Une ligation par la T4 DNA ligase a été effectuée avec les différents amplicons et le vecteur ayant des extrémités cohésives. Les plasmides recombinants ont ensuite été électro-transformés dans des cellules électro-compétentes de la souche *E. coli* Top10 (Tableau 3). La présence des gènes au sein des plasmides a été contrôlée par PCR sur colonies (Figure 11.A, 11.B), en utilisant une amorce avant, externe au gène (805), et une amorce arrière, interne au gène (808,811,814) (Tableau 4). A ce stade, quatre constructions sur six ont été obtenues (A, B, C, C+ss).

Suite à des résultats non concluant via ligation classique, les plasmides pET-26b+ LdtA+ss et LdtB+ss ont été construits par assemblage de Gibson. A cet effet les gènes ainsi que les plasmides ont été amplifiés via l'utilisation de couples d'amorces PCR (Tableau 3) contenant une séquence chevauchante de minimum 40 paires de bases correspondantes aux séquences à joindre. L'amplification a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 10.C, 10.D). Ensuite une réaction de liaison des deux fragments par assemblage Gibson a été effectuée, suivie d'une électroporation dans des cellules électro-compétentes de la souche Top10 d'*E. coli* (Tableau 3). La présence des gènes au sein des plasmides a été vérifiée par PCR sur colonie (Figure 11.C, 11.D), comme pour les plasmides issus de la ligation.

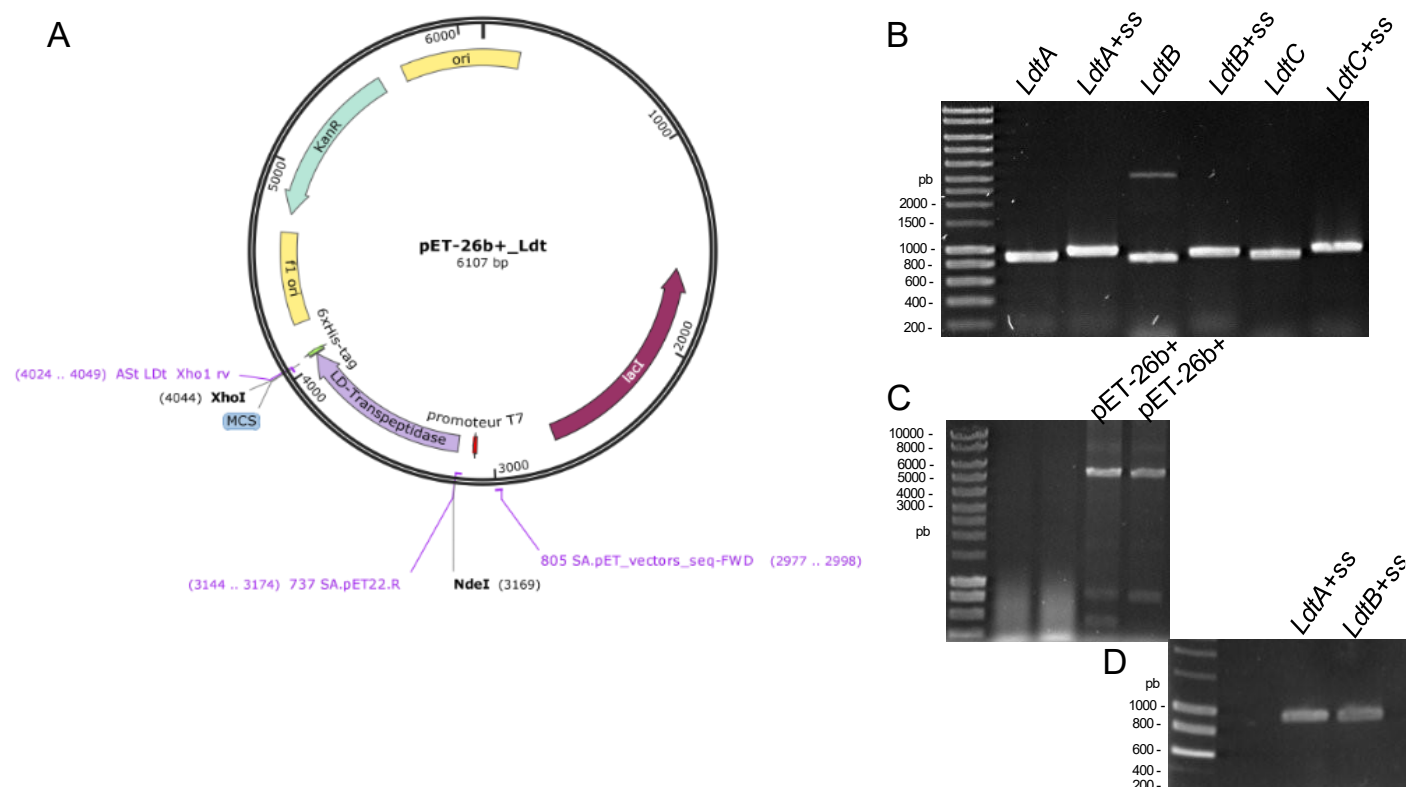


Figure 10. Amplification des séquences codantes d'ADN.

A) représentation schématique du plasmide pET-26b+. La séquence correspondant au gène d'intérêt est colorée en magenta, un gène de résistance à la kanamycine comme marqueur de sélection en bleu, le promoteur de la polymérase T7 en rouge, et l'étiquette 6xHis-tag en vert. B) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de l'amplification ADN des gènes Ldt. Les gènes LdtA, LdtA+ss, LdtB, LdtB+ss, LdtC et LdtC+ss sont visibles aux tailles attendues 894, 957, 873, 942, 903, 981 pb, respectivement. C) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de l'amplification ADN du plasmide pET-26b+ pour la Gibson assembly. Les plasmides sont visibles à la taille attendue de 5283pb. D) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de l'amplification ADN des gènes Ldt. Les gènes LdtA+ss et LdtB+ss sont visibles aux tailles attendues de 973pb et 999pb, respectivement.

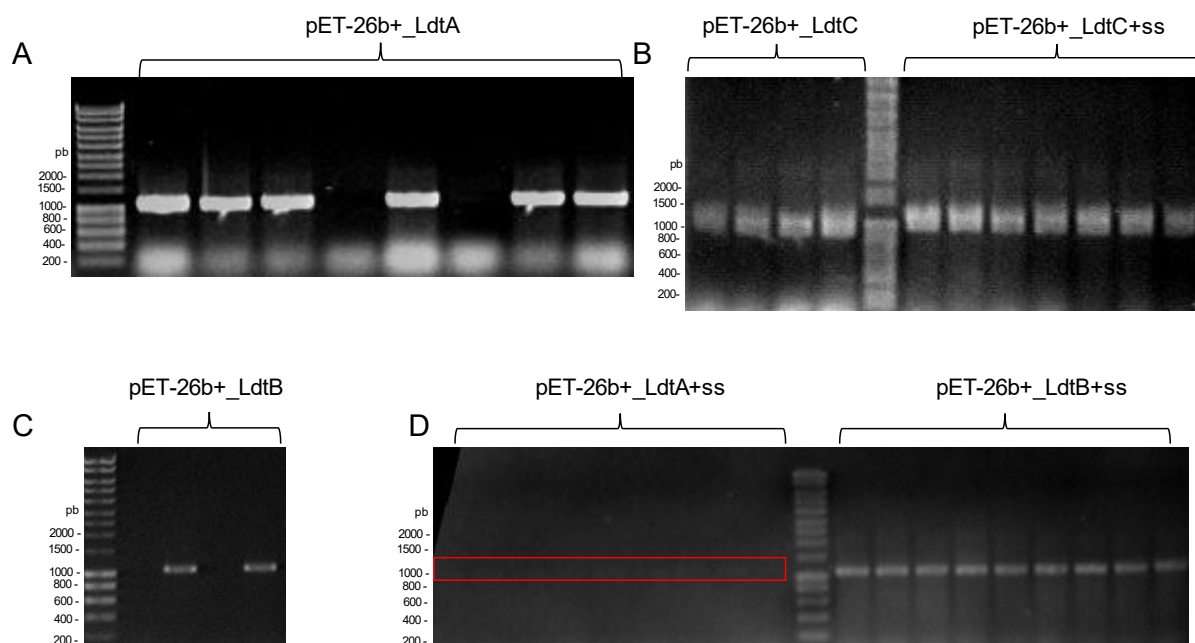


Figure 11. PCR sur colonies afin de vérifier l'insertion des gènes dans les plasmides

A) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de la PCR sur colonie (amorces 805, 808) pour le plasmide pET-26b+ avec intégration du gène LdtA, les fragments sont visibles à la taille attendue de 1073pb. B) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de la PCR sur colonie (amorces 805, 8014) pour le plasmide pET-26b+ avec intégration du gène LdtC ou LdtC+ss, les fragments sont visibles aux tailles attendues de 1082pb et 1160pb, respectivement. C) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de la PCR sur colonie (amorces 805, 811) pour le plasmide pET-26b+ avec intégration du gène LdtB, les fragments sont visibles à la taille attendue de 1052pb. D) Electrophorèse sur gel d'agarose, produit de la PCR sur colonie (amorces 805, 808, 811) pour le plasmide pET-26b+ avec intégration du gène LdtA+ss ou LdtB+ss, les fragments sont visibles aux tailles attendues de 1036pb et 1121pb, respectivement.

Aussi bien pour les vecteurs construits par ligation classique que les vecteurs construits par assemblage de Gibson, les colonies ayant une bonne intégration du gène de la L,D-transpeptidase ont été utilisées afin de préparer une préculture dans le but de constituer un cryo-stock à -80°C avec 20% de glycérol pour être conservé et réutilisé ultérieurement. Cette préculture est aussi utilisée pour effectuer une extraction d'ADN plasmidique afin de vérifier la présence séquences des gènes de L,D-transpeptidases dans les vecteurs construits. L'amorce utilisée pour le séquençage est l'amorce avant externe au gène (805) (Tableau 4), utilisée dans le cadre de la PCR sur colonie. Ces plasmides sont aussi utilisés pour une nouvelle transformation chimique cette fois-ci dans la souche d'expression *E. coli* BL21(DE3) (Tableau 3), contenant une copie chromosomale du gène de l'ARN polymérase de T7 sous le contrôle d'un promoteur pLac.

Expression et purification des L,D-transpeptidases

L'obtention de L,D-transpeptidases purifiées est une étape clef afin de pouvoir tester ultérieurement l'activité enzymatique hypothétique de ces enzymes.

Les L,D-transpeptidases ont été exprimées dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3). Dans un premier temps les 3 enzymes ont été exprimées dans le périplasma et dans le cytosol à différentes températures afin d'évaluer les profils d'expression. Une souche Top10 sauvage ne contenant pas de plasmide a été utilisée comme contrôle. Les cultures à une D.O. 600 de 0.4-0.7 ont été induites pendant 4h à 25° ou 37°C par l'addition d'IPTG à 0.1mM. Ensuite les cellules ont été soumises à une extraction périplasmique ou une lyse cellulaire suivant les clones. Les échantillons ont été analysés sur gel de polyacrylamide (non présenté) et les bandes correspondantes aux Ldt ont été vérifiées par Western-Blot (Figure 12.A, 12.B). Le western-blot montre des bandes principales à environ 36kDa pour les trois protéines lorsque l'expression est induite par IPTG, aux deux températures, pour les gènes avec ou sans la séquence signal, après une extraction périplasmique ou une lyse cellulaire, respectivement. Ce ne sont pas les tailles attendues, en effet, LdtA, LdtB et LdtC ont une taille attendue d'environ 33kDa. On distingue aussi dans l'extrait périplasmique (figure 12.A) une bande supplémentaire à la taille de 33kDa pour LdtB et LdtC, ce qui correspond à la taille attendue de ces protéines. Ces anomalies de tailles suggèrent soit que les enzymes migrent de manière anormale, soit qu'elles ont été modifiées.

