

I. Introduction

Ce chapitre est consacré à la construction des banques de mutants de la β -lactamase comportant trois régions aléatoires.

1. Choix des sites d'insertion

Les structures des protéines sont composées d'une succession d'éléments de structure secondaire, hélices α et/ou brins β , connectés par des coudes β (' β -turns') ou des boucles plus larges (contenant cinq résidus ou plus). Une analyse systématique des événements d'insertion/délétion dans les protéines homologues [158] montre que ces insertions/délétions sont beaucoup plus fréquentes dans les connections entre les structures secondaires qu'au sein même des éléments de structure secondaire. Nous avons donc choisi les sites d'insertion dans ces connections.

Les trois régions choisies pour construire un site de complexation de molécules diverses à la surface de la β -lactamase TEM-1 devaient être proches dans l'espace et proches du site actif pour que la liaison du ligand cible ait une chance d'affecter l'activité catalytique. La Figure 14 montre les trois boucles choisies comme sites d'insertion. Il s'agit d'une modélisation (réalisée grâce au serveur Swiss-Model [159]) qui vise à illustrer la structure de la β -lactamase après insertion d'un peptide de dix résidus dans chacune des trois boucles.

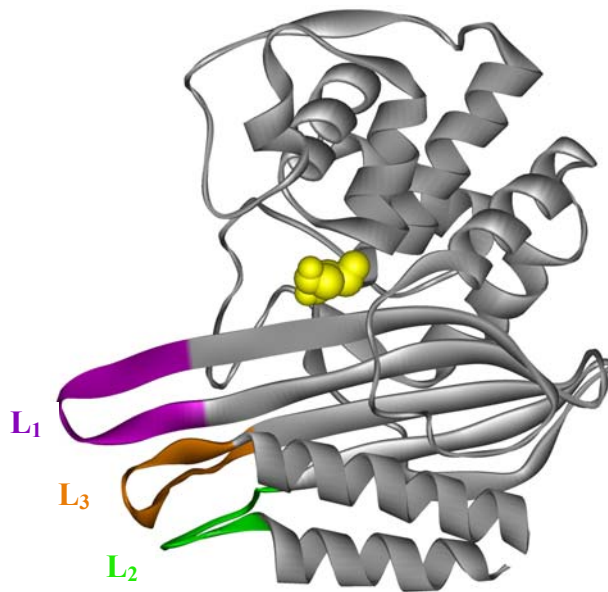


Figure 14 Prévion de la structure de la β -lactamase TEM-1 après insertion des trois peptides. La sérine (Ser₇₀) active est indiquée en jaune, la boucle 1 en violet, la boucle 2 en vert et la boucle 3, en orange.

La structure de plusieurs anticorps à chaînes lourdes (Figure 7, page 35) a été résolue sous forme de complexe anticorps/antigène. La Figure 15 montre (à droite) la structure d'un HCAb de dromadaire (anticorps dirigé contre la RNase A de bovin) [160]. Nous pouvons constater que, dans la structure modélisée de la β -lactamase (à gauche), les points d'ancrage des trois boucles choisies pour l'ingénierie ont une disposition assez semblable à ceux des trois CDRs de l'anticorps, alors que les structures tridimensionnelles des protéines sont très différentes.

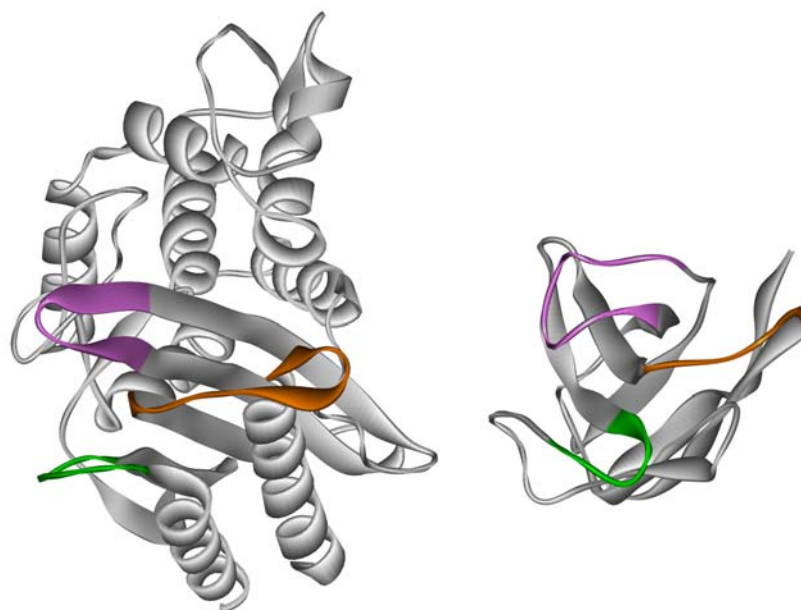


Figure 15 Comparaison des structures de la β -lactamase contenant les trois inserts (à gauche) et d'un HCAb anti-RNase A de dromadaire (à droite) [160]. Les trois boucles insérées dans la β -lactamase et les 3 CDRs du HCAb sont indiqués : boucles vertes, oranges et violettes. Les deux structures sont présentées à la même échelle.

La boucle 1, L_1^1 , est située entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ de l'enzyme. Cette boucle (L_1) est constituée de trois résidus et est connue pour accepter aisément les mutations [155] malgré la proximité du site actif. Nous avons choisi d'y remplacer les résidus Glu₂₄₀ et Arg₂₄₁ par six acides aminés aléatoires. La boucle 3 (L_3) est située entre le brin $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 8$. L'ingénierie de cette boucle a déjà été réalisée précédemment au laboratoire [136] : la Thr₂₇₁ y a été remplacée par six résidus aléatoires. Nous savons donc que cette boucle tolère aisément l'insertion peptidique. Quant à la boucle 2 (L_2), elle est située entre l'hélice $\alpha 1$ et le brin $\beta 1$. Elle ne tolère pas facilement les mutations [155], mais elle est dans une position similaire à la boucle 3. Cette boucle étant plus éloignée du site actif, nous avons choisi d'y introduire des inserts de plus grande taille en y remplaçant les résidus Gly₄₁ et Ala₄₂ par six, sept, huit ou neuf résidus aléatoires.

La Figure 16 montre les distances entre les trois sites d'insertion choisis.

¹ L signifie 'loop' ou boucle.

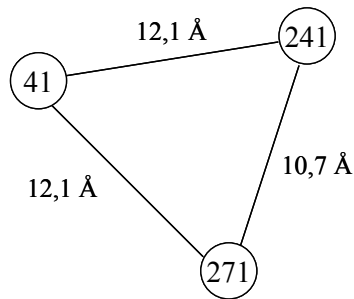


Figure 16 Distances, en Angström, entre les carbones α des résidus 241, 41 et 271 qui symbolisent les trois sites d'insertion.

2. Stratégie

Comme nous ne savions pas, *a priori*, quelles étaient les séquences à insérer pour lier une molécule donnée, des séquences dégénérées ont été introduites pour créer une banque de mutants. Ensuite, les clones ayant une affinité pour le ligand étranger ont été isolés par sélection d'affinité. La probabilité de trouver des mutants ayant une affinité élevée pour un ligand donné dépend donc de manière cruciale de la taille des banques. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, il existe différentes façons de générer la diversité dans la séquence. La méthode la plus adaptée pour créer des mutations aléatoires sur des portions restreintes est l'utilisation de cassettes aléatoires, construites à partir d'oligonucléotides dégénérés [161]. La stratégie initiale pour créer les banques consiste à assembler de manière progressive des banques construites indépendamment : dans un premier temps, chaque banque d'insertion est construite sur base de la stratégie exposée dans la Figure 17.

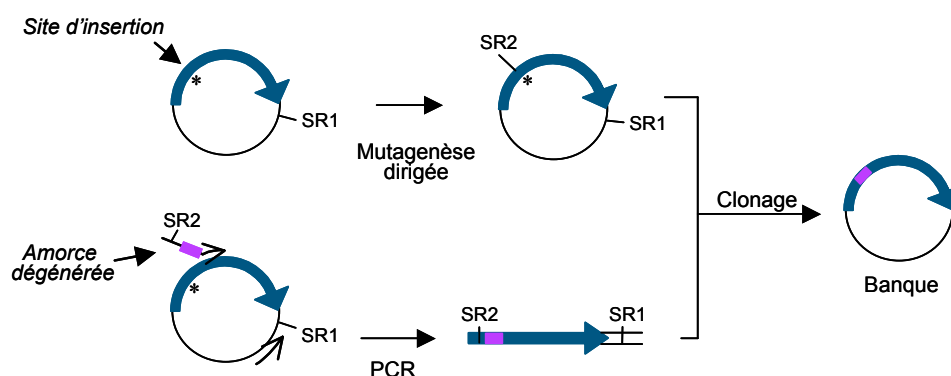


Figure 17 Principe général utilisé pour la construction des banques de première génération. D'une part, un site de restriction (SR2) est créé dans le vecteur de clonage, par mutagenèse dirigée, à côté du site d'insertion (*). D'autre part, la cassette aléatoire est construite par PCR, en utilisant une amorce dégénérée (la dégénérescence est indiquée en gris clair) contenant également le site de restriction SR2. Le fragment de PCR est ensuite cloné dans le vecteur entre SR2 et un site de restriction préexistant, SR1.

