

I. Conclusions

Nous avons construit une banque de sites allostériques dans la β -lactamase TEM-1. Nous pouvons également parler de banque d'épitopes discontinus si l'enzyme est considérée comme une protéine liante. Ces enzymes chimériques contiennent trois boucles dégénérées, proches les unes des autres. La dégénérescence dans la boucle 1, située près du site actif, a été réalisée en remplaçant aléatoirement les trois acides aminés Gly₂₃₈-Glu₂₄₀-Arg₂₄₁. Dans la boucle 2, des peptides aléatoires de trois tailles différentes (cinq, six ou sept résidus) ont été insérés entre deux cystéines et dans la boucle 3, une insertion de six résidus aléatoires a été réalisée.

La construction de la banque a permis de mettre en évidence que la présence de deux résidus cystéines est nécessaire de part et d'autre de l'insert dans la boucle 2 pour maintenir une activité enzymatique importante. D'autre part, la boucle 1 ne semble pas tolérer une insertion peptidique. Le choix d'effectuer l'ingénierie en utilisant comme protéine de départ une enzyme dont les mutants actifs peuvent être sélectionnés *in vivo* par la résistance aux antibiotiques nous a permis d'obtenir des banques de qualité contrôlée. En effet, la sélection pour activité assure que tous les mutants d'insertions retenus sont correctement reployés. Un second élément qui a rendu possible la création d'une banque combinatoire de grande taille et de haute qualité est la construction hiérarchisée dans laquelle les banques primaires actives sont combinées pour donner, avec un assez bon rendement, une banque secondaire active.

Cette banque a ensuite été soumise à une sélection afin d'isoler les clones ayant de l'affinité pour un ion métallique, le Ni(II) et pour deux petites molécules, la kanamycine et la sulfanilamide. En ce qui concerne les clones sélectionnés sur le nickel, tous les clones testés montrent une modulation de l'activité en présence du métal, que ce soit une activation ou une inhibition de celle-ci. La meilleure affinité a été obtenue pour le clone Ni-5-#12 avec une constante de dissociation de 7.10^{-5} M. Parmi les clones issus de la sélection sur la kanamycine, nous avons trouvé un mutant dont l'activité catalytique est accrue en présence du ligand. Sa constante de dissociation est de $6,6.10^{-4}$ M. Nous pouvons donc affirmer qu'un enrichissement a bien eu lieu lors de la sélection pour affinité, même si cet enrichissement n'a pas pu être détecté par l'évolution du rapport entre les phages élus et les phages engagés lors de la sélection. Ceci est très probablement dû à la faible affinité des clones sélectionnés pour le ligand. L'utilisation des enzymes comme ossature protéique est donc un avantage car l'affinité a pu être détectée grâce à l'effet du ligand sur l'activité enzymatique. La banque construite dans ce travail contient donc des sites potentiels de faible affinité pour des petites molécules et, comme nous le verrons dans

les perspectives, la maturation d'affinité devrait permettre de générer des mutants de plus grande affinité.

Ces résultats nous laissent espérer que la banque construite contient potentiellement des clones ayant la capacité de lier un certain nombre de cibles différentes. Si c'est le cas, cette banque possède des avantages sur les anticorps conjugués habituellement utilisés en immuno-détection, car la fonction de reconnaissance et la fonction enzymatique sont portées par la même molécule et les clones d'intérêt pourrait donc être produits facilement et à plus faible coût.

De plus, la modulation d'activité permet en principe de détecter la présence du ligand cible en phase homogène. Cependant, dans les clones sélectionnés, les effets de modulation d'activité restent relativement modestes par rapport à ce qui est observé dans la régulation allostérique naturelle. Dans celle-ci, en outre, les sites allostériques sont situés à une bien plus grande distance par rapport au site actif que dans les enzymes que nous avons construites.

