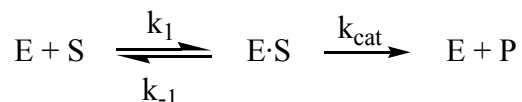


Annexe 1

Calcul de l'activité catalytique, k_{cat} et de la constante de Michaelis–Menten, K_M

La réaction d'hydrolyse enzymatique suit la réaction de Michaelis–Menten :



La vitesse de la réaction vaut :

$$v_o = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

où v_o est la vitesse initiale, V_{max} est la vitesse maximale, K_M est la constante de Michaelis–Menten et $[S]$ est la concentration en substrat.

La constante de Michaelis–Menten peut être exprimée comme suit :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1}$$

En pratique, le K_M correspond à la concentration en substrat lorsque la vitesse vaut la moitié de la vitesse maximale.

Comme, dans la plupart des cas, la vitesse observée ne varie pas avant épuisement substantiel du substrat, celle-ci est approximativement égale à V_{max} et donc :

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_T} \approx \frac{v_o}{[E]_T} = k_{\text{obs}}$$

où k_{cat} est la constante catalytique et $[E]_T$ est la concentration totale en enzyme.

Dans notre cas, nous considérons que la concentration en enzyme est la concentration en phage-enzyme. Les valeurs de k_{obs} mesurées dans ce travail sont donc approximativement égales à des k_{cat} par phage.

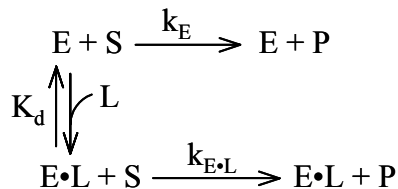
En pratique, la vitesse de catalyse est déterminée en mesurant, en début de réaction, la variation d'absorbance due à l'hydrolyse du substrat.

Pour calculer la constante K_M , l'activité est mesurée à différentes concentrations en substrat. L'équation de Michaelis–Menten permet de calculer la courbe correspondant aux points expérimentaux. Ceci est réalisé par curve fitting (programme KaleidaGraph) afin de déterminer la valeur des deux inconnues : K_M et V_{max} .

Annexe 2

Calcul des constantes de dissociation, K_d

Dans le cas d'une modulation d'activité par un ligand, le schéma réactionnel est le suivant :



où E est l'enzyme, S est le substrat, P est le produit et L est le ligand. K_d est la constante de dissociation du complexe enzyme–ligand, k_E est l'activité de l'enzyme libre et $k_{E \cdot L}$ est l'activité de l'enzyme complexée par le ligand.

Nous pouvons en déduire les trois équations suivantes :

$$\text{Eq. 1 : } K_d = \frac{[E] \cdot [L]}{[E \cdot L]}$$

$$\text{Eq. 2 : } [E]_T = [E] + [E \cdot L]$$

$$\text{Eq. 3 : } k_{\text{obs}} = k_E \cdot \frac{[E]}{[E]_T} + k_{E \cdot L} \cdot \frac{[E \cdot L]}{[E]_T} \quad \text{où } k_{\text{obs}} \text{ est l'activité observée.}$$

Si nous les développons:

$$\text{Eq. 1} \Rightarrow [E \cdot L] = \frac{[E] \cdot [L]}{K_d} \rightarrow \text{Eq. 4}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Eq. 2} + \text{Eq. 4} \Rightarrow [E]_T &= [E] + [E] \cdot \frac{[L]}{K_d} \\
 [E]_T &= [E] \cdot \frac{K_d + [L]}{K_d} \rightarrow \text{Eq. 5}
 \end{aligned}$$

$$[E] = [E]_T \cdot \frac{K_d}{K_d + [L]} \rightarrow \text{Eq. 6}$$

$$\text{Eq. 3} + \text{Eq. 4} \Rightarrow k_{\text{obs}} = \frac{k_E \cdot [E]}{[E]_T} + \frac{k_{E \cdot L}}{[E]_T} \cdot \frac{[E] \cdot [L]}{K_d} \rightarrow \text{Eq. 7}$$

$$\text{Eq. 7} + \text{Eq. 6} \Rightarrow k_{\text{obs}} = \frac{k_E}{[E]_T} \cdot [E]_T \cdot \frac{K_d}{K_d + [L]} + \frac{k_{E \cdot L}}{[E]_T} \cdot [E]_T \cdot \frac{K_d}{K_d + [L]} \cdot \frac{[L]}{K_d}$$

Nous obtenons finalement l'équation :

$$k_{\text{obs}} = k_E \cdot \frac{K_d}{K_d + [L]} + k_{E \cdot L} \cdot \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

qui contient trois inconnues : K_d , k_E et $k_{E \cdot L}$. En pratique, l'activité enzymatique est déterminée à différentes concentrations en ligand et les trois inconnues sont déterminées par curve fitting.