Le but de ce travail est de trouver des clones possédant un nouveau site allostérique. Comme nous espérons que la complexation du ligand modifie l'activité catalytique des enzymes, ces clones doivent être dotés d'une activité détectable ; or une insertion peptidique risque de perturber fortement celle-ci. De ce fait, chaque banque est ensuite sélectionnée *in vivo* pour activité catalytique : seuls les clones conférant une résistance bactérienne à l'ampicilline d'au moins 5 % de celle conférée par le phage-enzyme sauvage sont gardés. En pratique, seules les bactéries infectées par un phage portant une β -lactamase active survivent dans un milieu contenant de la pénicilline. Le nombre de clones actifs fournit également une bonne indication sur la tolérance à l'insertion. Si le pourcentage de clones conférant une résistance à l'antibiotique est inférieur à 0,1 %, nous en déduisons que l'insertion peptidique n'est pas tolérée.

Finalement, les trois banques de première génération sont combinées pour former une banque de seconde génération contenant trois boucles aléatoires, suivant la stratégie exposée dans la Figure 18.

Comme nous le verrons plus loin, cette stratégie de construction a été adaptée en fonction des résultats obtenus.

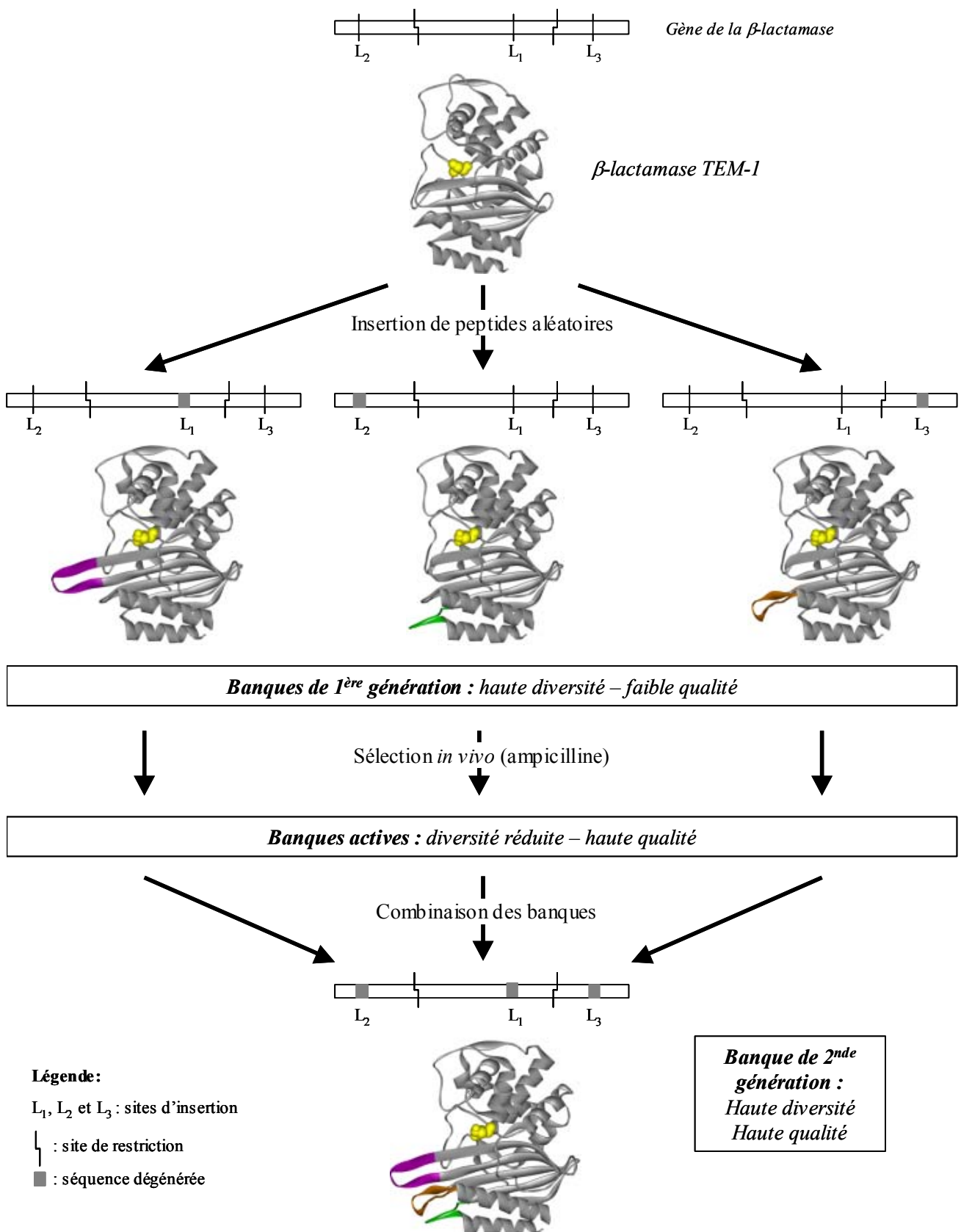


Figure 18 Stratégie de construction progressive. Les trois banques d'insertion sont construites indépendamment. Ensuite, elles sont combinées grâce aux sites de restriction situés entre chaque site d'insertion.

II. Résultats

Le phage exprimant la β -lactamase TEM-1 en fusion avec la protéine pIII a été construit précédemment au laboratoire par insertion du gène de la β -lactamase TEM-1 dans le phage fd-dog² entre la séquence codant pour le peptide signal et la séquence codant pour la protéine mature du gène pIII [162]. Ce phage fd-bla contient également un gène de résistance à la tétracycline, ce qui permet la sélection des cellules bactériennes infectées (seules les bactéries infectées par le phage poussent sur un milieu contenant la tétracycline).

Construction du vecteur initial : fd-bla4

Pour pouvoir combiner ultérieurement les trois banques, nous devons disposer de sites de restriction uniques entre les trois sites d'insertion (cf. Figure 18). Le site *PvuI* était déjà présent entre les sites L₂ et L₁. La première étape a donc été d'introduire un site de restriction inexistant dans fd-bla, entre les sites L₁ et L₃. Le site *ApaI* a été choisi car il ne nécessitait que la mutation d'une base dans le gène de la β -lactamase. De plus, cette mutation est silencieuse (c'est-à-dire que la séquence en acides aminés n'est pas modifiée): Pro₂₅₂ (CCA) → Pro (CCC). Nous avons appelé ce vecteur initial fd-bla4 (*A* pour *ApaI*) ; il est décrit à la Figure 19. Notons que le site d'insertion L₂ contient un site de restriction *XhoI*.

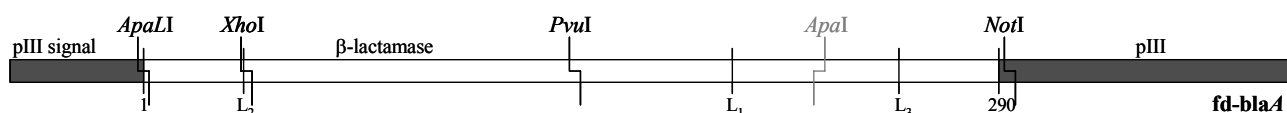


Figure 19 Vecteur initial : fd-bla4. Le gène de la protéine pIII du phage et sa séquence signal sont indiqués en gris foncé. Le gène de la β -lactamase est en blanc. Les trois sites d'insertion des banques sont également indiqués (L₁, L₂ et L₃), ainsi les sites de restriction utilisés. Le nouveau site de restriction, *ApaI* (en gris), se trouve au niveau des codons 251 et 252 de la β -lactamase.

En pratique, la mutagenèse a été réalisée grâce au «QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit» de Stratagene, sur l'ADN double brin de fd-bla, par hybridation de deux amorces complémentaires contenant la mutation à introduire. Ces amorces ont été utilisées pour l'élongation par PCR de chaque brin de l'ADN sauvage. Le brin parental a ensuite été détruit par une exonucléase spécifique de l'ADN méthylé³. L'ADN mutant a finalement été transformé dans les cellules bactériennes. La Figure 20 montre les différentes étapes de la mutagenèse.

² fd-dog : phage n'exprimant pas de protéine en fusion avec la pIII.

³ Le brin parental est isolé d'une souche d'*E. coli* possédant les gènes *dam* et *dcm*. Les produits de ces gènes méthylent l'ADN.