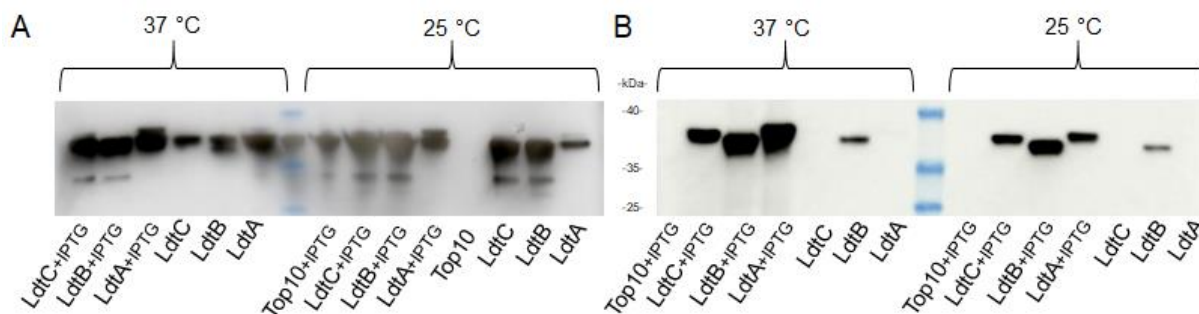


Figure 12. Analyse par Western blot des L,D-transpeptidases exprimées dans BL21(DE3).

A) Expression des gènes avec la séquence signal via addition d'IPTG, suivie d'une extraction périplasmique. A droite l'induction a été effectuée à 37°C, à gauche à 25°C. La souche Top10 a été utilisée comme contrôle. B) Expression des gènes sans la séquence signal via addition d'IPTG, suivie d'une lyse cellulaire. A droite l'induction a été effectuée à 37°C, à gauche l'induction a été effectuée à 25°C. La souche Top10 a été utilisée comme contrôle.

Suite à ces résultats qui montrent des quantités importantes de Ldt produites, une première purification a été effectuée pour les 3 enzymes exprimées à partir des plasmides d'expression cytoplasmique. En effet les protéines ont été exprimées dans le cytoplasme afin d'éviter l'oxydation de la cystéine du centre actif dans le périplasme. Après l'induction avec l'IPTG à 0.1mM dans 0.5L de milieu LB pendant ~4h, les cellules ont été soumises à une lyse cellulaire, et les lysats stockés à -20°C, si nécessaire. Les enzymes ont été ensuite purifiées par chromatographie d'affinité. L'élution a été effectuée avec 5 concentrations d'imidazole différentes (100, 150, 200, 300 et 500mM). Pour les trois protéines un gel de polyacrylamide a été effectué afin d'évaluer si et dans quelles fractions de purification les protéines étaient présentes (Figure 13). On peut voir les Ldt dans toutes les fractions mais elles ne sont pas très pures et la concentration des protéines contaminantes semble corrélée avec la concentration des Ldt elles-mêmes, ce qui suggère que ces Ldt entraînent les contaminants avec elles. Les trois enzymes semblent également être éluées à des concentrations anormalement élevées en imidazole.

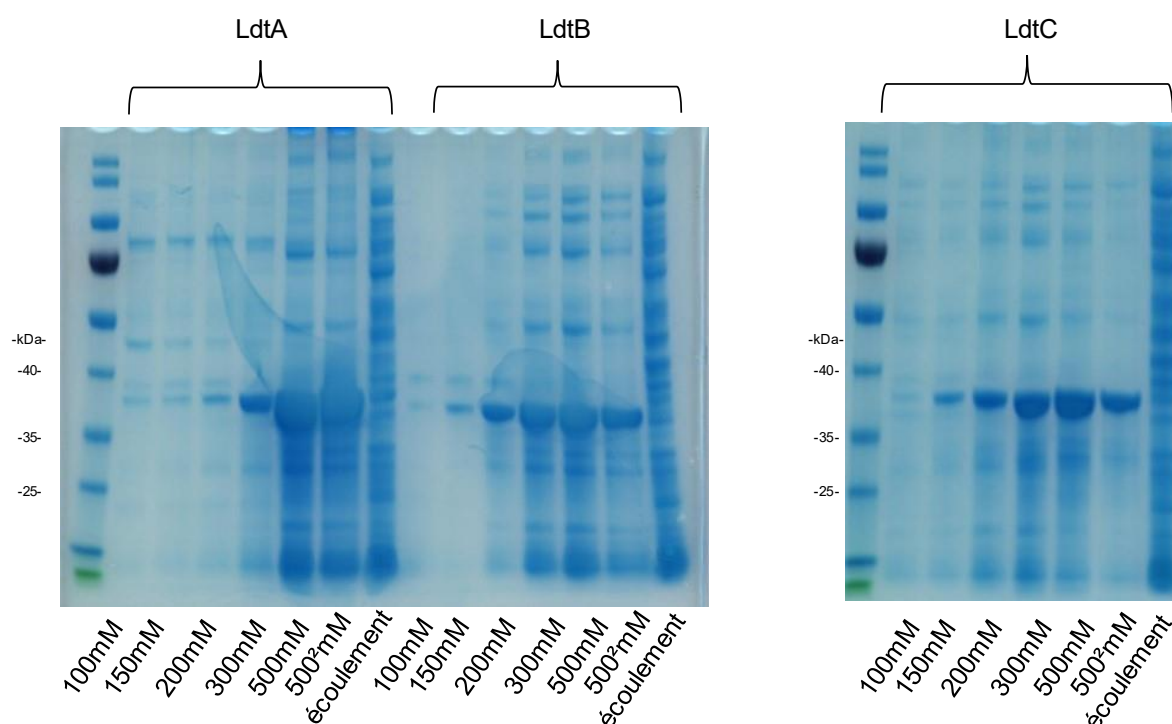


Figure 13. Gels SDS-PAGE des purifications de L,D-transpeptidases par chromatographie d'affinité.

Purification des L,D-transpeptidases histagguées après surexpression dans *E. coli* BL21(DE3). Les concentrations en imidazole présentes dans les différentes fractions de purifications sont indiquées. L'écoulement correspond au filtrat après rétention sur colonne.

D'autres extraits cellulaires ont ensuite été préparés, mais en présence de DTT à 0.5mM pour éventuellement protéger les cystéines des sites actifs de l'oxydation. Ces lysats ont ensuite été stockés à -20°C. Les enzymes ont également été purifiées par chromatographie d'affinité, sur colonne de nickel. Cette purification a également été effectuée en présence de 0.5mM en DTT. Afin d'améliorer la purification, les lavages ont été effectués avec du tampon contenant 10% en glycérol et 1% en Triton X-100 (un détergent non ionique). Pour les trois protéines un gel de polyacrylamide a été effectué afin d'identifier si et dans quelles fractions de purifications les protéines étaient présentes (Figure 14). On peut voir que les protéines ont bien été purifiées et que la pureté est nettement améliorée par rapport au premier essai. Les fractions contenant les protéines pures, ont été divisées en aliquots de 100µL et conservées à -80°C, si nécessaire.

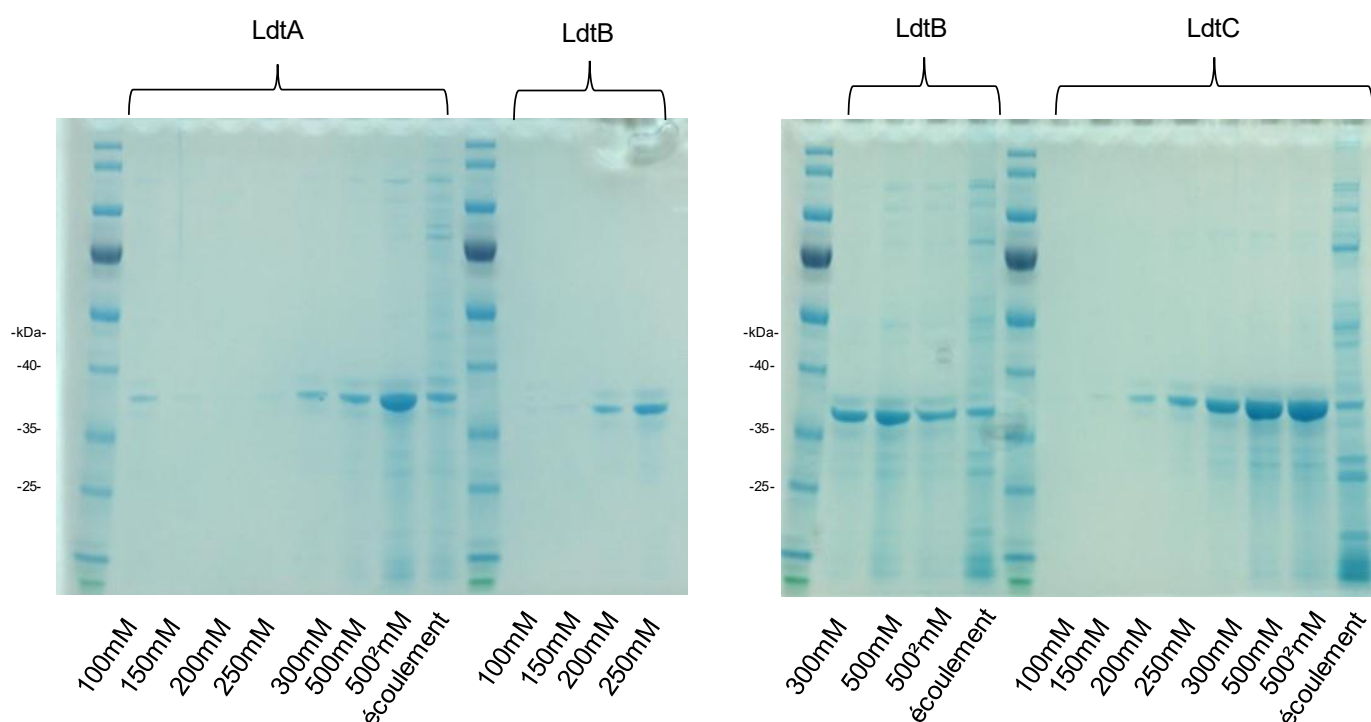


Figure 14. Gel SDS-PAGE des purifications de L,D-transpeptidases par chromatographie d'affinité avec protocole optimisé. Purification des L,D-transpeptidases histagguées après surexpression dans *E. coli* BL21(DE3). Les concentrations en imidazole présentes dans les différentes fractions de purifications sont indiquées. L'écoulement correspond au filtrat après rétention sur colonne.

Caractérisation de l'activité des transpeptidases

Réactions de transpeptidations

Une réaction de transpeptidation a été tentée avec les trois enzymes, en présence de divers peptides donneurs et un peptide accepteur mimant les substrats naturels (muropeptides et Lpp, respectivement) (Figure 15.A, 15.B, 15.C, 15.D). L'acide méso-diaminopimélique ne peut pas être facilement introduit dans des peptides synthétiques et a donc été remplacé par une lysine ou une lysine acétylée. Il a en effet été montré qu'une acétylation peut changer l'affinité des Ldt pour leurs substrats (Pidgeon et al., 2019) et que l'acétylation semble un meilleur mime du méso-DAP présent dans le peptidoglycane. Douze mélanges réactionnels ont ainsi été analysés par HPLC-MS, ainsi qu'en MS avec introduction directe avec l'objectif de détecter des produits de transpeptidation. Les échantillons analysés via HPLC-MS ont au préalable été séparés de l'enzyme par ultrafiltration avec une membrane de taille d'exclusion de 10 kDa afin de séparer les enzymes de leurs substrats et donc de stopper la réaction.

Malheureusement aucun pic correspondant aux masses attendues pour les produits de transpeptidation n'a pu être détecté. Sans filtration et en introduction directe dans le spectromètre, les pics correspondants aux substrats des réactions sont néanmoins identifiables (Fig.S.1).