II. Perspectives

1. Perspectives à court terme

Dans un premier temps, il serait indispensable de tester la spécificité des clones sélectionnés. L'activité des clones Ni-5 devrait être mesurée en présence de différents ions métalliques. Pour le clone activé en présence de kanamycine A, d'autres aminoglycosides devraient être testés, ainsi que les kanamycines B et C.

Nous pourrions aussi recommencer les sélections avec la sulfanilamide biotinylée, en adaptant le protocole comme cela a été fait dans le cas de la kanamycine.

D'autre part, les meilleurs clones pourraient subir une maturation d'affinité. Cette méthode, semblable à la réponse immunitaire secondaire, consiste à soumettre le gène de la β -lactamase des mutants de première génération à une PCR mutagénisante. La banque générée est ensuite soumise à une nouvelle sélection pour affinité. De multiples cycles de mutation et sélection peuvent être réalisés afin de produire des clones de seconde génération ayant une meilleure affinité pour la cible. Il serait très intéressant d'évaluer jusqu'à quel point l'affinité pourrait être améliorée par cette méthode, spécialement dans le cas du clone possédant de l'affinité de la kanamycine. Nous pourrions déterminer s'il est possible d'atteindre des affinités équivalentes à ce qui est observé chez les anticorps ou lors de l'ingénierie de cavités protéiques [13, 129, 134].

Il serait également intéressant de réaliser des études structurales des complexes β -lactamase chimérique–ligand. Nous pourrions déterminer comment les trois boucles s'organisent autour du ligand et si elles sont bien toutes les trois impliquées dans la complexation.

2. Perspectives d'applications

2.1. Détection

Les biosenseurs sont des outils analytiques exploitant la remarquable spécificité de la reconnaissance biomoléculaire qui permet de déterminer la concentration d'une seule espèce moléculaire dans un mélange complexe [223]. Un biosenseur est défini comme un type spécifique de senseur chimique comprenant un élément de reconnaissance biologique et un transducteur physico-chimique [224]. L'élément biologique est capable de reconnaître la présence ou la concentration d'un analyte spécifique en solution. De l'interaction de l'élément de reconnaissance avec l'analyte cible, il résulte le changement mesurable d'une propriété de la solution, comme la formation d'un produit par exemple. Le mode de transduction convertit ce changement en signal électrique quantifiable (électrochimique, optique ou une mesure de masse ou de chaleur). Le développement de la plupart des biosenseurs implique l'identification d'une macromolécule naturelle (comme une enzyme ou un anticorps) possédant la spécificité requise, la découverte d'un signal approprié, et la construction d'un détecteur adapté aux propriétés de la macromolécule en question. En procédant de cette manière, chaque dispositif est unique et nécessite un temps de développement et d'optimisation substantielle. Il serait donc bénéfique de développer un système générique, permettant aisément la construction de nouveaux biosenseurs. Une enzyme, dont l'activité est régulée par une molécule cible, pourrait donc être utilisée dans la détection ou le dosage de cette molécule. Ces applications nécessitent une forte modulation de l'activité, une haute spécificité et une haute affinité pour permettre le dosage de faibles concentrations en ligand cible.

La banque de β -lactamases chimériques créée au cours de ce travail ouvre donc de belles perspectives dans la création d'un système générique. En ce qui concerne la détection du signal, celle-ci peut être réalisée grâce à l'utilisation de substrat chromogénique, comme la nitrocéfine ou le PADAC. La nitrocéfine est la molécule la plus utilisée pour la détection d'activité β -lactamase. C'est une céphalosporine dont la coloration en solution vire du jaune au rouge suite à l'hydrolyse par une β -lactamase (cf. Figure 73).