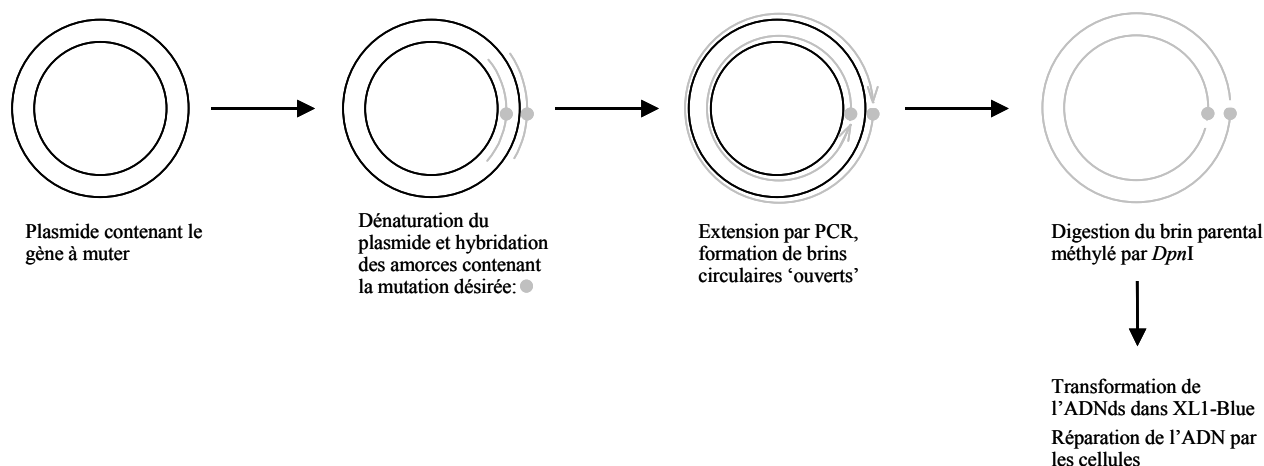


Figure 20 Etapes de la mutagenèse par PCR sur l'ADN double brin.

Quelques clones ont été caractérisés par restriction : l'ADN des clones a été digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *ApaI*, puis les fragments ont été posés sur gel d'agarose et leur taille estimée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire. Si les deux sites de restriction sont présents dans l'ADN du phage, deux fragments sont formés, un de 5348 bp et le second de 4651 bp. Si l'ADN des clones ne possède pas de site *ApaI*, il est simplement linéarisé et une seule bande est visible, à 9999 bp (taille de l'ADN de fd-bla). Sur les dix clones testés, huit montraient la présence des deux fragments attendus. Les deux autres clones ne montraient qu'un seul fragment, d'approximativement 10 kb. L'ADN de six des clones contenant le site *ApaI* a été séquencé. Ces mutants ne contiennent pas d'autres mutations que celle qui fut introduite.

1. Ingénierie de la boucle 1

La première boucle dont nous avons fait l'ingénierie est située au niveau des résidus 238-241, entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ de l'enzyme. Cette boucle (L_1) est constituée de trois résidus et est connue pour accepter aisément les mutations [155] malgré la proximité du site actif (cf. Figure 21).

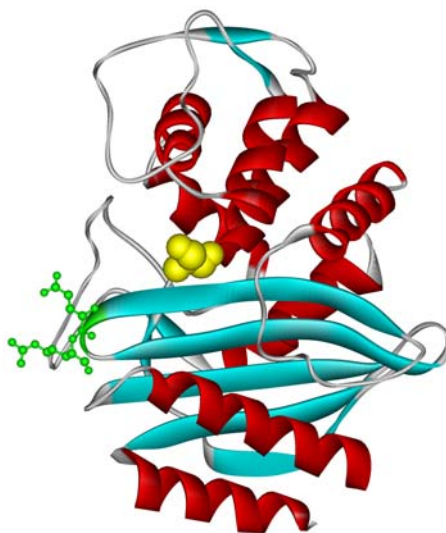


Figure 21 Structure de la β -lactamase. La sérine (Ser₇₀) active est indiquée en jaune et la boucle 1, symbolisée par les résidus 240 et 241, en vert.

Dans un premier temps, nous avons tenté de remplacer les résidus Glu₂₄₀ et Arg₂₄₁ par six acides aminés aléatoires.

1.1. Première tentative de construction de la banque fd-blaA-L₁⁶

La première banque construite a été nommée fd-blaA-L₁⁶, L₁ pour 'loop' ou boucle 1 et 6 pour insertion de six résidus aléatoires.

1.1.1. Construction du vecteur de clonage 1 : fd-blaAI

Pour construire la banque en L₁, nous avons dû, dans un premier temps, créer un vecteur contenant les sites de restriction permettant l'insertion d'une cassette aléatoire. Un site de restriction *Bbs*I a donc été introduit dans l'ADN de fd-blaA juste en aval de la position L₁. *Bbs*I est souvent utilisé pour ce type de constructions car il a l'avantage de cliver l'ADN en dehors du site de reconnaissance de la nucléase ; par conséquent, les mutations qui génèrent ce site sont excisées lors de la digestion. De plus, des extrémités cohésives non palindromiques sont générées par *Bbs*I, ce qui permet de contrôler la direction de la ligation. Lors de cette mutagenèse, un codon stop et un décalage de la phase de lecture ont également été introduits. De cette façon, lors de la sélection de la banque pour activité catalytique, cet intermédiaire de clonage est éliminé car l'enzyme encodée est tronquée et donc inactive. Ce premier vecteur de clonage, appelé fd-blaAI (I pour inactif), est décrit à la Figure 22.

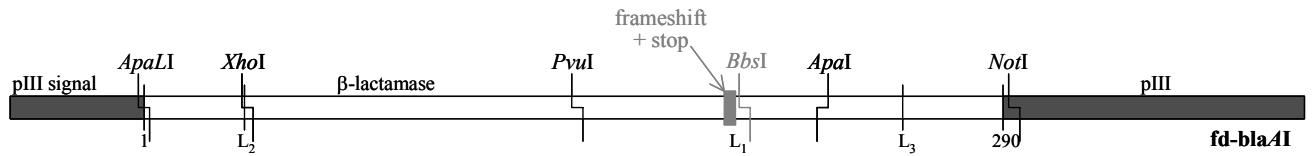


Figure 22 Vecteur de clonage 1 : fd-blaA1. Un décalage de phase de lecture et un codon stop sont introduits au niveau de la position L₁ et un site de restriction BbsI est créé juste en aval de cette position.

Cette mutagenèse a été réalisée à l'aide du «Muta-Gene M13 *in vitro* Mutagenesis Kit» (Bio-Rad), par la méthode du simple brin uracile qui permet une forte sélection contre le brin non muté [163, 164] ; elle est schématisée dans la Figure 23. Dans un premier temps, une souche bactérienne mutante *dut*, *ung* a été infectée par fd-blaA. Les ADN synthétisés par cette souche comportent un certain nombre de résidus uracile aux positions normalement occupées par des thymines. Ce remplacement est dû à la mutation *dut* qui inactive l'enzyme dUTPase de la bactérie et provoque une haute concentration intracellulaire en dUTP. Quant à la mutation *ung*, elle inactive l'uracile N-glycosylase et permet le maintien des uraciles incorporés dans l'ADN. L'amplification des phages dans cette souche nous a donc permis d'obtenir fd-blaA sous forme d'ADN simple brin uracile. Un oligonucléotide contenant les mutations a ensuite été hybridé au brin uracile et utilisé comme amorce pour la synthèse *in vitro* du brin complémentaire. La ligation du brin synthétisé à l'extrémité 5' de l'amorce a permis l'obtention d'un hétéroduplex circulaire fermé. Finalement, cet hétéroduplex a été transformé par électroporation dans une souche bactérienne sauvage, TG1, qui contient un uracile N-glycosylase active. Celle-ci clive le brin contenant les uraciles et seul le brin ne contenant pas ceux-ci est répliqué.

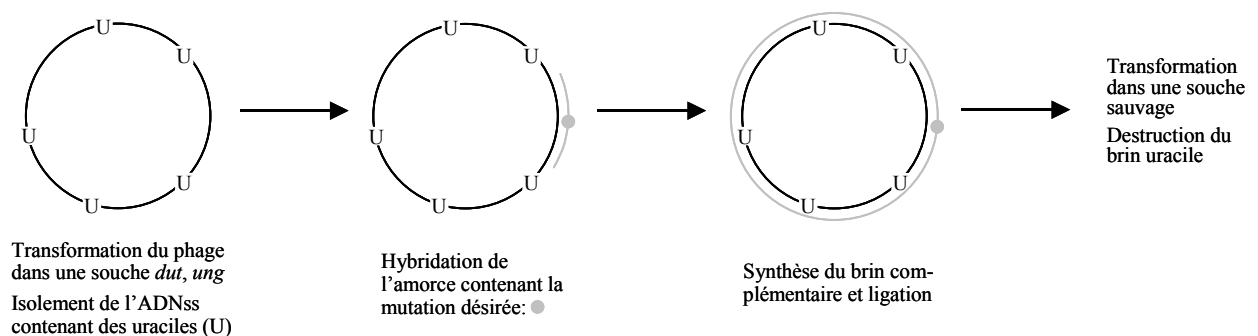


Figure 23 Etapes de la mutagenèse sur l'ADN simple brin.