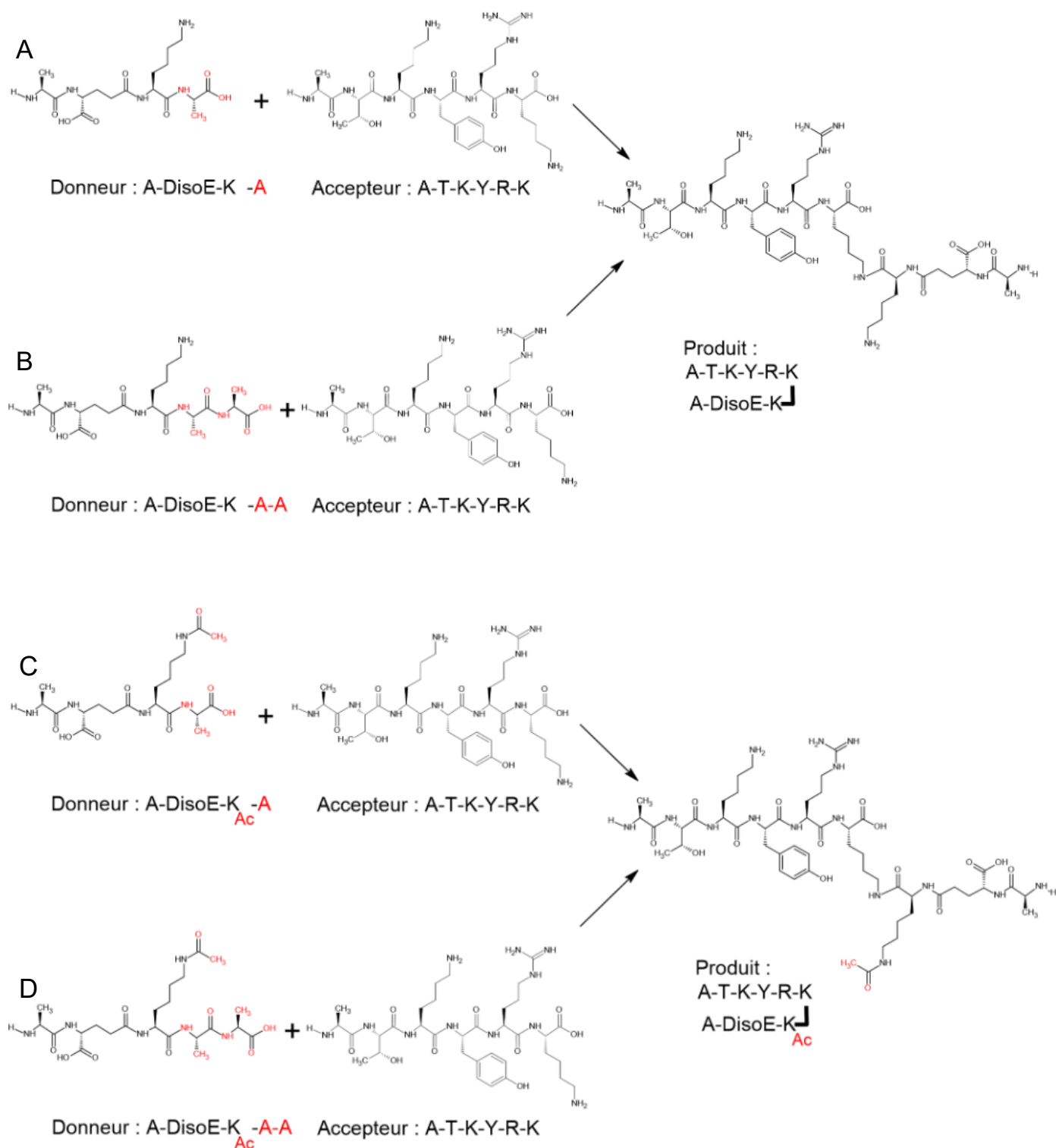


Figure 15. Analyse des réactions de transpeptidations par spectroscopie de masse.

A) Ldt A, B, C effectuent la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur tetrapeptidique A-DisoE-KA et le substrat accepteur mimant la Lpp. B) Ldt A, B, C effectuent la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur pentapeptidique A-DisoE-KAA et le substrat accepteur mimant la Lpp ATKYRK. C) Ldt A, B, C effectuent la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur tetrapeptidique acylé A-DisoE-K(Ac)A et le substrat accepteur mimant la Lpp ATKYRK. D) Ldt A, B, C effectuent la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur pentapeptidique A-DisoE-K(Ac)AA acylé et le substrat accepteur mimant la Lpp ATKYRK.

Mesure de l'activité de la cystéine du centre actif via titration d'Ellman

La présence de cystéine libre dans les sites actifs des Ldt a ensuite été évaluée à l'aide du réactif d'Ellman (ou DTNB). Ce réactif réagissant avec les groupements sulfhydryle, il a fallu au préalable éliminer le DTT. Pour ce faire, un échange de tampon a été effectué par ultrafiltration. Le DTT a été dilué d'un facteur environ 1000. Aucun signal d'absorbance n'a cependant pu être détecté, suggérant que ces centres actifs sont modifiés ou inaccessibles.

Masse totale des L,D-transpeptidases

La masse totale des 3 transpeptidases purifiées a également été vérifiée par une analyse ESI-HDMSE, les échantillons ont été ionisés en condition 50% acetonitrile. 0,2% acide formique et 1% DMSO, pH de 4-5. Les résultats des spectres (Fig.S.2) déconvolués sont présentés dans le tableau 1. Ils montrent que les trois enzymes ont été détectées à leur masse attendue, la masse théorique des enzymes plus la masse d'une méthionine N-terminale ajoutée lors du clonage.

	Masses théoriques (Da)	Masses expérimentales Da
LdtA	33405.18	33405.29
LdtB	32190.22	32190.41
LdtC	32819.99	32820.09

Tableau 1. Analyse LC-ESI-HDMSE des masses totales de Ldt purifiées.

Détection du site actif des transpeptidases.

L'identité des 3 transpeptidases purifiées a été vérifiée par une analyse LC-ESI-HDMSE. Les 3 transpeptidases purifiées ont été digérées par la trypsine et ont été analysées séparément par spectrométrie de masse. Les enzymes ont été digérées telles quelles ou après traitement à l'iodoacétamide (15mM). Les résultats sont présentés dans le tableau 2. De manière surprenante, les résultats suggèrent que le traitement à l'iodoacétamide inhibe la digestion par la trypsine car seulement quelques peptides sont obtenus et la couverture de séquence est mauvaise. Par ailleurs, dans les échantillons non traités, la digestion par la trypsine se produit correctement. En effet, les trois L,D-transpeptidases sont bien identifiées, néanmoins pour aucune des trois enzymes, le peptide contenant la cystéine du centre catalytique n'a pu être détecté dans les spectres. A ce jour, aucun spectre n'a montré une trace de ces peptides même avec une modification.

	Score	Couverture de séquence
LdtA	3093	79%
LdtB	1558	74%
LdtC	6377	88%
LdtA +iodo	30	7%
LdtB+iodo	14	8%
LdtC+iodo	38	8%

Tableau 2. Analyse LC-ESI-HDMSE des Ldt purifiées. Le score, le pourcentage de couverture de séquence associé à l'identification des L,D-transpeptidases sont représentés.

Le fait que la migration par SDS-PAGE est anormalement élevée, que les cystéines des centres actifs ne puissent pas être titrées par DNTB, et qu'aucune réaction ne se produit en présence des substrats hypothétiques de nos enzymes, couplé à l'observation qu'il n'était pas possible de détecter de peptides correspondants aux sites actifs des Ldt, suggèrent que ces régions des L,D-transpeptidases purifiées ont subi une modification. La détection des protéines libres en masse de protéine entière est cependant en contradiction avec ces résultats, mais pourrait signifier que les protéines modifiées ne sont pas détectables en protéines entières et que l'on détecte le peu de protéine libre dans les échantillons, ou que la modification est labile dans les conditions d'ionisation en protéine entière, mais pas en ionisation des peptides après digestion à la trypsine.

Le traitement à l'iodoacétamide semble inhiber la digestion par la trypsine. Cette observation curieuse suggère que, si alkylation il y a, celle-ci pourrait libérer un composé inhibiteur. Ainsi, les enzymes ont été traitées avec de l'iodoacétamide 15mM pendant 30 minutes à l'obscurité et les protéines avant et après traitement ont été analysées par gel SDS-PAGE.

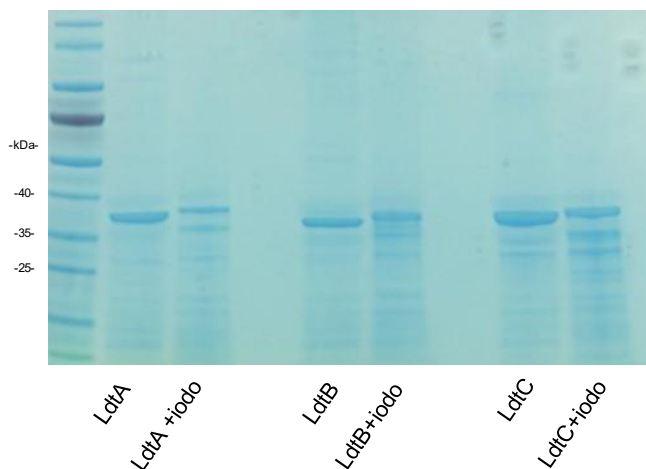


Figure 16. SDS-Page du traitement à l'iodoacétamide.

Les Ldt traitées à l'iodoacétamide 15mM pendant 30 minutes à l'obscurité ont été chargées à côté de Ldt non traitées afin de comparer la vitesse de migration dans un gel SDS-PAGE, ci-dessus les contenus des différents puits.

Pour les trois Ldt on voit que le traitement à l'iodoacétamide génère des nouvelles bandes de tailles inférieures à celle des échantillons non traités (Figure 16). Une bande de taille légèrement supérieure est également observée et pourrait correspondre à une modification par l'iodoacétamide.

Les Ldt ont été exprimées dans le cytoplasme, afin de protéger le site actif de l'environnement oxydant du périplasme. Des composés cytoplasmiques candidats qui pourraient réagir avec les Ldt sont les précurseurs du peptidoglycane (Figure 2). Sa structure contient le pentapeptide (A-DisoE-mDAP-D-Ala-D-Ala) et les disaccharides (NAG et NAM) que l'on retrouve dans le peptidoglycane et c'est un des substrats hypothétiques des L,D-transpeptidases d'*E. coli*. Ce pentapeptide aurait pu réagir avec les Ldt surexprimées et ainsi bloquer le site actif, et donc la réaction de transpeptidation dans l'état d'acyl-enzyme. Dans ce cas, une incubation avec le peptide accepteur de la réaction de transpeptidation aurait pu débloquer les enzymes de leurs états acylés. Pour tester cette hypothèse, les Ldt ont été incubées pendant 45 minutes avec le peptide accepteur à 100μM (ATKYRK) et les protéines ont été analysées par SDS-PAGE

Le gel montre que l'incubation avec le peptide accepteur n'induit pas de changement de vitesse de migration (Figure 17), ce qui suggère qu'aucune réaction ne s'est produite au cours de l'incubation.

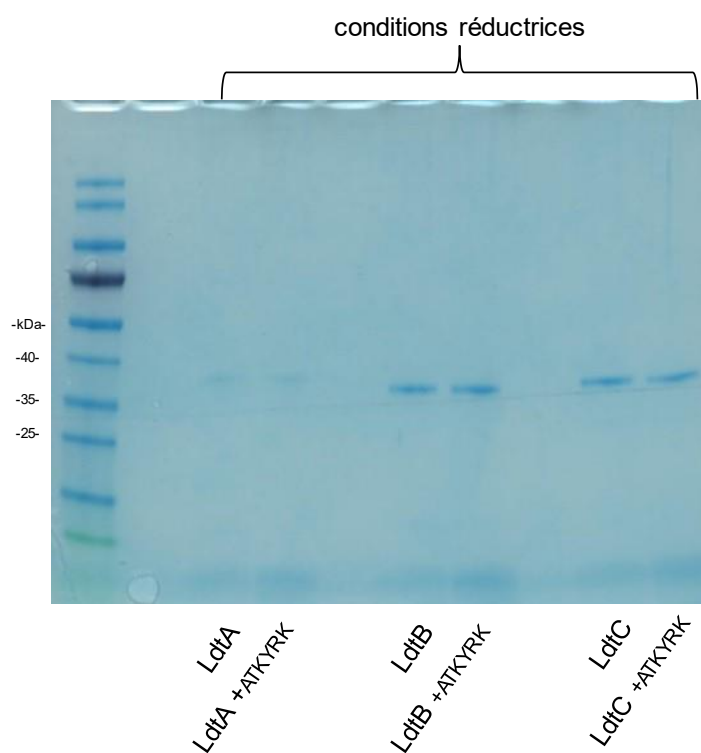


Figure 17. Gels SDS-PAGE du débloquentage de l'acyl-enzyme.