Annexe 3

Séquence de la β -lactamase TEM-1

```

---signal gp3---CA CAG CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT GAA GAT CAG
                    26      30
                    Q  P  E  T  L  V  K  V  K  D  A  E  D  Q
TTG GGT GCT CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC GGT AAG ATC CTT GAG
 40      50
  L  G  A  R  V  G  Y  I  E  L  D  L  N  S  G  K  I  L  E
AGT TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC ACT TTT AAA GTT CTG CTA TGT
 60      70
  S  F  R  P  E  E  R  F  P  M  M  S  T  F  K  V  L  L  C
GGC GCG GTA TTA TCC CGT GTT GAC GCC GGG CAA GAG CAA CTC GGT CGC CGC ATA CAC
 80      90
  G  A  V  L  S  R  V  D  A  G  Q  E  Q  L  G  R  R  I  H
TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG TAC TCA CCA GTC ACA GAA AAG CAT CTT ACG GAT
100      110
  Y  S  Q  N  D  L  V  E  Y  S  P  V  T  E  K  H  L  T  D
GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT GCC ATA ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCG
120      130
  G  M  T  V  R  E  L  C  S  A  A  I  T  M  S  D  N  T  A
GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC GGA GGA CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC
140      150
  A  N  L  L  L  T  T  I  G  G  P  K  E  L  T  A  F  L  H
AAC ATG GGG GAT CAT GTA ACT CGC CTT GAT CGT TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC
160      170
  N  M  G  D  H  V  T  R  L  D  R  W  E  P  E  L  N  E  A
ATA CCA AAC GAC GAG CGT GAC ACC ACG ATG CCT GCA GCA ATG GCA ACA ACG TTG CGC
180      190
  I  P  N  D  E  R  D  T  T  M  P  A  A  M  A  T  T  L  R
AAA CTA TTA ACT GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA TTA ATA GAC TGG
200      210
  K  L  L  T  G  E  L  L  T  L  A  S  R  Q  Q  L  I  D  W
ATG GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTT CTG CGC TCG GCC CTT CCG GCT GGC TGG
220
  M  E  A  D  K  V  A  G  P  L  L  R  S  A  L  P  A  G  W
TTT ATT GCT GAT AAA TCT GGA GCC GGT GAG CGT GGG TCT CGC GGT ATC ATT GCA GCA
230      238      240
  F  I  A  D  K  S  G  A  G  E  R  G  S  R  G  I  I  A  A
CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT ATC GTA GTT ATC TAC ACG ACG GGG AGT CAG
250      252      254      260
  L  G  P  D  G  K  P  S  R  I  V  V  I  Y  T  T  G  S  Q
GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT AGA CAG ATC GCT GAG ATA GGT GCC TCA CTG ATT AAG
270      280
  A  T  M  D  E  R  N  R  Q  I  A  E  I  G  A  S  L  I  K
CAT TGG---gp3 mature---
 290
  H  W

```

Annexe 4

Séquence de fd-bla au niveau du gène de la β -lactamase TEM-1

AGCCTCCGTA GCCGTTGCTA CCCTCGTTCC GATGCTGTCT TTCGCTGCTG AGGGTGACGA TCCCGCAAAA
5' -ATGCTGTCT TTCGCTGCTG AG-3' (AB349)

GCGGCCTTTG ACTCCCTGCA AGCCTCAGCG ACCGAATATA TCGGTTATGC GTGGGCGATG GTTGTGTGCA

TTGTCGGCGC AACTATCGGT ATCAAGCTGT TTAAGAAATT CACCTCGAAA GCAAGCTGAT AAACCGATAC

AATTAAAGGC TCCTTTTGA GCCTTTTTTT TTGGAGATTT TCAACGTGAA AAAATTATTA TTCGCAATTC
gp8|signal gp3
5' -TA TTCGCAATTC

CTTTAGTTGT TCCTTTCTAT TCTCACAGTG CACAGCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG ATGCTGAAGA
ApaI|bla
CTTTA GTTG-3' (fdP3S)

TCAGTTGGGT XhoI
GCTCGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA AGATCCTTGA GAGTTTTTCGC

CCCGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT TTAAAGTTC TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTGTG

ACGCCGGGCA AGAGCAACTC GGTGCCGCA TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT

CACAGAAAAG CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT

AACACTGCGG CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT TTGCACAACA

TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAACCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA ACGACGAGCG

TGACACCACG ATGCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGCGC AAATATTAA CTGGCGAACT ACTTACTCTA

GCTTCCCGGC AACAATTAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCCC

TTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC

ACTGGGGCCA GATGGTAAGC CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT

GAACGAAATA GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GGGGATTGAG GGGCGTGGG
|linker NotI

CCGCCAGAAAC TGTGAAAGT TGTTTAGCAA AACCTCATAC AGAAAATTCA TTTACTAACG TCTGGAAAGA
3'-AATCGTT TTGGAGTATG TCTT-5' (AB348)

CGACAAAAC TTAGATCGTT ACGCTAACTA TGAGGGCTGT CTGTGGAATG CTACAGGCGT TGTGGTTTGT

ACTGGTGACG AAACTCAGTG TTACGGTACA TGGGTTCTTA TTGGGCTTGC TATCCCTGAA AATGAGGGTG