Les bactéries contenant ce nouveau vecteur ont été repiquées sur des boîtes de Petri contenant de la tétracycline et, en parallèle, sur des boîtes contenant de la tétracycline et de l'ampicilline. Ce nouveau vecteur n'exprimant pas de β -lactamase active, seuls les clones sensibles à l'ampicilline contiendront les mutations introduites. Parmi les 25 clones testés, 12 n'étaient pas résistants à

l'ampicilline. Des tests de digestion par *Bbs*I ont été réalisés sur l'ADN de ces 12 clones et nous avons pu constater que le site *Bbs*I était bien présent dans chacun d'entre eux. Finalement, quatre de ces clones ont été séquencés et il s'est avéré qu'un seul clone était bien construit, les trois autres montrant la délétion d'une paire de bases.

1.1.2. Construction de la cassette dégénérée L_1 ⁶

La cassette dégénérée permettant l'insertion aléatoire en L_1 a été construite par PCR en utilisant deux amorces appropriées : LD57 et LD58 (cf. Figure 25). L'une d'elles, LD58, contient six codons aléatoires : $(MNN)_6$ ⁴. Cette amorce étant anti-sens, cette séquence MNN devient NNK dans le brin codant. Ceci signifie que les codons insérés ne sont pas totalement dégénérés, seule une moitié de ceux-ci est autorisée à chaque position (cf. Figure 24). Ceci permet une meilleure distribution des acides aminés. En effet, une cassette construite avec un mélange de codons NNN surexprimerait les acides aminés les plus représentés dans le code génétique ; par exemple, le nombre de leucines serait six fois plus élevé que les méthionines. De plus, la probabilité d'avoir des codons stop à chaque position serait de 4,7 % tandis qu'une construction NNK diminue cette probabilité à 3,1 %.

		Deuxième position									
		U		C		A		G			
Première position (extrémité 5')	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	Troisième position (extrémité 3')
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C	
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A	
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C	
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A	
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G	
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C	
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A	
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C	
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A	
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G	

Figure 24 Code génétique. Les codons correspondant à la séquence NNK sont indiqués en gris.

La présence de ces six codons aléatoires permet le remplacement des résidus 240-241 par six acides aminés aléatoires. LD58 contient également un site de restriction *Bbs*I permettant le

⁴ N=[A, C, G, T], M=[A, C] et K=[G, T].

clonage ultérieur de la cassette dans le vecteur *fd-bla4I*. Le vecteur de clonage *fd-bla4I* a été utilisé comme matrice de la PCR afin d'éviter toute contamination par un vecteur exprimant une β -lactamase active.

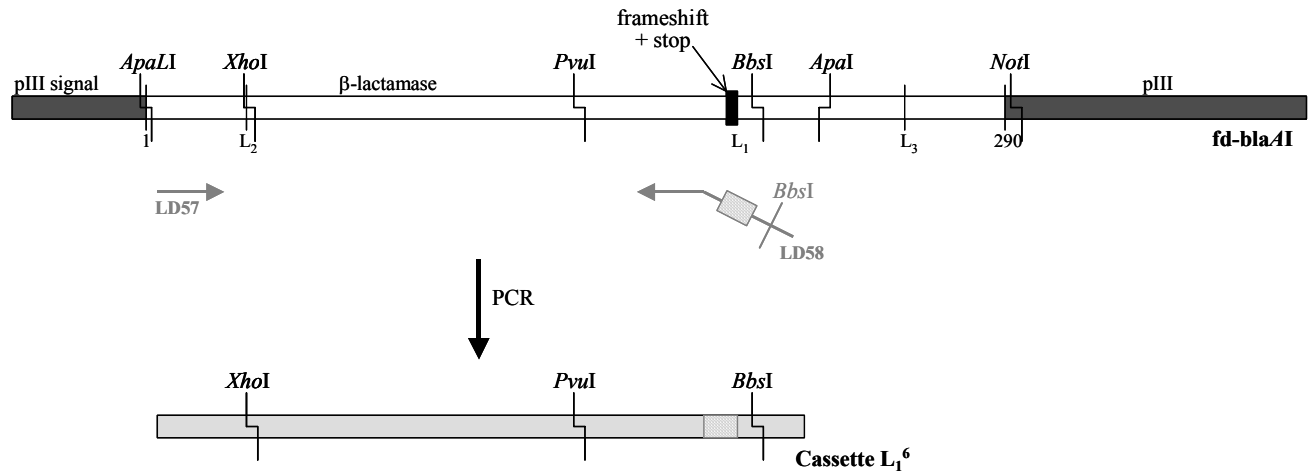


Figure 25 Construction de la cassette de clonage L_1^6 par PCR sur *fd-bla4I*. Les amorces, LD57 et LD58, sont indiquées en gris. LD58 contient une séquence dégénérée (■) et un site de restriction *BbsI*.

1.1.3. Construction de la banque *fd-bla4-L1^6*

La cassette dégénérée L_1^6 a été clonée dans le vecteur *fd-bla4I*, entre les sites *BbsI* et *XhoI*. Le mélange de ligation a ensuite subi une restriction par *BbsI*. Cette étape permet la linéarisation du vecteur qui n'aurait pas intégré la cassette de PCR. En effet, le site *BbsI* ayant l'avantage de s'auto-exciser lors du clonage du fragment de PCR dans le vecteur, celui-ci n'est plus présent dans l'ADN de la banque. Lors de la transformation des cellules bactériennes, les fragments d'ADN linéaires sont dégradés par les enzymes de la bactérie ce qui limite la contamination de la banque par le vecteur de clonage. La banque résultante, *fd-bla4-L1^6*, est décrite à la Figure 26.

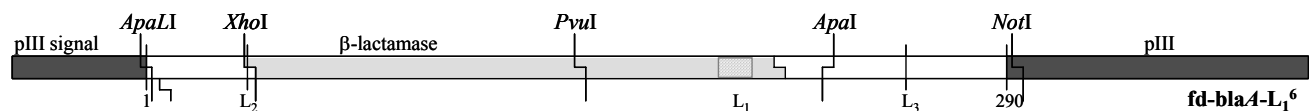


Figure 26 Banque *fd-bla4-L1^6*. La cassette L_1^6 (indiquée en gris clair) a été insérée entre les sites de restriction *XhoI* et *BbsI* de *fd-bla4I*. Le site *BbsI* est excisé pendant le clonage et les codons 240 et 241 sont remplacés par 6 codons aléatoires (■).

1.1.4. Caractérisation de la banque fd-bla4-L₁⁶

La taille de la banque a été estimée à $2,8 \cdot 10^7$ mutants par comptage des colonies poussant sur boîte de Petri contenant de la tétracycline. Nous sommes donc assez proche de la complexité requise, qui nécessite 20^6 (20 acides aminés et 6 codons aléatoires), soit $6,4 \cdot 10^7$ clones. Les transformants ont également été étalés sur des boîtes contenant de l'ampicilline à une concentration de 10 mg/l. Celle-ci correspond à environ 2,5 % de la concentration maximale sur laquelle poussent des bactéries infectées par le phage-enzyme sauvage. Malheureusement, le rapport des nombres de clones poussant en présence ou non d'ampicilline n'est que d'environ 1/70.000 (soit 0,0014 %), ce qui est extrêmement faible. La taille de la banque active a été estimée à 400 mutants, en multipliant la taille de la banque par le pourcentage de clones actifs. L'ADN de six clones résistants à l'ampicilline a été séquencé et l'activité des phages-enzymes mesurée (cf. Annexe 1, page 177). Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 2.

Clone	Séquence en 240-241 (L ₁)	k _{obs}
fd-bla4	Glu-Arg	1.500 s ⁻¹
fd-bla4-L ₁ ⁶ -#1	Arg-Thr-Ala-Thr-Gly-Gly	20 s ⁻¹
-#2	Gly-Leu	5 s ⁻¹
-#3	Asn-Ser-His-Ser-Gly-Gly	13 s ⁻¹
-#4	Asn-Ser-His-Ser-Gly-Gly	9 s ⁻¹
-#5	Thr-Gly-Pro-Ala-Asp-Lys	200 s ⁻¹
-#6	Lys-Pro	7 s ⁻¹

Tableau 2 Séquences en acides aminés et activité catalytique de 6 clones de la banque fd-bla4-L₁⁶ en comparaison avec le phage sauvage (première ligne). Les séquences montrées correspondent à la position 240-241 dans la β-lactamase sauvage.