Les Ldt traitées avec le peptide accepteur ATKYRK à 100 μ M pendant 45 minutes ont été chargées à côté de Ldt non traitées afin de comparer la vitesse de migration dans un gel SDS-PAGE.

IV. Discussion et Perspectives

Chez *E. coli*, le peptidoglycane, exosquelette de la cellule bactérienne et barrière essentielle qui protège la cellule, est lié à la membrane externe. Ce lien est formé entre la lipoprotéine de Braun et le PG, par 3 L,D-transpeptidases. Même si leurs fonctions sont connues, on ne sait pas encore exactement comment se produit cette réaction de transpeptidation, ni quels substrats sont utilisés ni même la structure des enzymes.

Dans ce travail, deux vecteurs d'expression ont été créés pour chacune des trois L,D-transpeptidases d'*E. coli* responsables de l'ancrage de la Lpp dans le peptidoglycane. Cette approche a été choisie afin de permettre une expression tant dans le périplasma, l'environnement oxydant naturel de ces enzymes, que dans le cytoplasme, un milieu réducteur potentiellement moins « agressif ». En conditions normales, le mécanisme de réduction des cystéines actives, par la thio-réductase DsbG permet de maintenir les Ldt fonctionnelles dans le périplasma en les protégeant de l'oxydation (Depuydt et al., 2009). Dans ce travail, un des premiers objectifs était de surexprimer les Ldt afin de pouvoir les extraire et les purifier. Pour cela l'expression cytoplasmique était a priori préférée. En effet, une crainte était que le mécanisme de réduction dans le périplasma ne soit pas adapté à de telles quantités d'enzymes. Dans une étude similaire, il a été montré que l'ajout d'un composé réducteur permet d'augmenter le rendement en enzymes actives au terme de la purification (Baldin et al., 2019). A cet effet, l'ajout de DTT dans le protocole de purification a été effectué également afin d'empêcher l'oxydation du centre actif.

Le but de ce travail était de lever le voile sur les substrats utilisés par les trois L,D-transpeptidases (LdtA, LdtB et LdtC). Dès lors, il a été tenté d'imiter la réaction entre la Lipoprotéine de Braun et le PG, via des peptides synthétiques analogues aux muropeptides et à l'extrémité C-terminale de la Lpp (Figure 15.A, 15.B, 15.C, 15.D).

LdtB de *Klebsiella pneumoniae*, la protéine de structure connue la plus proche des trois Ldt à l'étude ici, montre un site actif mal défini avec la chaîne latérale de la cystéine nucléophile occupant deux positions distinctes (Figure 18) et une petite densité électronique dans le prolongement d'une conformation (F Kerff, communication personnelle). Ceci pourrait signifier qu'une partie de l'enzyme est modifiée par acylation avec un groupement flexible invisible en cristallographie ou qu'elle est partiellement oxydée. Une autre possibilité serait que l'enzyme se trouve en équilibre réactionnel entre un état acylé et un complexe non covalent, avec une forte affinité entre l'enzyme et le substrat dans ce dernier.

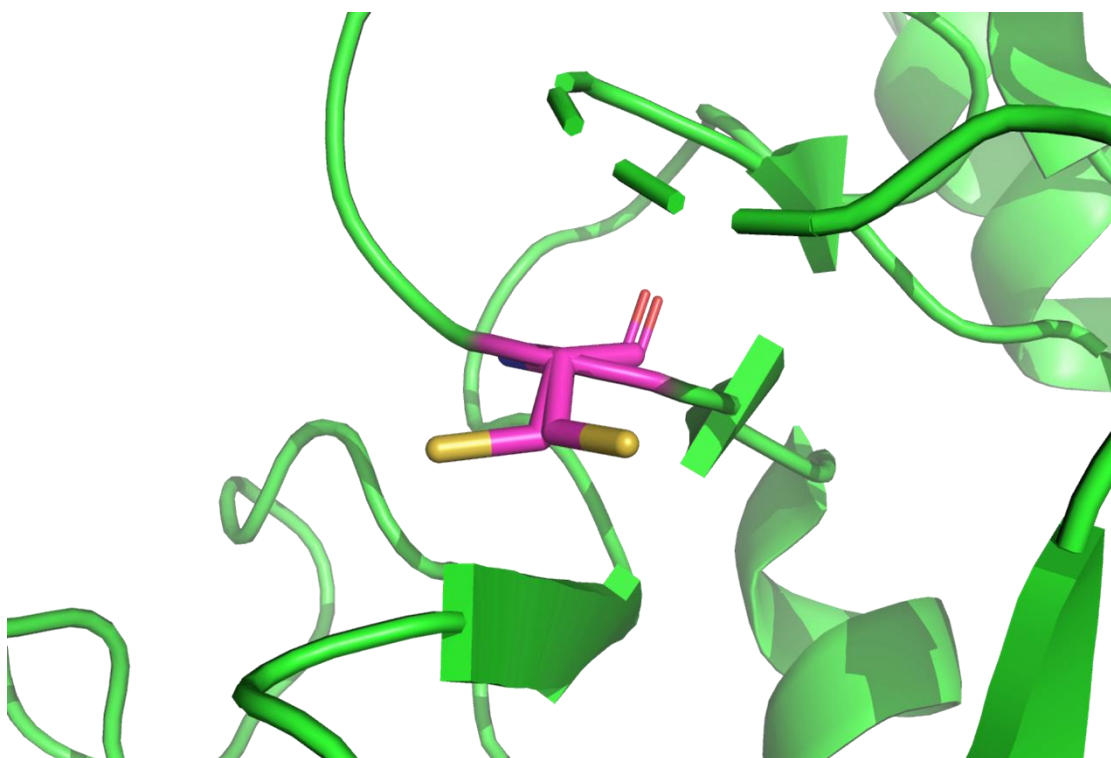


Figure 18. Cystéine du site actif de la L,D-transpeptidase de *K.pneumoniae*.
 En rose la cystéine nucléophile, en deux orientations distinctes, avec le soufre en jaune.

Les peptides donneurs dans la réaction de transpeptidations, analogues du mucopeptide le plus fréquemment retrouvé chez *E. coli* (Vollmer, Blanot, et al., 2008) ont été utilisés avec le troisième acide aminé sous deux formes, soit une lysine chargée positivement, soit une lysine N-acétylée neutre. Aucun de ces deux résidus ne mime très bien le méso diaminopimélate zwitterionique mais nous avons choisi ce qui était disponible en synthèse peptidique. De plus il a été montré avec les transpeptidases d'*E. faecium* que, même si la structure n'est pas identique (Figure 5), cette acétylation sur la lysine améliore l'affinité des L,D-transpeptidases pour leurs substrats (Pidgeon et al., 2019). Les peptides ont été utilisés sous leurs formes tétra ou penta-peptidique. Un hexapeptide correspondant à l'extrémité C-terminale de la Lpp a par ailleurs été choisi comme accepteur. Malheureusement, les résultats de la spectroscopie de masse n'ont pas montré de pics correspondant aux produits de transpeptidation pour aucune des combinaisons de substrats. Les substrats de la réaction ont été détectés indiquant que l'analyse s'est bien déroulée.

Malgré une couverture quasi-complète autour de 80%, l'analyse des peptides issus d'une digestion à la trypsine des trois L,D-transpeptidases n'a pas permis de détecter les peptides correspondant aux sites actifs, suggérant une modification de cette région. De plus, les migrations anormales sur gel SDS-PAGE et western-blot suggèrent un adduit de quelques kDa pour les trois enzymes exprimées aussi bien dans le cytoplasme que dans le périplasme. L'absence de détection de thiol libre au DTNB va dans le même sens.

L'intensification de bandes migrant plus rapidement en SDS-PAGE après traitement à l'iodoacétamide (Figure16) est une observation curieuse mais qui pourrait s'expliquer si les Ldt sont en équilibre réactionnel entre une forme thiol minoritaire, potentiellement réactive à l'iodoacétamide, et une forme acylée majoritaire non réactionnelle. La forme majoritaire serait stable dans les conditions dénaturantes du SDS-PAGE, expliquant la migration anormale alors que la modification de la forme minoritaire thiol en conditions natives pourrait libérer la protéine du groupement qui la modifie. Ce groupement serait par ailleurs inhibiteur de la trypsine.

L'analyse de masse totale, montre que les protéines non modifiées ont bien été détectées à la taille attendue (Tableau 1). Cette observation est difficilement accordable avec ce qui précède mais il est possible que nos préparations contiennent un peu d'enzyme libre et que seule l'enzyme libre est détectée, par exemple si les enzymes modifiées sont agrégées.

Un mécanisme hypothétique de protection des Ldt d'*E. coli*

Une hypothèse est que la molécule qui serait responsable de la modification est présente dans le cytoplasme et dans le périplasme. Des candidats crédibles sont les précurseurs du peptidoglycane, dont le UDP-MurNAc-[pentapeptide], le lipide I ou le lipide II (Figure 2) font parties. Leur structure contient le pentapeptide (A-DisoE-KAA), que l'on retrouve dans le peptidoglycane et qui est un des substrats hypothétiques des L,D-transpeptidases d'*E. coli*. La molécule lipide II est présente des deux côtés de la membrane interne (van Heijenoort, 2007), et sa liaison aux Ldt expliquerait qu'elles apparaissent plus lourdes qu'attendues, dans les gels SDS-PAGE, aussi bien pour les préparations cytoplasmiques que les périplasmiques. Une modification par un dérivé lipidique pourrait également expliquer l'amélioration de la purification en présence de triton X-100, la non détection en masse totale si cela provoque la formation d'agrégats micellaires, l'élution à haute concentrations en imidazole à cause de la polyvalence des agrégats. Une analyse par chromatographie d'exclusion permettrait de mettre en évidence une oligomérisation ou agrégation.

Néanmoins, si le lipide II est un substrat des Ldt, alors une incubation avec la molécule analogue à la Lpp (accepteur) aurait alors dû relâcher ce précurseur et rendre l'enzyme plus légère. Ceci n'a pas été observé mais nous ne sommes peut-être pas dans des conditions où l'enzyme est capable d'effectuer la transpeptidation.

Dans le cas où cette modification serait due au lipide II, il est possible qu'une partie des Ldt exprimées, n'aient pas été purifiées car elles auraient été retenues dans la membrane interne qui a été écartée dans le culot. Il aurait été intéressant d'en faire une analyse par gel SDS-PAGE ou par western-blot afin de savoir si une fraction des Ldt y était piégée.

On pourrait imaginer qu'en conditions naturelles, les Ldt existent principalement sous forme acylées par des substrats pentapeptidiques, puisque les tetra sont absents dans le cytoplasme. Imaginons que le lipide II soit le premier substrat des Ldt. Celles-ci seraient donc associées du côté externe de la membrane interne sous forme d'acyl-enzymes en attente de transpeptidation par une Lpp de passage. L'entraînement de la Lpp vers la membrane externe pourrait apporter la force motrice pour la désacylation des Ldt et le départ du produit de transpeptidation, avant une réacylation par un nouveau lipide II. Ce mécanisme protégerait la cystéine vis-à-vis de l'oxydation car le soufre serait principalement sous forme de thioester, et une localisation à la membrane interne pourrait également aider au contrôle de l'activité.