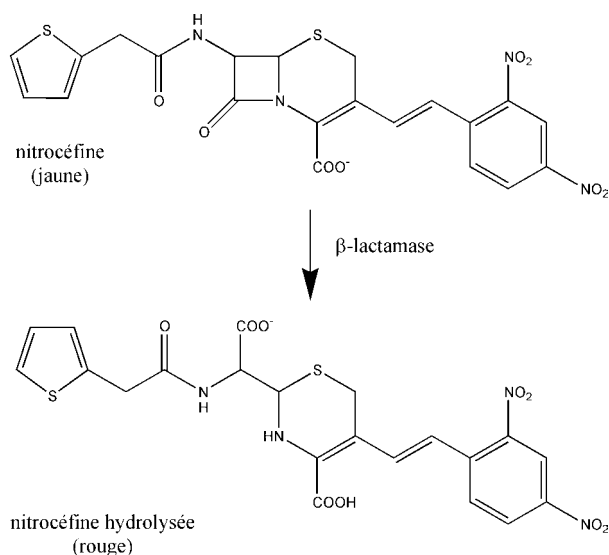


Figure 73 Hydrolyse de la nitrocéfine par la β -lactamase.

La détection de la modulation de l'activité β -lactamase peut également être réalisée *in vivo*. Pour cela, des substrats fluorescents ont été synthétisés, comme le CC1 (cf. Figure 74) [225]. Ils permettent une détection directe et très sensible de l'activité enzymatique dans les différents compartiments d'une cellule vivante.

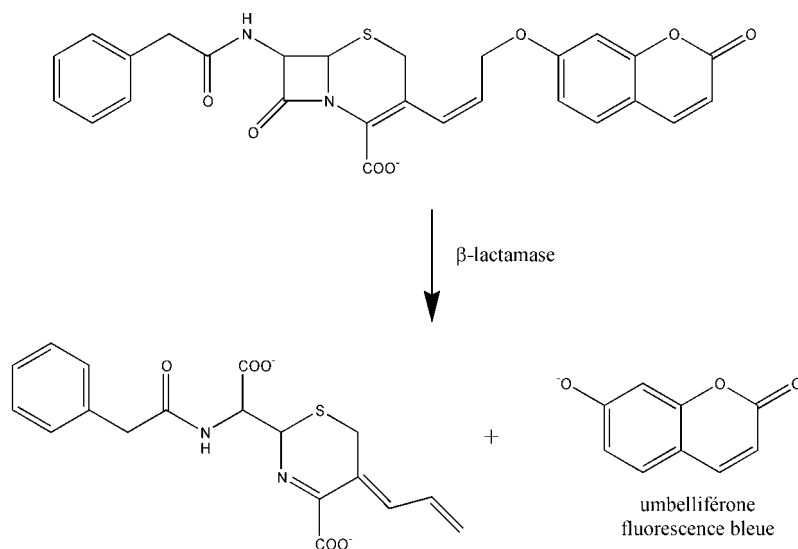


Figure 74 Hydrolyse du substrat CC1 par la β -lactamase. Le groupement umbelliférone libéré produit de la fluorescence bleue (reproduit de Gao *et al.* [225]).

Nous pourrions également imaginer un système de détection utilisant une bioélectrode. Celle-ci utilise un biocatalyseur immobilisé sur une électrode comme élément senseur. De telles électrodes existent déjà pour la détection des pénicillines [226]. Elles utilisent la β -lactamase, qui catalyse l'hydrolyse du cycle β -lactame d'une pénicilline pour produire l'acide pénicilloïque correspondant. L'électrode de verre détecte la diminution du pH, due à l'augmentation de la

concentration en protons libérés par l'acide pénicilloïque, générant ainsi une réponse potentiométrique. La plupart des électrodes à pénicilline sont préparées en capturant l'enzyme dans une membrane de polymère sur l'électrode à pH. Dans notre cas, il faudrait y ajouter la pénicilline et mesurer la modulation de l'activité enzymatique induite par la molécule à détecter. La détection de l'activité enzymatique peut aussi être réalisée grâce aux propriétés d'électrochimiluminescence (ECL) de pénicillines marquées au ruthénium (cf. Figure 75) [227].