Mis à part le clone #5, l'activité catalytique des mutants caractérisés est en effet assez faible. Il est étonnant de constater que les clones #2 et #6 ne possèdent pas d'insertion de six résidus en L₁ mais deux acides aminés différents de la séquence sauvage. Il semble donc que les clones ayant perdu l'insert par réarrangement de l'ADN possèdent un avantage sélectif. D'autre part, les clones #3 et #4 sont identiques⁵, ce qui indique que la diversité de la banque active est très faible. Le séquençage de la banque non sélectionnée pour activité catalytique a également été réalisé. Dans ce cas, ce ne sont pas des clones isolés qui sont séquencés, mais un mélange de clones. Nous nous attendions donc à voir la dégénérescence en L₁ (mélange des bases) sur le chromatogramme du séquençage. Cela n'a pas été le cas : le séquençage n'a montré que la séquence de fd-bla4L₁, ce qui signifie que le vecteur de clonage est toujours présent dans la

⁵ La différence d'activité catalytique mesurée n'est pas significative. En effet, le nombre d'enzymes présentées sur phage est très sensible aux conditions de préparation des phages et varie d'une préparation à l'autre.

banque et dans des proportions proches des 100 %. Donc la taille réelle de la banque construite est bien en deçà des $2,8.10^7$ estimés.

Nous avons donc tenté la reconstruction de cette banque, en optimisant chaque étape. Mais nous nous sommes rendu compte que le vecteur de clonage fd-bla4I ne migrerait plus à la taille attendue sur gel d'aragose. Son séquençage a été réalisé et montre la délétion d'une grande partie du gène de la β -lactamase (fragment du gène codant pour les résidus 47 à 263). Ceci pourrait être dû à la formation d'une épingle à cheveux entre deux segments anti-complémentaires de l'ADN que nous avons observés dans la séquence, et qui favoriserait la délétion lors de la réplication. Cette délétion restaure la phase de lecture et élimine le codon stop. Ce vecteur délété a donc un avantage sur fd-bla4I lors de son amplification *in vivo* car il exprime correctement la protéine pIII. Comme nous l'avons vu dans l'introduction sur le phage display, la pIII est responsable de l'infectivité des phages.

Pour contourner ce problème, nous avons choisi de construire un autre vecteur de clonage ne comportant ni codon stop, ni décalage de phase de lecture.

1.2. Seconde tentative de construction de la banque fd-blaA-L₁⁶

1.2.1. Construction du vecteur de clonage 2 : fd-blaA Δ 1

Une autre stratégie a donc été développée. Ce deuxième vecteur de clonage a été construit de façon à ne contenir qu'une petite partie du gène de la β -lactamase. Ne possédant ni codon stop, ni décalage de phase de lecture, ce vecteur exprime la protéine pIII tout à fait normalement, mais celle-ci est fusionnée à une β -lactamase tronquée et donc inactive. Ce vecteur de clonage sera alors également éliminé lors de la sélection de la banque pour activité catalytique.

En pratique, deux oligonucléotides complémentaires ont été hybridés et clonés entre les sites *Xho*I et *Apa*I du vecteur initial, fd-blaA. Ce nouveau vecteur de clonage (décrit à la Figure 27) est appelé fd-blaA Δ 1 (Δ pour délétion). Il montre une délétion de 192 codons de la β -lactamase. Ceux-ci ont été remplacés par six bases qui forment un site de restriction *Bbs*I pour permettre le clonage ultérieur de la cassette dégénérée.

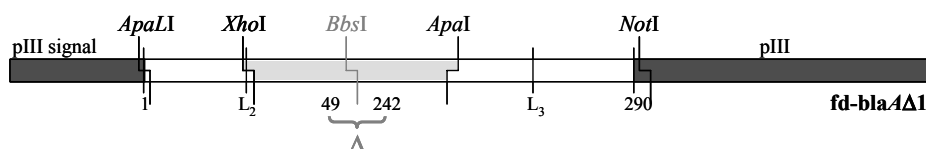


Figure 27 Vecteur de clonage 2 : fd-blaAΔ1. Les codons 50 à 241 sont remplacés par six paires de bases formant un site de restriction *BbsI* (en gris). Cette construction a été réalisée par clonage d'une cassette synthétique (en gris clair) entre les sites *XhoI* et *ApaI* de fd-blaA.

Après la ligation de la cassette synthétique dans fd-blaA, une restriction par *PvuI* a été réalisée pour éliminer le vecteur fd-blaA résiduel. En effet, ce site de restriction se trouve dans la partie déletée et n'est donc plus présent dans fd-blaAΔ1. Après transformation, quelques clones ont été repiqués sur boîte de Petri contenant ou non de l'ampicilline. Les clones ayant intégrés la cassette synthétique ne sont pas résistants à l'ampicilline. Huit de ces clones ont été caractérisés par séquençage pour s'assurer que la construction était correcte.

1.2.2. Construction de la banque fd-blaA-L₁⁶

Pour cette nouvelle construction de la banque fd-blaA-L₁⁶, la même stratégie a été utilisée que lors de la construction précédente. La cassette de PCR L₁⁶ contenant la partie dégénérée (cf. Figure 25, page 59) a été clonée entre les sites *XhoI* et *BbsI* du vecteur de clonage fd-blaAΔ1. Après ligation et restriction par *BbsI*, l'ADN de la banque a été électroporé dans les cellules bactériennes.

1.2.3. Caractérisation de la banque fd-blaA-L₁⁶

La taille de la banque a été estimée à 3.10^5 mutants, ce qui est très faible par rapport à la taille théorique ($6.4.10^7$ clones). La construction a été vérifiée par criblage PCR : après amplification avec des amorces situées de part et d'autre du gène de la β-lactamase, la taille des fragments d'ADN obtenus a été estimée par migration sur gel d'agarose. Sur les 20 clones testés, 19 possèdent la taille attendue, tandis que le clone #15 a une taille correspondant à celle du vecteur de clonage, fd-blaAΔ1. Le séquençage de ces clones (cf. Tableau 3) montre que les résidus 240-241 sont remplacés par six acides aminés aléatoires. La séquence du clone #15 était effectivement celle de fd-blaAΔ1.

Clone	Séquence en 240-241 (L ₁)
fd-blaA	Glu-Arg
fd-blaA-L ₁ ⁶ -#1	Trp-Glu-Gln-Gln-Val-Pro
-#2	Thr- X -Ser-Tyr- X -His
-#3	Cys-Pro-Glu-Gln- X -Pro
-#6	Gln- X -Gln-His-Arg-Pro
-#10	Thr-Gly-Asn-Glu-Gly-Tyr
-#12	Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Ser
-#13	Thr-Ser-Leu-Glu-Pro-Lys
-#14	X -Thr-Arg-Ala- X -Glu
-#16	Gln-Arg-Val-Gly-Trp-His
-#18	Lys-Pro-Ser-Leu-Ala-Val
-#20	Arg-Leu-Asn- Stop -Arg-Arg

Tableau 3 Séquences en position 240-241 de 11 clones de la banque fd-blaA-L₁⁶. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

Le pourcentage de clones actifs de la banque a ensuite été estimé en étalant les bactéries transformées sur des boîtes de Petri contenant différentes concentrations en ampicilline. Le nombre de colonies résistantes a été comparé au nombre de colonies poussant en absence d'ampicilline. Comme le montre le Tableau 4, les pourcentages de clones résistants sont très faibles.

Banque	Amp ₁₀	Amp ₂₀	Amp ₅₀	Amp ₁₀₀
fd-blaA-L ₁ ⁶	0,06 %	0,02 %	0,004 %	0,001 %

Tableau 4 Pourcentage de colonies résistantes à l'ampicilline, par rapport au nombre de colonies poussant sans ampicilline, pour la banque fd-blaA-L₁⁶. Amp_n signifie une concentration en ampicilline de n mg/l.

Quelques clones résistants à des concentrations de 50 mg/l d'ampicilline ont été séquencés ; la séquence en 240-241 est montrée dans le Tableau 5. Aucun des cinq clones séquencés ne possède l'insertion des six résidus mais le séquençage montre un remplacement aléatoire des deux acides aminés 240 et 241. Dans le cas du clone #5, la séquence n'est pas lisible au niveau de 240-241 mais nous pouvons voir qu'il n'y a que deux codons. Nous remarquons aussi que les clones #1 et #3 possèdent la même séquence.

Clone	Séquence en 240-241 (L ₁)
fd-blaA	Glu-Arg
fd-blaA-L ₁ ⁶ -Amp ₅₀ -#1	Ala-Gln
-#2	Val-Leu
-#3	Ala-Gln
-#4	X -Ala
-#5	X - X

Tableau 5 Séquences en position 240-241 de cinq clones de la banque fd-blaA-L₁⁶, résistants à 50 mg/l en ampicilline. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

Vu le faible pourcentage de clones actifs et vu le fait que la boucle insérée ne soit pas conservée dans les clones sélectionnés, nous pouvons conclure que l'insertion d'un peptide de six acides aminés n'est pas tolérée dans la boucle 1. Cette banque a donc été reconstruite en insérant des peptides aléatoires plus courts, en espérant que ceux-ci soient mieux acceptés par l'enzyme.