Différentes perspectives pourraient être poursuivies afin d'investiguer l'origine de l'inactivation des transpeptidases :

- Un marquage radioactif des lipides II permettrait de déterminer si c'est bien celui-ci qui est lié aux L,D-transpeptidases purifiées. La production de lipide II radioactifs via un marquage au carbone 14 a déjà été réalisée avec succès (Brötz et al., 1998; Mahapatra et al., 2005), ou via une chaîne isoprène radioactive produite à partir de mévalonate par la voie métabolique du mévalonate (Cheng et al., 2017; Kim et al., 2016).
- Une chromatographie d'exclusion de taille permettrait de vérifier la présence de micelles (Funasaki, 1993), qui empêcherait la détection MS.
- Une approche à envisager serait une mutagenèse dirigée avec comme cible la cystéine du site actif des L,D-transpeptidases, afin d'analyser un changement dans la migration des protéines.
- Il a été montré qu'une expression de LdtD d'*E. coli* (pontage de type 3-3 du PG) en présence de chlorure de cuivre résulte en une inactivation de LdtD, de plus une diminution de l'ancrage de Lpp dans le PG a aussi été observée (Peters et al., 2018). L'expression de LdtA, B et C en présence de cuivre pourrait être intéressante afin de tester si une inhibition impacte la modification des Ldt observée lors de ce travail.
- Une expression acellulaire des Ldt à l'aide de réactifs de transcription/traduction in vitro pourrait également permettre de produire des enzymes non modifiées. Une expression en levures pourrait également être envisagée.
- Pour finir, il était prévu de faire des essais de cristallisation en partenariat avec le laboratoire de Frédéric Kerff, du centre d'ingénierie des protéines de l'université de Liège. L'acquisition de données cristallographiques, la résolution et l'affinement des structures des 3 Ldt seraient importants pour comprendre la réaction de transpeptidation et mieux saisir la nature des modifications qui ont été observés dans ce travail.
- Si la production d'enzymes libres est réalisée, des réactions de transpeptidation pourraient être envisagées avec les peptides utilisés lors de ce travail, et éventuellement des Lpp, dépourvues d'ancrage lipidique.

V. Conclusion

Au cours de ce travail de recherche, des vecteurs d'expression ont été construits pour l'expression cytoplasmique et périplasmique des trois L,D-transpeptidases responsables de l'ancrage des Lpp dans le PG d'*E. coli*. La stratégie mise en place pour la purification des Ldt a également été réalisée avec succès ; néanmoins nous n'avons pas détecté d'activité avec ces enzymes.

En effet par spectrométrie de masse, les sites actifs des enzymes n'ont pas pu être identifiés et aucun produit de transpeptidation n'a pu être détecté, à partir des substrats moléculaires. Une comparaison avec la protéine de structure connue la plus proche, LdtB de *K. pneumoniae*, montre qu'elle possède également une structure mal résolue du site actif, ce qui suggère qu'un problème similaire aurait pu exister dans les Ldt étudiées lors de ce travail. Une des hypothèses est une modification par les précurseurs du PG, pour un mécanisme de protection des transpeptidases. Néanmoins la nature de la modification n'est pas encore connue et doit être investiguée. Une mutagenèse pourrait aider à mieux concevoir cette dynamique, ou un système via marquage de ces précurseurs pour observer une interaction.

Il reste aussi à déterminer la nature des substrats de la réaction d'ancrage de la Lpp. A cette fin, il faudrait ré-évaluer l'approche d'expression, et envisager un système différent.

En définitive, ces travaux mettent en évidence les défis biochimiques de l'étude *in vitro* des Ldt, tout en fournissant une expérience et des outils qui pourraient contribuer à une meilleure compréhension des L,D-transpeptidases, de leurs mécanismes et de leurs interactions avec leurs précurseurs.

VI. Matériels et méthodes

Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont référencées dans le tableau (Tableau 3). La croissance des souches d'*E. coli* a été effectuée à 37°C sur du milieu Luria-Bertani (LB) ou LB agar. Si nécessaire de la kanamycine à 30 mg/ml a été ajoutée aux milieux.

Souches	Utilisation	Source
<i>E. coli</i> Top10	Modèle ADN, électro-transformation	Invitrogen, Catalog number: C404052
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Expression de protéine, transformation chimique	Invitrogen, Catalog number: C600003

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées

Manipulation d'ADN et de plasmides

Les manipulations d'ADN ont été effectuées suivant les bonnes pratiques de laboratoire (Ausubel, 1987). Les gènes amplifiés et clonés dans les vecteurs (Tableau 5) proviennent de la souche Top10 d'*E. coli* (Tableau 3) Les amorces utilisées dans ce travail ont été commandées chez Eurogentec (Seraing, Belgique). Elles sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Amorce PCR	Sens	Séquence (5' vers 3')	Utilisation
805 SA.pET_vectors	Forward	ATCGGTGATGTCGGCGA TATAG	PCR sur colonie
806 ASt ldtA + SS NdeI fw	Forward	GGTGGTCATATGATGAT GCGTCGTGTAAA	Amplification du gène <i>LdtA</i> +ss, Amplification du gène <i>LdtA</i> , PCR sur colonie
807 ASt ldtA NdeI fw	Forward	GGTGGTCATATGATGGT AACTTATCCATTACCTCC	Amplification du gène <i>LdtA</i>
808 ASt ldtA + SS XhoI rv	Reverse	GGTGGTCTCGAGAAACA TCTGTCTTGAACCAG	Amplification du gène <i>LdtA</i> +ss, Amplification du gène <i>LdtA</i> , PCR sur colonie
809 ASt ldtB NdeI fw	Forward	GGTGGTCATATGATGGT AACTTATCCTCTGCC	Amplification du gène <i>LdtB</i>
810 ASt ldtB + SS NdeI fw	Forward	GTGGTCATATGATGAATA TGAAATTGAAAACATTAT	Amplification du gène <i>LdtB</i> +ss

811 ASt ldtB XhoI rv	Reverse	GGTGGTCTCGAGATTCA GACGAACCGGCATCC	Amplification du gène <i>LdtB</i> +ss, Amplification du gène <i>LdtB</i> , PCR sur colonie
812 ASt ldtC NdeI fw	Forward	GGTGGTCATATGATGAA CACCTGGCCGCT	Amplification du gène <i>LdtC</i>
813 ASt ldtC + SS NdeI fw	Forward	GGTGGTCATATGATGAT CAAAACGCGTTTTTCTCG	Amplification du gène <i>LdtC</i> +ss
813 ASt ldtC + SS NdeI fw	Forward	GGTGGTCATATGATGAT CAAAACGCGTTTTTCTCG	Amplification du gène <i>LdtC</i> +ss
814 ASt ldtC + SS XhoI rv	Reverse	GGTGGTCTCGAGCAGCG TTTGTGGGCTCACTTG	Amplification du gène <i>LdtC</i> +ss, Amplification du gène <i>LdtC</i> , PCR sur colonie
921 GB of pET- 26b+_ldtA+ss fw	Forward	CTGGTTCAAGACAGATG TTTCTCGAGCACCACCA CCACCA	Amplification du plasmide pET-26b+ pour Assemblage Gibson avec le gène <i>LdtA</i> +ss
922 GB of ldtA+ss_pET-	Forward	AAGAAGGAGATATACAT ATGATGATGCGTCGTGT	Amplification du gène <i>LdtA</i> +ss pour Assemblage Gibson
923 GB of ldtA+ss_pET-	Reverse	TGGTGGTGGTGGTGCTC GAGAAACATCTGTCTTG	Amplification du gène <i>LdtA</i> +ss pour Assemblage Gibson
924 GB of ldtB+ss_pET-	Forward	AAGAAGGAGATATACAT ATGATGAATATGAAATTG	Amplification du gène <i>LdtB</i> +ss pour Assemblage Gibson
925 GB of pET- 26b+_ldtB+ss fw	Forward	GGATGCCGGTTCGTCTG AATCTCGAGCACCACCA CCACCA	Amplification du plasmide pET-26b+ pour Assemblage Gibson avec le gène <i>LdtB</i> +ss
931 GB of ldtB+ss_pET-	Reverse	TGGTGGTGGTGGTGCTC GAGATTCAGACGAACCG	Amplification du gène <i>LdtB</i> +ss pour Assemblage Gibson
737 SA.pET22.R	Reverse	CCAGAAAGTGTTACAATT TTTTTTGTCATATGTATAT CTCCTTCTTAAAGTTAAA C	Amplification du plasmide pET-26b+, Amplification du plasmide pET-26b+ pour Assemblage Gibson
458 AS_Q5SDM_D2	Forward	CATTCCTGCAACAGATC CTGCTGCGTC	Amplification du plasmide pET-26b+

Tableau 4 : Amorces PCR utilisées

Vecteur	Gène de L,D- transpeptidase inséré	Origine
pET-LdtA	<i>LdtA</i>	Ce travail
pET-ssLdtA	<i>LdtA+ss</i>	Ce travail
pET-LdtB	<i>LdtB</i>	Ce travail
pET-ssLdtB	<i>LdtB+ss</i>	Ce travail
pET-LdtC	<i>LdtC</i>	Ce travail
pET-ssLdtC	<i>LdtC+ss</i>	Ce travail

Tableau 5 : Plasmides utilisés

Construction de plasmides d'expression

Amplification

L'amplification de fragments d'ADN a été effectuée via la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR), qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN à partir d'une petite quantité de départ. Dans ce cas-ci elle est utilisée afin d'obtenir une grande quantité des gènes d'intérêts afin de les insérer dans les plasmides par après.

Dans un tube PCR stérile ont été ajoutés : 2.5 µL des amorces fw à 10 nM et 2.5 µL des amorces rv à 10 nM, 10 µL de tampon Q5 10X (New England Biolabs) et 2 unités (0.5 µL) de Polymérase Q5 (New England Biolabs), 0,7 µL de dNTP à 20mM, 1µL (20-100 ng) d'ADN matrice et 33µL d'eau milliQ, pour un volume total de 50µL. Ensuite, chaque échantillon a été soumis au profil de température suivant dans un thermocycleur (Tableau 6).

Etape	Temps	Température (°C)
Dénaturation initiale	30 sec	98
<u>25-30 cycles d'amplification</u>		
Dénaturation	20 sec	98
Hybridation	30 sec	59-71*
Extension	1min/kb	72
Extension finale	5 min	72

Tableau 6 : Programme PCR utilisé

*Ces réactions se sont déroulées avec une étape d'hybridation à 61°, 59°, 69°, 62°, 69°, 68°, 60°, 70°, 61°, 70°, 60°C (*LdtA*, *LdtA+ss*, *LdtB*, *LdtB+ss*, *LdtC* et *LdtC+ss*, *pET26_b+_GB*, *pET26_b+_GB.A+ss*, *LdtB+ss_GB*, *pET26_b+_GB.B+ss*, respectivement)

Restriction

Dans un tube PCR stérile ont été ajoutés : 5 µL de tampon CutSmart 10X (New England Biolabs), 20 unités (1µL) d'enzymes de restriction HF (New England Biolabs) (Tableau 7), et 0.5-1µg d'ADN, et de l'eau milliQ, pour un volume total de 50 µL. Ensuite, les réactions de restriction se sont déroulées durant 1h-2h à 37°C, suivies d'une inactivation durant 10 min à 65°C.

Enzyme de restriction	Site de clivage	Tampon utilisé	T° d'incubation (°C)
NdeI	CA/TATG	Cutsmart	37°C
XhoI	C/TCGAG	Cutsmart	37°C

Tableau 7 : Enzymes de restriction utilisées

Ligation

Dans un tube PCR stérile ont été ajoutés : l'amplicon et le vecteur restreint dans une proportion de 3 :1 en moles, 2 µL de tampon T4 ADN ligase 10X (New England Biolabs), 20 unités (1 µL) T4 ADN ligase (New England Biolabs) et de l'eau milliQ pour un volume total de 20 µL. Ensuite, la réaction de ligation s'est déroulée durant une nuit à 16°C,

Assemblage Gibson

Dans un tube PCR stérile contenant 15 µL de Gibson assembly mix (100mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 0.2mM de chacun des 4 dNTPs, 1mM NAD⁺, 15%(masse/volume) PEG-8000, T5 exonuclease (2 U/mL), Phusion DNA polymerase (33 U/ mL), Taq DNA ligase (1666 U/mL)), ont été ajoutés : l'amplicon et le vecteur dans une proportion de 5 :1 en quantité de matière (225-275 pmol : 45-55 pmol). Ensuite, la jonction des fragments s'est déroulée pendant 15 minutes à 50°C.