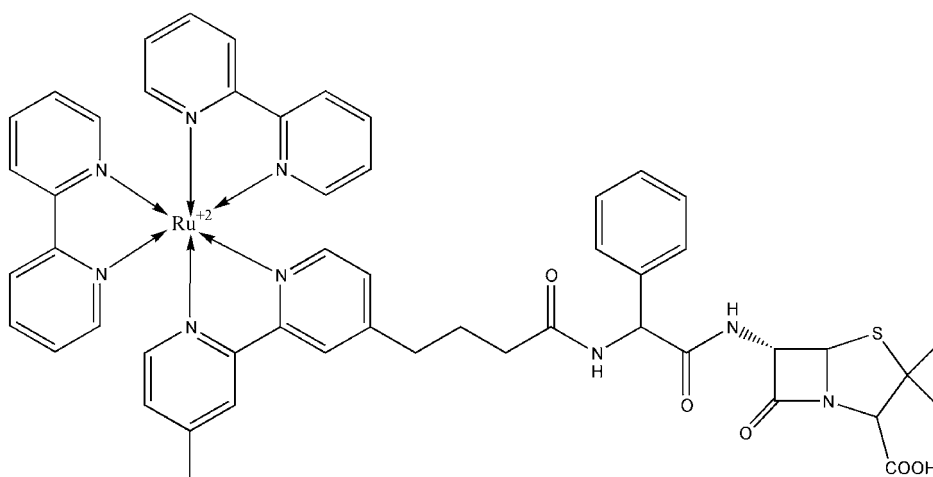


Figure 75 Structure de l'ampicilline marquée au ruthénium : $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}\text{-Amp}$ (reproduit de Liang *et al.* [227]).

Cette méthode très sensible est basée sur un mécanisme de transfert intramoléculaire d'électron de la pénicilline hydrolysée vers le ruthénium. Dans les réactions ECL, une électrode oxyde ou réduit des composés stables pour former des espèces moins stables qui réagissent chimiquement et émettent de la lumière (cf. Figure 76).

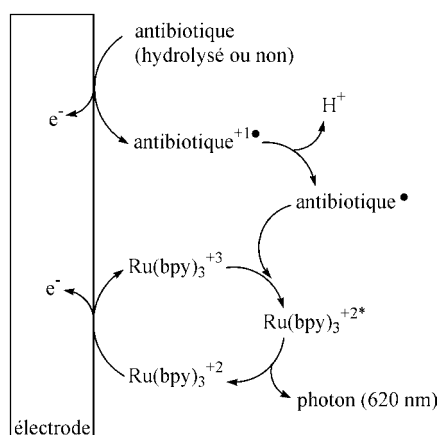


Figure 76 Le marqueur ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) et le coréactant (l'antibiotique) sont oxydés à la surface d'une électrode. Une cascade de réactions chimiques produit le marqueur sous forme excitée ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$). Celui-ci émet de la lumière et retourne dans son état originel pour un autre cycle d'excitation / émission (reproduit de Martin *et al.* [228]).

2.2. Ingénierie de la catalyse

La banque construite dans ce travail pourrait trouver des applications dans la catalyse. Le site de complexation, constitué par les trois boucles aléatoires, deviendrait alors un second site catalytique. Les techniques de sélection *in vitro* pour activité pourraient être utilisées à cette fin [229]. Nous pourrions comparer les potentiels catalytiques des mutants isolés avec ceux des abzymes (anticorps catalytiques).

Alternativement, la banque pourrait être sélectionnée pour affinité pour un cofacteur, comme un ion métallique. La catalyse stéréo-sélective d'une série de réactions assez différentes a déjà été réalisée en utilisant des complexes métallo-peptidiques, notamment. Ceci a permis le développement d'un procédé de formation de liaison carbone-carbone efficace et hautement stéréo-sélective, comme par exemple l'addition conjuguée aux énonés, catalysée par le Cu [230]. Le même type d'application peut être envisagé ici, en espérant que la structure de l'enzyme, entourant le cofacteur, induise la stéréo- ou l'énantio-sélectivité.