1.3. Construction des banques fd-blaA-L₁^{3→5}

1.3.1. Construction des banques fd-blaA-L₁^{3→5}

L'insertion de peptides plus courts dans L₁ a été réalisée de la même manière que la construction de fd-blaA-L₁⁶, la seule différence résidant dans la nature des oligonucléotides utilisés lors de la construction par PCR de la cassette aléatoire (Figure 25, page 59). Trois cassettes aléatoires ont été construites indépendamment. L'amorce LD58 qui contenait les six codons aléatoires a été remplacée par des amorces similaires, ne contenant respectivement que trois, quatre ou cinq codons aléatoires (permettant donc le remplacement des résidus 240-241 par trois, quatre ou cinq acides aminés aléatoires). Ces trois nouvelles cassettes dégénérées (L₁³, L₁⁴ et L₁⁵) ont été clonées entre les sites *Xho*I et *Bbs*I du vecteur fd-blaAΔ1. Ces trois nouvelles banques sont appelées fd-blaA-L₁³, fd-blaA-L₁⁴ et fd-blaA-L₁⁵, le chiffre en exposant indiquant le nombre de résidus aléatoires insérés.

1.3.2. Caractérisation des banques fd-blaA-L₁^{3→5}

La taille des banques obtenues a été estimée à • 7,7.10⁵ clones pour fd-blaA-L₁³

• 5,6.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁⁴

• 9,6.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁⁵

Quelques clones ont été séquencés dans chaque banque. Les séquences obtenues (cf. Tableau 6) montrent que les résidus 240-241 sont remplacés par trois, quatre ou cinq acides aminés aléatoires.

Clone	Séquence en 240-241 (L ₁)
fd-blaA	Glu-Arg
fd-blaA-L ₁ ³ -#1	Thr-Arg-Pro
-#2	Ala-Ala-Arg
-#3	Ala-Pro-Gln
-#4	Ala-Leu-Glu
-#5	X -Gln-Pro
fd-blaA-L ₁ ⁴ -#1	Thr-Phe-Gln-Gln
-#2	Ser-His-Tyr-Thr
-#3	Gly-His-Val-Glu
fd-blaA-L ₁ ⁵ -#1	Ser-Glu-Pro-Thr-Val
-#2	Leu-Asn-Glu-Ala-Asn
-#3	Asn-Pro-Arg-Thr-Lys
-#4	Pro-Arg-Asp-Pro-His

Tableau 6 Séquences en position 240-241 de clones des banques fd-blaA-L₁³, fd-blaA-L₁⁴ et fd-blaA-L₁⁵. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

Des tests de résistance à l'ampicilline ont été effectués de la même manière que pour la banque fd-blaA-L₁⁶. Comme le montre le Tableau 7, les pourcentages de clones actifs dans les trois banques sont à nouveau très faibles.

Banque	Amp ₁₀	Amp ₂₀	Amp ₅₀	Amp ₁₀₀
fd-blaA-L ₁ ³	0,2 %	0,03 %	0,02 %	0,01 %
fd-blaA-L ₁ ⁴	0,03 %	0,007 %	0,003 %	nd
fd-blaA-L ₁ ⁵	0,25 %	0,04 %	0,008 %	0,001 %

Tableau 7 Pourcentage de colonies résistantes à l'ampicilline, pour les banques fd-blaA-L₁³, fd-blaA-L₁⁴ et fd-blaA-L₁⁵. nd signifie non déterminé.

Quelques clones résistants à l'ampicilline ont été séquencés ; les séquences en 240-241 sont reprises dans le Tableau 8. Nous pouvons remarquer qu'il y a de nouveau délétion de la séquence peptidique insérée pour ne garder que deux résidus mutés, et ce, même pour les plus faibles concentrations en ampicilline. Il est étonnant de constater que même une insertion d'un seul résidu⁶ n'est pas tolérée par l'enzyme.

⁶ Dans la banque fd-blaA-L₁³, les deux résidus 240 et 241 sont remplacés par trois acides aminés.

Banque	Amp ₂₀	Amp ₅₀	Amp ₁₀₀
fd-bla4-L ₁ ³	His-Asn (x3) Gly-Gly	His-Asn (x5)	His-Asn (x3)
fd-bla4-L ₁ ⁴	His-Ala Thr-Gln Glu-Arg Ser-Asp Thr-Glu	Glu-Arg (x2) Gly-Asn (x2) Ala-Phe	Glu-Arg (x5)
fd-bla4-L ₁ ⁵	Glu-Cys Glu-Arg His-Asp-Ser-Asn-Gly (x2) Glu-Asp-Ala-Asn-Gly	Glu-Arg (x3)	

Tableau 8 Séquences en position 240-241 de clones des banques fd-bla4-L₁³, fd-bla4-L₁⁴ et fd-bla4-L₁⁵, résistants à l'ampicilline. Amp_n signifie que les séquences appartiennent à des clones résistants à n mg/l en ampicilline. Les séquences en gras correspondent à la séquence sauvage. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

Nous pouvons donc conclure que l'insertion d'acides aminés dans la boucle 1 n'est pas tolérée par la β -lactamase. Cette boucle étant située à l'entrée du site actif, l'insertion doit probablement empêcher l'entrée du substrat dans la cavité catalytique. Nous nous sommes donc orientés vers une autre stratégie qui consiste à remplacer aléatoirement des résidus de la boucle 1 pour créer de la diversité sans insertion peptidique.

2. Ingénierie des boucles 1 et 2

Afin de gagner du temps, nous avons décidé de modifier notre stratégie de construction progressive et l'ingénierie des boucles 1 et 2 a été réalisée dans la même construction. Ceci a pu se faire grâce à l'utilisation de deux amorces dégénérées pour la construction de la cassette de clonage : une amorce permettant de rendre la séquence de la boucle 1 aléatoire et l'autre permettant l'insertion dans la boucle 2.

(a) Remplacement en L₁

Huang *et al.* [155] ont déterminé la tolérance à la mutation de chaque résidu de la β -lactamase TEM-1. Leur stratégie consistait à rendre aléatoire trois codons contigus pour créer une banque contenant toutes les substitutions d'acides aminés possibles pour la région mutagénisée et à sélectionner les clones actifs. Les résultats obtenus pour la boucle 1 sont illustrés Figure 28.

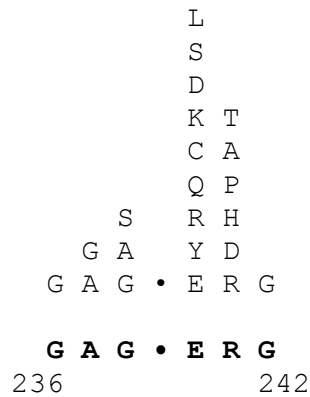


Figure 28 Comparaison de la variabilité de séquence, des résidus 236 à 242, de mutants fonctionnels de la β -lactamase TEM-1⁷. La séquence sauvage de la β -lactamase TEM-1 est montrée en bas. Au-dessus de celle-ci se trouvent les différents résidus identifiés dans les mutants fonctionnels.

Ces données nous ont permis de déterminer les acides aminés à muter dans cette région pour introduire de la diversité sans trop perturber l'activité catalytique de l'enzyme. Etant donné la tolérance à la substitution des résidus Glu₂₄₀ et Arg₂₄₁, nous les avons rendus totalement aléatoires. En ce qui concerne le résidu Gly₂₃₈, nous l'avons rendu partiellement aléatoire : seuls quatre acides aminés (Ser, Ala, Gly et Cys) étaient permis dans la construction.

(b) Insertion en L₂

La boucle 2 est située entre l'hélice α_1 et le brin β_1 de l'enzyme. Cette petite boucle rigide ne comporte que deux résidus et est située loin du site actif (cf. Figure 29).

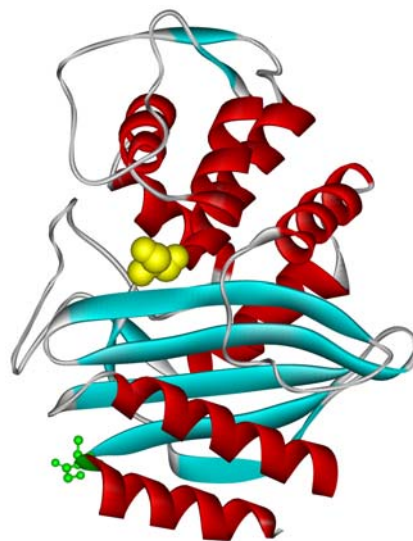


Figure 29 Structure de la β -lactamase. La sérine (Ser₇₀) active est indiquée en jaune et la boucle 2, symbolisée par les résidus 41 et 42, en vert.