PCR sur colonies

Le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR), permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN à partir d'une petite quantité de départ. Dans ce cas-ci elle est utilisée afin d'amplifier une zone spécifique d'ADN dans le plasmide ce qui permet d'ensuite déterminer via électrophorèse sur gel d'agarose si le plasmide d'intérêt a bien été intégré par la colonie.

Une pointe de pipette stérile a été plongée dans une colonie bactérienne isolée puis placée dans un tube PCR stérile contenant 50µL de master mix (1.5 µL d'amorce spécifique directe à 10nM, 1.5 µL d'amorce spécifique inverse à 10nM, 10 µL de tampon GoTaq 10X (Promega), 4 µL de MgCl₂ à 25nM, 1.25 unités (0.25 µL) d'ADN polymérase GoTaq (Promega), 0.7 µL de dNTPs à 20mM et 32µL d'eau milliQ. Ensuite chaque échantillon a été soumis au profil de température suivant dans un thermocycleur (Tableau 8).

Etape	Temps	Température (°C)
Dénaturation initiale	4 min	95
<u>25-30 cycles d'amplification</u>		
Dénaturation	30 sec	95
Hybridation	30 sec	54
Extension	1min/kb	72
Extension finale	7 min	72

Tableau 8 : Programme PCR utilisé

Purification d'ADN

La purification d'ADN a été effectuée à l'aide du kit Monarch « PCR & DNA cleanup » (New England Biolabs) en suivant le manuel d'utilisation fourni par le fabricant. Le spectre d'absorbance du filtrat a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop™) afin de déterminer la quantité d'ADN purifiée (en ng/μl) ainsi que la pureté via le rapport d'absorption à 260nm/280nm, idéalement de 1.8.

Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique a été effectuée à l'aide du kit « Plasmid Purification » (New England Biolabs) en suivant le manuel d'utilisation fourni par le fabricant. Le spectre d'absorbance du filtrat a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop™) afin de déterminer la quantité d'ADN purifiée (en ng/μl) ainsi que la pureté grâce au rapport 260nm/280 nm, idéalement de 1.8.

Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Le principe de cette technique consiste à faire migrer dans un gel d'agarose (0,8%), via un champ électrique, des fragments d'ADN chargé négativement migrant vers la borne électrique chargé positivement. La vitesse de migration d'un fragment dans le gel est d'autant plus rapide que le fragment est de petite taille.

Dans un support, accompagné d'un peigne, un gel d'agarose d'une épaisseur d'1 cm a été coulé et refroidi à température ambiante pendant 25 min afin de polymériser. Ensuite le gel a été introduit dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE. Les puits formés dans le gel grâce au peigne sont remplis soit de 5μL d'échantillons mélangés à une goutte de purple dye (New England Biolabs), afin d'observer un front de migration. Soit de 5μL marqueur de poids moléculaire (SmartLadder, Eurogentec). La migration est effectuée à 120V-150V à 400mA en fonction de la taille du gel (plus élevé pour les grands gels) pour une durée de 20-40 min en fonction du front de migration et de la taille attendue des fragments d'ADN. Lorsque la migration est terminée le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (1.3 μg/mL), un agent intercalant de l'ADN, pendant 20 minutes afin de rendre les bases d'ADN fluorescentes. Finalement au contact de lumière ultraviolette la visualisation est possible.

Electroporation

L'électroporation est une technique dans laquelle un champ électrique est appliqué aux cellules afin d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui permet d'introduire de l'ADN dans la cellule bactérienne, dans ce cas-ci les plasmides d'intérêt.

Un aliquot 50µL de cellules d'*E. coli* électro-compétentes (Invitrogen) a été mélangé avec 2 µL de plasmide purifié puis placé dans une cuvette d'électroporation glacée (espace de 2 mm). Les cellules ont été soumises à un choc de 2.5 kV d'une capacitance de 25µF à l'aide d'un pulseur (BIOrad gene pulser Xcell), une constante de temps d'approximativement 4 ms est attendue. Un millilitre de milieu LB préchauffé a alors été immédiatement ajouté aux cellules et transféré dans un tube snapcap. Ensuite les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 1 h. Ensuite, les bactéries ont été étalées sur la plaque LB avec de la kanamycine comme marqueur de sélection, à raison de 40 µL et 80 µL et incubées pendant une nuit à 37 °C.

Transformation chimique

La transformation chimique est une technique lors de laquelle une augmentation soudaine de la température crée des pores dans la membrane plasmique de la bactérie et d'introduire de l'ADN dans la cellule bactérienne, dans ce cas-ci les plasmides d'intérêt.

Un aliquot de 50 µL d'*E. coli* BL21 compétents au choc thermique (Invitrogen) a été mélangés avec 2 µL de plasmide purifié (100-150ng). Après 20-30 minutes d'incubation sur glace, le tube a été placé dans un bain-marie préchauffé à 42 °C pendant 120 secondes sans avoir déplacé le tube. Afin de refroidir l'échantillon, le tube a alors immédiatement été placé sur de la glace pendant 5 minutes minimum. Ensuite, 900 µl de milieu LB ont été ajoutés au mélange de transformation et les bactéries ont été incubées sous agitation pendant 1 heure à 37 °C. Ensuite, les bactéries ont été étalées sur la plaque LB avec l'antibiotique approprié, à raison de 20 µL et 200 µL et incubées pendant une nuit à 37 °C.

Purification des L,D-transpeptidases

Vecteur d'expression

Les différentes LD-transpeptidases ont été produites à partir de la souche BL21(DE3) d'*E. coli*. La souche contient le prophage lambda DE3 qui porte le gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle d'un promoteur lacUV5, permettant d'induire l'expression de l'ARN polymérase T7 par addition d'IPTG (Studier & Moffatt, 1986). Ces souches BL21 contiennent un vecteur d'expression composé d'un promoteur pT7 en aval duquel ont été insérées les séquences encodant les L,D-transpeptidases en fusion traductionnelle avec une étiquette 6xHis-tag. Ils contiennent aussi un gène de résistance à la kanamycine.

Cinq à dix µL des différentes souches BL21(DE3) d'*E. coli* contenant les vecteurs d'expression a été ajouté dans un volume de 2-10 mL de milieu LB avec 0.1% en volume de kanamycine. Cette préculture a été incubée « overnight » à 37°C.

Ensuite la préculture a été utilisée pour inoculer une culture de LB de 10-1000mL, contenant 0.1% en volume de kanamycine et 1% en volume de préculture. La culture a été incubée à 37°C avec une agitation de 100-130rpm et sa densité optique a été évaluée régulièrement à partir d'1ml de culture. Lorsque la D.O. ($\lambda = 600$ nm) a atteint entre 0.4 et 0.7, la culture a été induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 0.1mM. Après 3h30-4h d'incubation à 25-37°C la culture a été arrêtée et la culture a été centrifugée durant 10 minutes à 4°C, 4000rpm. Le culot peut être conservé à -80°C dans son tube de centrifugation.

Expression cytoplasmique : lyse cellulaire

Si nécessaire, le culot a été dégelé sur glace et resuspendu dans 0.5 ou 2.5 mL de PBS en fonction du volume de culture initiale. 0,5 ml de cette suspension ont été distribués dans des tubes fastprep contenant 0.5 mL de billes en verres 0.17-0.18mm (Sartorius) dans une solution de PBS. La lyse a été réalisée via une agitation à 6M/s pendant 3x20 s. Le surnageant a été transféré dans des tubes Eppendorf et centrifugé à vitesse maximale à 40°C pendant 10 minutes. Ensuite le surnageant a été récupéré et, si nécessaire, congelé à -20°C.

Extraction périplasmique : extraction

Si nécessaire, le culot a été dégelé et 10mL de culture ont été resuspendu dans 330 µL d'une solution de sucrose et 33 µL d'EDTA à 1M. Ensuite les cellules ont été incubées à température ambiante pendant 10 minutes. Après les cellules ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant a été écarté. Les cellules ont été resuspendues dans 500µL de MgSO₄ à 5mM et incubées pendant 10 minutes à 4°C. Ensuite les cellules ont été centrifugées à 10000 g pendant 10 minutes, le surnageant a été récupéré comme extrait périplasmique et si nécessaire congelé à -20°C.

Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Dans un tube PCR stérile les différents échantillons ont été suspendus dans un sample buffer (50 mM Tris base, 10% glycérol, 0.01 % bleu de bromophénol, 2% mercaptoéthanol, 2% SDS et H₂O à pH 6.8) et chauffés durant 10 minutes à 95°C. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel commercial (Eurogentec) 4-20% ou 8% immergé dans le tampon de migration MOPS, et soumis à un courant de 120-130V durant 50-120 minutes. Les gels ont ensuite été révélés par immersion dans l'Instant Blue (Westburg) durant 30 minutes, suivi d'un lavage à l'H₂O.

Western Blot

Après une migration sur gel SDS-PAGE, les gels n'ont pas été révélés mais transférés sur membrane Mini Nitrocellulose Transfer (Biorad), via le système Trans-Blot Turbo (Biorad). Ensuite la membrane a été immergée dans une solution de blocage (PBS pH 7.2, 0.2 tween, 5% de lait en poudre (Régilait 0%) à température ambiante sous agitation afin d'empêcher la liaison d'anticorps non spécifique. Après la membrane a été incubée dans une solution de blocage contenant 5mg/mL d'anticorps primaire (anti-His de lapin) pendant 2h sous agitation à température ambiante. Ensuite la membrane a été rincée 3 fois pendant 10 minutes à température ambiante afin de retirer tout anticorps primaire non lié. 10µL d'anticorps secondaire (Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-lapin IgG (H+L)), Jackson ImmunoResearch, UK) ont été ajoutés dans une solution de blocage et incubés pendant 1h à température ambiante sous agitation. Ensuite la membrane a été rincée 2 fois avec la solution de blocage pendant 10 min sous agitation. Un mélange de substrat A et substrat B (Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermofisher) avec un ratio de 40 :1 comme suggéré par le fournisseur, a été préparé et ajouté sur la membrane à raison de 0.125 mL par cm² de membrane et incubé pendant 2 min. La membrane a ensuite été analysée par luminescence dans l'Amersham Imager 600 (Cytiva).

Purification

Le principe de la purification est basé sur l'affinité de l'étiquette 6xHis-tag pour une colonne de nickel. Cette affinité permet ensuite de déplacer les protéines ayant une affinité plus faible via un lavage avec des faibles concentrations d'imidazole. Ensuite la protéine peut être collectée via une plus grande concentration en imidazole.

Le protocole a été réalisé à 4°C. Dans une colonne de purification de 10mL, 4 mL de résine probond (Invitrogen) ont été ajoutées. 2x4 mL de tampon HEPES 20mM ont été écoulés à travers la colonne, ensuite le lysat cellulaire a été ajouté dans la colonne, mélangé et incubé durant 1h. Après le lysat cellulaire a été écoulé et récupéré, la colonne a été lavée par 5x4 mL de tampons HEPES, suivi de 3x4 mL de tampons HEPES avec une concentration en imidazole de 25mM, suivi de 3x4 mL de tampons HEPES avec une concentration en imidazole de 50mM, tous les éluats ont été écartés. Ensuite des volumes d'1 mL de tampons

HEPES contenant des concentrations croissantes en imidazole (100-300mM) ont été successivement passés sur la colonne, suivi de 3x1 mL de tampons HEPES contenant 500mM d'imidazole, et récupéré comme produit de purification. Finalement la colonne a été lavée avec une solution d'éthanol à 50% et stockée à 4°C. Les produits de purifications ont été divisés en aliquots de 100µL utilisés directement ou stockés à -80°C.