⁷ L'acide aminé 239 n'existe pas dans la β -lactamase TEM-1. Ceci est dû à des raisons historiques de numérotation.

Dans un premier temps, nous avons décidé de remplacer les résidus formant la boucle (Gly₄₁ et Ala₄₂) par six, sept, huit ou neuf acides aminés aléatoires.

2.2. Construction des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{6→9}

2.2.1. Construction du vecteur de clonage 3 : fd-blaAΔ2

Le vecteur de clonage utilisé précédemment, fd-blaAΔ1 (cf. Figure 27, page 62) a été transformé de manière à contenir un site de restriction *Bbs*I juste en amont de L₂. En pratique, deux oligonucléotides complémentaires contenant cette mutation ont été hybridés et clonés entre les sites *Apa*LI et *Xho*I de fd-blaAΔ1. Ce nouveau vecteur de clonage (décrit à la Figure 30) est appelé fd-blaAΔ2. Il possède la même délétion que fd-blaAΔ1.

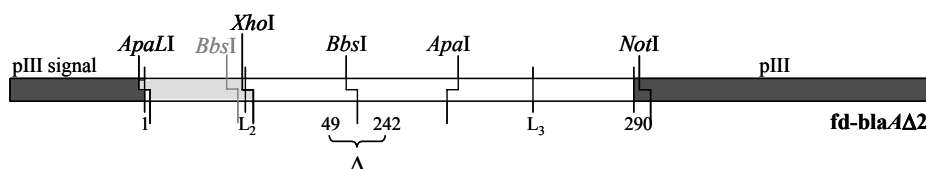


Figure 30 Vecteur de clonage 3 : fd-blaAΔ2. Un site de restriction *Bbs*I (en gris) est créé par mutation des codons 40 et 41. Cette construction a été réalisée par clonage d'une cassette synthétique (en gris clair) entre les sites *Apa*LI et *Xho*I de fd-blaAΔ1.

Après la ligation de la cassette synthétique dans fd-blaAΔ1 et électroporation dans les cellules bactériennes, le gène de la β-lactamase de quelques clones a été amplifié par PCR. Le clone attendu a été recherché par séquençage des fragments de PCR.

2.2.2. Construction des cassettes dégénérées L₁^RL₂^{6→9}

Les cassettes de clonage ont été construites par PCR sur fd-blaA en utilisant des amorces dégénérées (cf. Figure 32). L'amorce permettant le remplacement aléatoire des résidus 238 à 241 contient trois codons aléatoires : MNN-MNN-RSM⁸. Cette séquence devient KSY-NNK-NNK dans le brin codant. Le codon KSY permet le remplacement de Gly₂₃₈ par Ala, Gly, Cys ou Ser (cf. Figure 31), tandis que les résidus Glu₂₄₀ et Arg₂₄₁ sont remplacés par les 20 résidus possibles.

⁸ M=[A, C], R=[A, G], K=[G, T], S=[G, C], Y=[C, T] et N=[A, C, G, T].

		Deuxième position					
		U	C	A	G		
Première position (extrémité 5')	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	Troisième position (extrémité 3')
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C	
		UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A	
		UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U	
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C	
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A	
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G	
	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
	G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
		GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

Figure 31 Code génétique. Les codons correspondant à la séquence KSY sont indiqués en gris.

Les secondes amorces contiennent six, sept, huit ou neuf codons aléatoires (NNK), permettant le remplacement des résidus Gly₄₁ et Ala₄₂ par respectivement six, sept, huit ou neuf acides aminés aléatoires. Toutes les amorces contiennent également un site de restriction *Bbs*I permettant le clonage ultérieur de la cassette dans le vecteur de clonage. Les quatre cassettes de clonage ont été construites indépendamment.

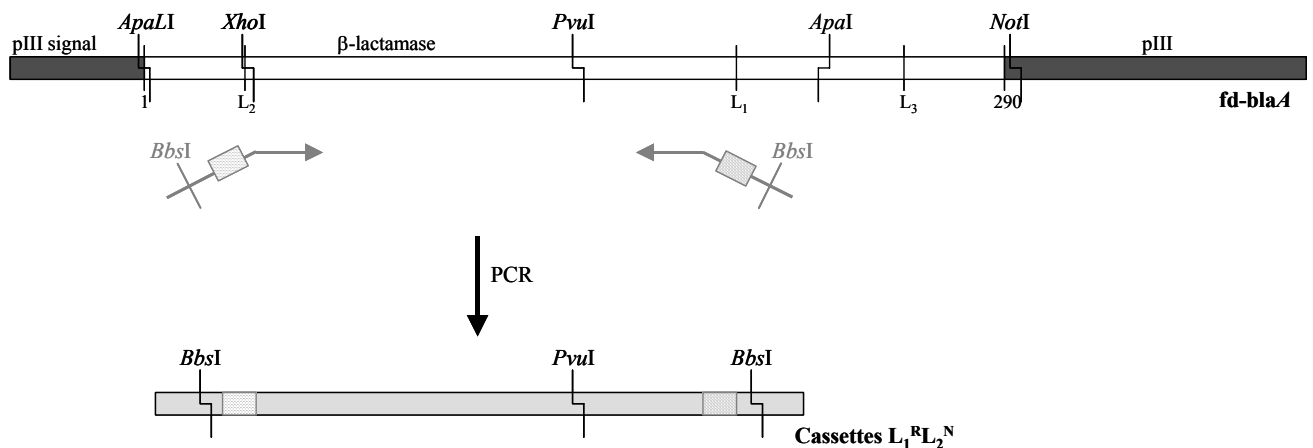


Figure 32 Construction des cassettes de clonage L₁^RL₂⁶, L₁^RL₂⁷, L₁^RL₂⁸ et L₁^RL₂⁹ par PCR sur *fd-bla4*. Les amorces utilisées, indiquées en gris, contiennent chacune une séquence dégénérée (■ en L₁ et □ en L₂) et un site de restriction *Bbs*I.

2.2.3. Construction des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{6→9}

Les quatre cassettes dégénérées (L₁^RL₂⁶, L₁^RL₂⁷, L₁^RL₂⁸ et L₁^RL₂⁹) ont été clonées entre les deux sites *Bbs*I du vecteur fd-blaAΔ2. Ces quatre nouvelles banques sont appelées fd-blaA-L₁^RL₂⁶, fd-blaA-L₁^RL₂⁷, fd-blaA-L₁^RL₂⁸ et fd-blaA-L₁^RL₂⁹ (L₁^R pour remplacement dans la boucle 1 et L₂ⁿ pour insertion de n résidus aléatoires dans la boucle 2) et sont décrites à la Figure 33. Après ligation et restriction par *Bbs*I, l'ADN de la banque a été électroporé dans les cellules bactériennes TG1.

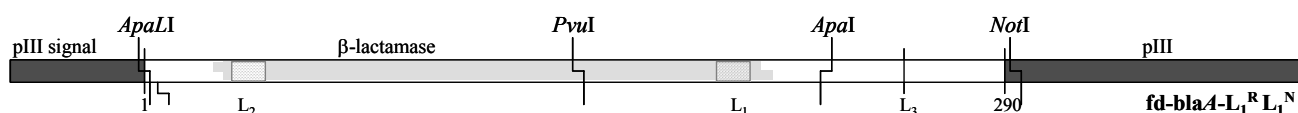


Figure 33 Banque fd-blaA-L₁^RL₂^{6→9}. L'insertion des cassettes L₁^RL₂^{6→9} (indiquées en gris clair) est réalisée entre les deux sites de restriction *Bbs*I de fd-blaAΔ2. Les sites *Bbs*I sont excisés pendant le clonage. Les codons 238 à 241 sont remplacés par trois codons aléatoires (□) et les codons 41 et 42 ont été remplacés par six, sept, huit ou neuf codons aléatoires (▨).

2.2.4. Caractérisation des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{6→9}

La taille des banques obtenues a été estimée à

- 1,6.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂⁶
- 2,2.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂⁷
- 1,2.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂⁸
- 1,7.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂⁹

Quelques clones ont été séquencés dans chaque banque. Les séquences obtenues (cf. Tableau 9) montrent que les résidus 41 et 42 sont remplacés par six, sept, huit ou neuf acides aminés aléatoires et les résidus 238 à 241 sont mutés, sans insertion peptidique.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁶ -#1	His-Ser-Met-Gly-Arg-Trp	X -Asp-Lys
-#2	Leu-Val-Trp-Pro-Gly-Ala	Cys-His-Thr
-#3	Gln-Ala-Arg-Arg-Trp-Glu	Ala-Ile-Ala
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁷ -#1	Gly-Leu- Stop -Gln-Phe-Gly-Gly	Ala-Thr-Pro
-#2	His-Met-Ser-Asp-Ala-Arg-Thr	Gly-Val-Cys
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁸ -#1	Asp-Pro-Arg-Arg-Val-Ile-Ala-Leu	Gly-Val-Pro
-#2	Arg- X -Ala-Gly-Ser-Thr-Phe-Gln	nd
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁹ -#1	Ala-Gln-Gly-Trp-Tyr-Ser-Leu- X -Leu	nd
-#2	Pro-Leu- Stop -Trp-Arg-Ile-Ile-Ser-Trp	Gly-Tyr-Val
-#3	Met-Thr-Pro-Tyr-Cys-Ala-Ala-Ala-Arg	Gly-Ser-Ile
-#4	X -Ser- X - X -Arg- Stop -Val-Asn-Gly	Ser-Val-Thr

Tableau 9 Séquences en positions 41-42 et 238-241 de clones des banques fd-bla4-L₁^RL₂⁶, fd-bla4-L₁^RL₂⁷, fd-bla4-L₁^RL₂⁸ et fd-bla4-L₁^RL₂⁹. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible et nd, non déterminé.