Caractérisation de l'activité des L,D-transpeptidases

Détermination des cystéines actives par détection de thiols

Le réactif d'Ellman ou DNTB est utilisé pour quantifier la concentration en thiols libres dans un échantillon. Les thiols libres en solution réagissent avec ce composé, coupant sa liaison disulfure pour donner le 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB-), qui absorbe à 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Au préalable la concentration de DTT a été diluée par échange de tampons via des tubes de 0.5mL (Amicon® Ultra-0.5) d'une taille d'exclusion de 10kDa. Les échantillons ont été centrifugés à 14000 g pendant des cycles de 10minutes à 4°C jusqu'à atteindre un facteur de dilution d'au moins 1000. Puis dans les puits d'une plaque de microtitration ont été ajoutés 10-90µL d'enzymes et du DNTB à 0.5, 1, 2 ou 5mM dans une solution d'HEPES à 50mM et pH 8, pour un volume total de 100µL. Ensuite l'absorbance est mesurée à 412nm.

Réaction de transpeptidation

Au préalable la concentration de DTT a été diluée par échange de tampons via des tubes de 0.5mL (Amicon® Ultra-0.5) d'une taille d'exclusion de 10kDa. Les échantillons ont été centrifugés à 14000 g pendant des cycles de 10minutes à 4°C jusqu'à atteindre un facteur de dilution d'au moins 1000. Ensuite 16µL d'enzymes (0.6 mg/mL) ont été ajoutés à 2µL de peptide donneur à 5mM, ainsi que 2 µL de peptide accepteur à 5mM, en solution aqueuse et incubés pendant 1h à température ambiante.

Solutions utilisées

Solution	Composition
Milieu de culture LB	Tryptone 10g/L, extraits de levure 5g/L,
Milieu de culture LB-agar	Tryptone 10g/L, extraits de levure 5g/L,
Kanamycine	Kanamycine 30µg/mL
DTT	DTT 1M
EDTA	EDTA 5M
PBS pH 7.5	NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na ₂ HPO ₄ 10mM, KH ₂ PO ₄ 1.8 mM
MOPS 10X	Tris base 60.6g/L, MOPS 104.6g/L, EDTA 3g/L, SDS 10g/L
Tampon TAE 1x	Tris 40mM, acide acétique 20mM, EDTA 1mM à pH 8.5
Tampon HEPES	HEPES 20-50mM pH 7.2
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside 1M

Tableau 9 : Solutions utilisées

VII. Bibliographie

- Ausubel, F. M. (1987). *Current protocols in molecular biology*. Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300440258>
- Baldin, S. M., Shcherbakova, T. A., & Švedas, V. K. (2019). Isolation, Purification and Characterization of L,D-transpeptidase 2 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Naturae*, 11(1), 23–28.
- Bernal-Cabas, M., Ayala, J. A., & Raivio, T. L. (2015). The Cpx Envelope Stress Response Modifies Peptidoglycan Cross-Linking via the L,d-Transpeptidase LdtD and the Novel Protein YgaU. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 603–614. <https://doi.org/10.1128/JB.02449-14>
- Biarrotte-Sorin, S., Hugonnet, J.-E., Delfosse, V., Mainardi, J.-L., Gutmann, L., Arthur, M., & Mayer, C. (2006). Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase. *Journal of Molecular Biology*, 359(3), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.014>
- Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 415(3), 335–377. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(75\)90013-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(75)90013-1)
- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P. E., & Sahl, H.-G. (1998). The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 154–160. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.154>
- Cava, F., de Pedro, M. A., Lam, H., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2011). Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *The EMBO Journal*, 30(16), 3442–3453. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.246>
- Caveney, N. A., Caballero, G., Voedts, H., Niciforovic, A., Worrall, L. J., Vuckovic, M., Fonvielle, M., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., & Strynadka, N. C. J. (2019). Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 10(1), 1849. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09507-0>
- Cheng, T., Liu, H., Zou, H., Chen, N., Shi, M., Xie, C., Zhao, G., & Xian, M. (2017). Enzymatic process optimization for the in vitro production of isoprene from mevalonate. *Microbial Cell Factories*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0622-4>
- Choi, D. S., Yamada, H., Mizuno, T., & Mizushima, S. (1986). Trimeric structure and localization of the major lipoprotein in the cell surface of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(19), 8953–8957.

- Cowles, C. E., Li, Y., Semmelhack, M. F., Cristea, I. M., & Silhavy, T. J. (2011). The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 79(5), 1168–1181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07539.x>
- Depuydt, M., Leonard, S. E., Vertommen, D., Denoncin, K., Morsomme, P., Wahni, K., Messens, J., Carroll, K. S., & Collet, J.-F. (2009). A Periplasmic Reducing System Protects Single Cysteine Residues from Oxidation. *Science*, 326(5956), 1109–1111. <https://doi.org/10.1126/science.1179557>
- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., & Arthur, M. (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 307–320. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00102.x>
- Dubée, V., Arthur, M., Fief, H., Triboulet, S., Mainardi, J.-L., Gutmann, L., Sollogoub, M., Rice, L. B., Ethève-Quelquejeu, M., & Hugonnet, J.-E. (2012). Kinetic Analysis of *Enterococcus faecium* L,d-Transpeptidase Inactivation by Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3409–3412. <https://doi.org/10.1128/AAC.06398-11>
- Funasaki, N. (1993). Gel filtration chromatographic study on the self-association of surfactants and related compounds. *Advances in Colloid and Interface Science*, 43(1), 87–136. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(93\)80006-w](https://doi.org/10.1016/0001-8686(93)80006-w)
- Geiger, T., Lara-Tejero, M., Xiong, Y., & Galán, J. E. (2020). Mechanisms of substrate recognition by a typhoid toxin secretion-associated muramidase. *ELife*, 9, e53473. <https://doi.org/10.7554/eLife.53473>
- Geiger, T., Pazos, M., Lara-Tejero, M., Vollmer, W., & Galán, J. E. (2018). Peptidoglycan editing by a specific Ld-transpeptidase controls the muramidase-dependent secretion of typhoid toxin. *Nature Microbiology*, 3(11), 1243–1254. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0248-x>
- Ghuysen, J. M. (1968). Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriological Reviews*, 32(4 Pt 2), 425–464.
- Glauner, B., Höltje, J. V., & Schwarz, U. (1988). The composition of the murein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(21), 10088–10095.
- Goffin, C., & Ghuysen, J.-M. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1079–1093.
- Hayashi, S., & Wu, H. C. (1990). Lipoproteins in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 22(3), 451–471. <https://doi.org/10.1007/BF00763177>
- Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y., & Yasuda, S. (1977). On the process of cellular division in *Escherichia coli*: A mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(4), 1417–1420.

- Höltje, J.-V. (1998). Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 181–203.
- Horcajo, P., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2012). Peptidoglycan Plasticity in Bacteria: Stress-Induced Peptidoglycan Editing by Noncanonical D-Amino Acids. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 306–313. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0009>
- Hugonnet, J.-E., Mengin-Lecreulx, D., Monton, A., den Blaauwen, T., Carbonnelle, E., Veckerlé, C., Brun, Y., V., van Nieuwenhze, M., Bouchier, C., Tu, K., Rice, L. B., & Arthur, M. (2016). Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *eLife*, 5, e19469. <https://doi.org/10.7554/eLife.19469>
- Jacobs, C., Frère, J.-M., & Normark, S. (1997). Cytosolic Intermediates for Cell Wall Biosynthesis and Degradation Control Inducible β -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Cell*, 88(6), 823–832. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81928-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81928-5)
- Jean, N. L. (2015). *Etudes par RMN de mécanismes de régulation de la biosynthèse de la paroi bactérienne*. UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES.
- Kim, J.-H., Wang, C., Jang, H.-J., Cha, M.-S., Park, J.-E., Jo, S.-Y., Choi, E.-S., & Kim, S.-W. (2016). Isoprene production by *Escherichia coli* through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts. *Microbial Cell Factories*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0612-6>
- Kobayashi, Y., Fling, M., & Fox, S. W. (1948). Antipodal specificity in the inhibition of growth of *Escherichia coli* by amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 174(2), 391–398.
- Kuruma, Y., & Ueda, T. (2015). The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. *Nature Protocols*, 10(9), 1328–1344. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.082>
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L., & Mainardi, J.-L. (2008). The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by L,d-Transpeptidation. *Journal of Bacteriology*, 190(12), 4360–4366. <https://doi.org/10.1128/JB.00239-08>
- Lecoq, L. (2012). *Etudes par RMN des L,D-transpeptidases bactériennes: Structure, dynamique et compréhension de leur inhibition par les beta-lactames*. UNIVERSITE DE GRENOBLE.
- Lovering, A. L., Castro, L. H. de, Lim, D., & Strynadka, N. C. J. (2007). Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis. *Science*, 315(5817), 1402–1405. <https://doi.org/10.1126/science.1136611>
- Magnet, S., Bellais, S., Dubost, L., Fourgeaud, M., Mainardi, J.-L., Petit-Frère, S., Marie, A., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M., & Gutmann, L. (2007). Identification of the L,d-Transpeptidases Responsible for

Attachment of the Braun Lipoprotein to Escherichia coli Peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3927–3931. <https://doi.org/10.1128/JB.00084-07>

Magnet, S., Dubost, L., Marie, A., Arthur, M., & Gutmann, L. (2008). Identification of the L,d-Transpeptidases for Peptidoglycan Cross-Linking in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4782–4785. <https://doi.org/10.1128/JB.00025-08>

Mahapatra, S., Yagi, T., Belisle, J. T., Espinosa, B. J., Hill, P. J., McNeil, M. R., Brennan, P. J., & Crick, D. C. (2005). Mycobacterial Lipid II Is Composed of a Complex Mixture of Modified Muramyl and Peptide Moieties Linked to Decaprenyl Phosphate. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2747–2757. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2747-2757.2005>

Mainardi, J.-L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Brouard, J.-P., Ouazzani, J., Rice, L. B., Gutmann, L., & Arthur, M. (2005). A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38146–38152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507384200>

Mainardi, J.-L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., Frehel, C., Arthur, M., Van Heijenoort, J., & Gutmann, L. (2002). Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in Enterococcus faecium. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 35801–35807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204319200>

Mathélié-Guinlet, M., Asmar, A. T., Collet, J.-F., & Dufrêne, Y. F. (2020). Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the E. coli cell envelope. *Nature Communications*, 11(1), 1789. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15489-1>

More, N., Martorana, A. M., Biboy, J., Otten, C., Winkle, M., Serrano, C. K. G., Montón Silva, A., Atkinson, L., Yau, H., Breukink, E., den Blaauwen, T., Vollmer, W., & Polissi, A. (2019). Peptidoglycan Remodeling Enables Escherichia coli To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect. *MBio*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02729-18>

Pazos, M., Peters, K., & Vollmer, W. (2017). Robust peptidoglycan growth by dynamic and variable multi-protein complexes. *Current Opinion in Microbiology*, 36, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.01.006>

Peters, K., Pazos, M., Edoo, Z., Hugonnet, J.-E., Martorana, A. M., Polissi, A., VanNieuwenhze, M. S., Arthur, M., & Vollmer, W. (2018). Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β -lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10786–10791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809285115>

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>

- Pidgeon, S. E., Apostolos, A. J., Nelson, J. M., Shaku, M., Rimal, B., Islam, M. N., Crick, D. C., Kim, S. J., Pavelka, M. S., Kana, B. D., & Pires, M. M. (2019). L,D-Transpeptidase Specific Probe Reveals Spatial Activity of Peptidoglycan Cross-Linking. *ACS Chemical Biology*, acschembio.9b00427. <https://doi.org/10.1021/acschembio.9b00427>
- Pisabarro, A. G., de Pedro, M. A., & Vázquez, D. (1985). Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *Journal of Bacteriology*, 161(1), 238–242.
- Quintela, J., Caparrós, M., & de Pedro, M. A. (1995). Variability of peptidoglycan structural parameters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 125(1), 95–100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07341.x>
- Raymond, J. B., Mahapatra, S., Crick, D. C., & Pavelka, M. S. (2005). Identification of the *namH* gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 326–333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411006200>
- Salton, M. R. J., Horne, R. W., & Cosslett, V. E. (1951). Electron microscopy of bacteria treated with cetyltrimethylammonium bromide. *Journal of General Microbiology*, 5(2), 405–407. <https://doi.org/10.1099/00221287-5-2-405>
- Sanders, A. N., & Pavelka, M. S. (2013). Phenotypic analysis of *Escherichia coli* mutants lacking l,d-transpeptidases. *Microbiology*, 159(Pt_9), 1842–1852. <https://doi.org/10.1099/mic.0.069211-0>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Scheffers, D.-J., & Tol, M. B. (2015). LipidII: Just Another Brick in the Wall? *PLoS Pathogens*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005213>
- Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 407–477.
- Schwarz, U., Asmus, A., & Frank, H. (1969). Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 41(3), 419–429. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90285-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90285-x)
- Sechi, S., & Chait, B. T. (1998). Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification. *Analytical Chemistry*, 70(24), 5150–5158. <https://doi.org/10.1021/ac9806005>

- Sham, L.-T., Butler, E. K., Lebar, M. D., Kahne, D., Bernhardt, T. G., & Ruiz, N. (2014). MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*, 345(6193), 220–222. <https://doi.org/10.1126/science.1254522>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Sung, M.-T., Lai, Y.-T., Huang, C.-Y., Chou, L.-Y., Shih, H.-W., Cheng, W.-C., Wong, C.-H., & Ma, C. (2009). Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 8824–8829. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904030106>
- Tsuruoka, T., Tamura, A., Miyata, A., Takei, T., Iwamatsu, K., Inouye, S., & Matsushashi, M. (1984). Penicillin-insensitive incorporation of D-amino acids into cell wall peptidoglycan influences the amount of bound lipoprotein in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 160(3), 889–894.
- van Heijenoort, J. (2007). Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(4), 620–635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-07>
- Van Laar, T. A., Chen, T., You, T., & Leung, K. P. (2015). Sublethal Concentrations of Carbapenems Alter Cell Morphology and Genomic Expression of *Klebsiella pneumoniae* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1707–1717. <https://doi.org/10.1128/AAC.04581-14>
- Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 287–306. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00088.x>
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 259–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>
- Wang, Y., Lazor, K. M., DeMeester, K. E., Liang, H., Heiss, T. K., & Grimes, C. L. (2017). Postsynthetic Modification of Bacterial Peptidoglycan Using Bioorthogonal N-Acetylcysteamine Analogs and Peptidoglycan O-Acetyltransferase B. *Journal of the American Chemical Society*, 139(39), 13596–13599. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06820>
- Weidel, W., FRANK, H., & MARTIN, H. H. (1960). The Rigid Layer of the Cell Wall of *Escherichia coli* Strain B. *Microbiology*, 22(1), 158–166. <https://doi.org/10.1099/00221287-22-1-158>
- Wietzerbin, J., Das, B. C., Petit, J. F., Lederer, E., Leyh-Bouille, M., & Ghuysen, J. M. (1974). Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid

interpeptide linkages in the peptidoglycan of Mycobacteria. *Biochemistry*, 13(17), 3471–3476. <https://doi.org/10.1021/bi00714a008>

Yokota, N., Kuroda, T., Matsuyama, S., & Tokuda, H. (1999). Characterization of the LolA-LolB System as the General Lipoprotein Localization Mechanism of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30995–30999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30995>

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 7(1–2), 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

VIII. Figures supplémentaires

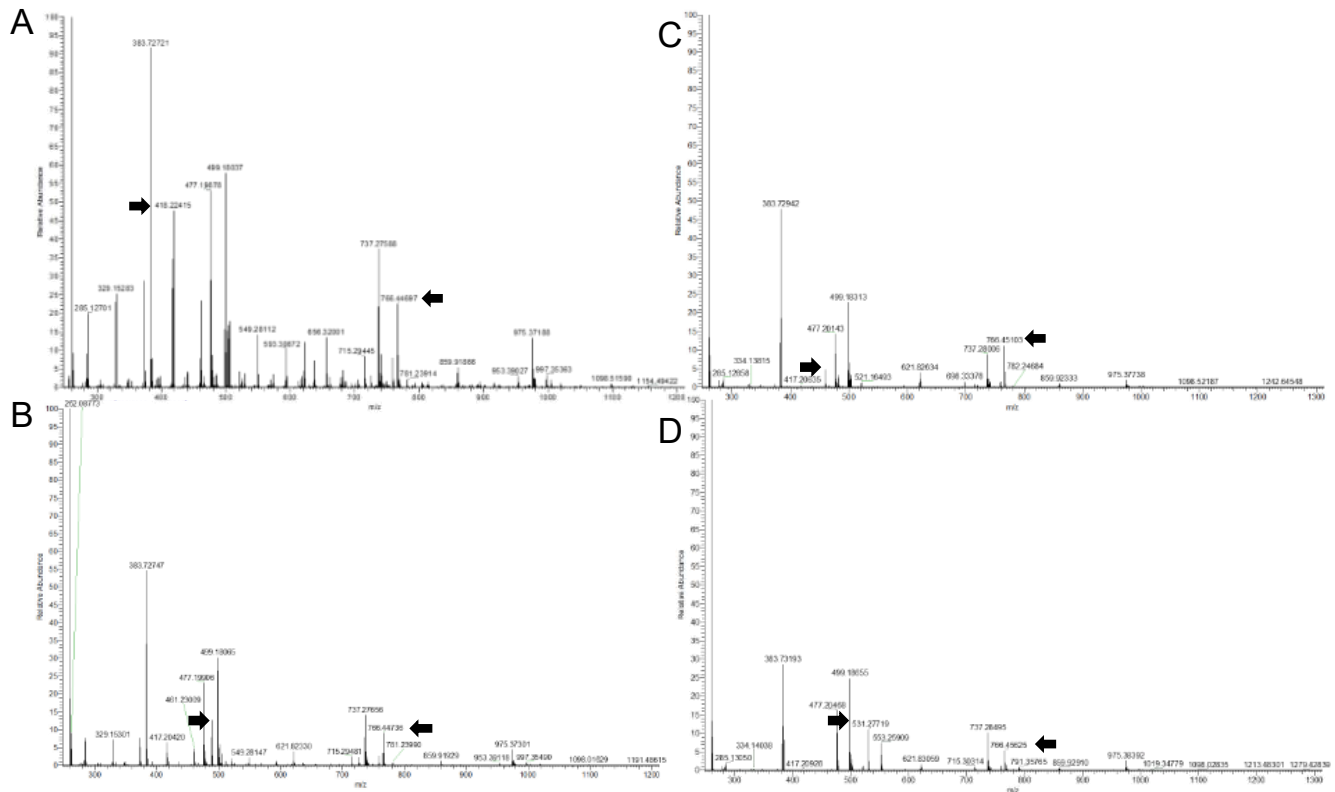


Figure supplémentaire 1. Spectre MS des réactions de transpeptidation

A) Spectre MS de la réaction A (Figure15.A) le peptide AEKA (pic monoïtosotopique m/z à 418.22) et le peptide ATKYRK (pic monoïtosotopique m/z à 766.45) sont visibles. B) Spectre MS de la réaction B (Figure15.B) le peptide AEKAA (pic monoïtosotopique m/z à 488.26) et le peptide ATKYRK (pic monoïtosotopique m/z à 766.45) sont visibles. C) Spectre MS de la réaction C (Figure15.C) le peptide AEK(Ac)A (pic monoïtosotopique m/z à 460.23) et le peptide ATKYRK (pic monoïtosotopique m/z à 766.45) sont visibles. D) Spectre MS de la réaction D (Figure15.D) le peptide AEK(Ac)AA (pic monoïtosotopique m/z à 531.27) et le peptide ATKYRK (pic monoïtosotopique m/z à 766.45) sont visibles.

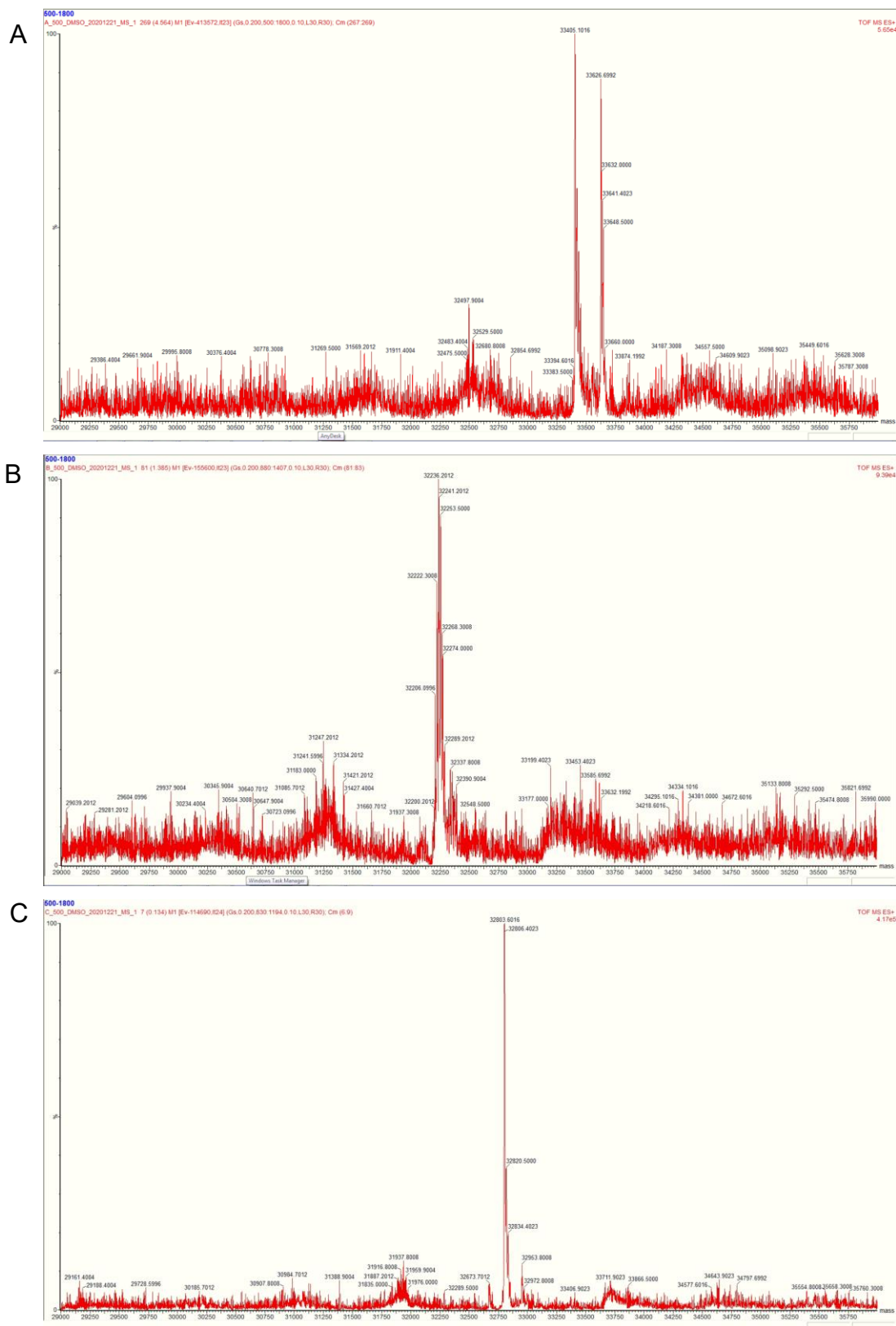


Figure supplémentaire 2. Spectre MS des masses totale de protéine.

A) Spectre MS déconvolué de LdtA, taille théorique de 33405.18 Da. B) Spectre MS déconvolué de LdtB, taille théorique de 32190.22 Da. C) Spectre MS déconvolué de LdtC, taille théorique de 32819.99 Da.