Des tests de résistance à l'ampicilline ont été réalisés et ceux-ci montrent à nouveau un très faible pourcentage de clones actifs pour les quatre banques (cf. Tableau 10).

Banque	Amp ₂₀	Amp ₅₀	Amp ₁₀₀
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁶	0,08%	0,02%	0,001%
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁷	0,07%	0,02%	0,005%
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁸	0,08%	0,03%	0,01%
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁹	0,09%	0,03%	0,008%

Tableau 10 Pourcentage de colonies résistantes à l'ampicilline, pour les banques fd-bla4-L₁^RL₂⁶, fd-bla4-L₁^RL₂⁷, fd-bla4-L₁^RL₂⁸ et fd-bla4-L₁^RL₂⁹.

Cependant, le séquençage de clones résistants à 100 mg/l d'ampicilline (cf. Tableau 11), montre que, pour les banques contenant les inserts de sept, huit ou neuf acides aminés dans la boucle L₂, deux cystéines sont à chaque fois présentes comme premier et dernier résidu de l'insert aléatoire. Cette observation suggère que la formation d'un pont disulfure est nécessaire dans l'insert en L₂ pour garder la structure de l'enzyme, et donc pour avoir une activité catalytique. Nous pouvons également noter que la diversité en L₁ diminue après sélection pour activité. En effet, nous trouvons préférentiellement une glycine en position 238, qui est le résidu de la séquence sauvage.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁶ -Amp ₁₀₀ -#1 (x3) -#2	Ser-Ala-Lys-Ala-Arg-Ala Ala-Ala-Thr-Gly-His-Ala	Gly-Asp-His Gly-Glu-Asn
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁷ -Amp ₁₀₀ -#1 -#2 (x2)	Cys -Thr-Pro-Gly-Gln-Ser- Cys Cys -Ser-Thr-Ala-Asp-Asn- Cys	Gly-Leu-Asn Ala-Pro-His
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁸ -Amp ₁₀₀ -#1 -#2 -#3	Cys -Ala-Leu-Ser-Gly-Arg-Tyr- Cys Cys -Val-Arg-Glu-Val-Gln-Ser- Cys Cys -Arg-Arg-Arg-Asp-Val-Asn- Cys	Gly-Leu-Asn Gly-Gln-Asn Gly-Ala-Gln
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ⁹ -Amp ₁₀₀ -#1 (x2) -#2 (x2)	Cys -Met-Asp-Ala-Ala-Val-Pro-Tyr- Cys Cys -Arg-Arg-Val-Ala-Gly-Lys-Val- Cys	Gly-Glu-Ala Gly-Leu-Gln

Tableau 11 Séquences en positions 41-42 et 238-241 de clones des banques fd-bla4-L₁^RL₂⁶, fd-bla4-L₁^RL₂⁷, fd-bla4-L₁^RL₂⁸ et fd-bla4-L₁^RL₂⁹, résistants à 100 mg/l d'ampicilline. Le nombre entre parenthèses indique que la même séquence a été trouvée plusieurs fois.

La présence potentielle d'un pont disulfure a été étudiée par Julie Deherve dans le cadre de son travail de mémoire. L'activité catalytique des phages de quatre clones de la banque fd-bla4-L₁^RL₂⁹ comportant les deux cystéines a été mesurée. Ces mesures ont été réalisées en présence ou non de dithiothréitol⁹, à température ambiante. La β -lactamase TEM-1 possède déjà un pont disulfure entre les résidus 77 et 123, mais celui-ci n'est pas essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme [165]. L'effet du dithiothréitol sur l'activité des mutants n'est pas différent par rapport à son effet sur le phage fd-bla4 sauvage. La formation ou non d'un pont disulfure ne perturbe donc pas l'activité enzymatique. La résistance à la dénaturation thermique a ensuite été testée. Les phage-enzymes ont été incubés pendant 5 min. à différentes températures, en présence ou non de dithiothréitol et l'activité enzymatique a ensuite été mesurée. Pour les quatre clones testés, ainsi que pour le phage-enzyme sauvage, l'activité diminue plus rapidement (en fonction de la température du choc) en présence de dithiothréitol. Par contre, cette diminution est plus importante pour les quatre mutants par rapport au phage-enzyme sauvage. Les courbes obtenues pour un clone sont décrites à la Figure 34 ; des courbes du même type ont été obtenues pour les trois autres clones. La formation d'un pont disulfure serait donc importante pour la stabilité de l'enzyme.

⁹ Le dithiothréitol est un agent réducteur qui clive les ponts disulfures.

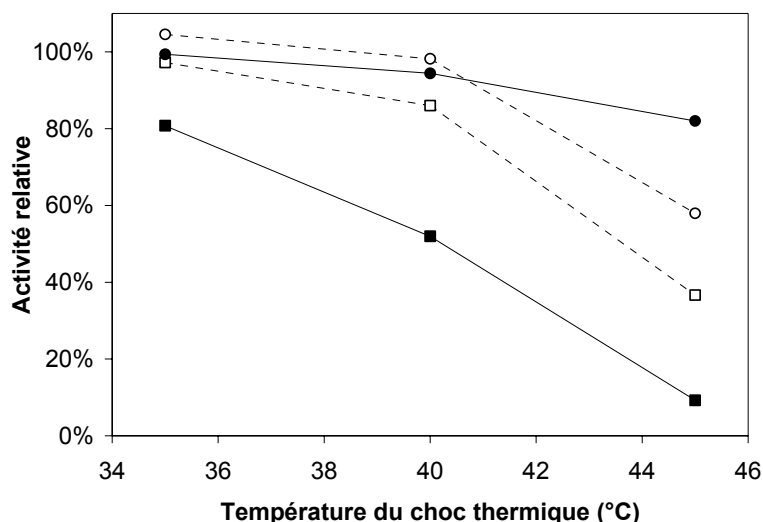


Figure 34 Graphique de l'activité résiduelle après incubation des phages-enzymes pendant 5 minutes à une température donnée. L'activité relative d'un clone, contenant les deux cystéines, isolé de la banque fd-blaA-L₁^RL₂⁷ en présence (■) ou en absence de DTT (●) est comparée avec celle du phage sauvage, fd-blaA, en présence (□) ou en absence de DTT (○).

Compte tenu de ces résultats, les banques fd-blaA-L₁^RL₂⁷, fd-blaA-L₁^RL₂⁸ et fd-blaA-L₁^RL₂⁹ ont été reconstruites en fixant les cystéines pour augmenter le pourcentage de clones actifs.

2.3. Construction des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}

2.3.1. Construction des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}

Trois cassettes dégénérées (L₁^RL₂^{C5C}, L₁^RL₂^{C6C} et L₁^RL₂^{C7C}) ont été construites de la même manière que les cassettes L₁^RL₂^{7→9}, la seule différence étant la fixation des deux codons cystéines de part et d'autre de la partie dégénérée des amorces permettant l'insertion en L₂. Elles ont ensuite été clonées entre les deux sites *Bbs*I du vecteur fd-blaAΔ2. Ces trois nouvelles banques sont appelées fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C}, fd-blaA-L₁^RL₂^{C6C} et fd-blaA-L₁^RL₂^{C7C}, CnC signifiant insert de n résidus aléatoires flanqué de deux cystéines.

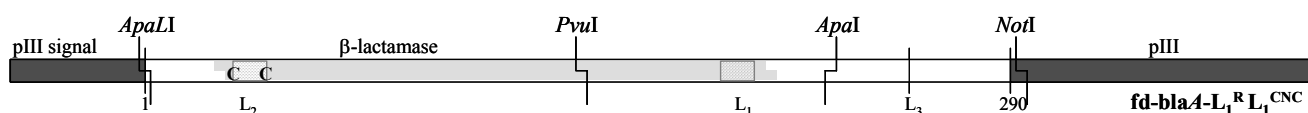


Figure 35 Banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}. L'insertion des cassettes L₁^RL₂^{C5C→C7C} (en gris clair) a été réalisée entre les deux sites *Bbs*I de fd-blaAΔ2. Les codons 238 à 241 sont remplacés par trois codons aléatoires (■) et les codons 41 et 42 sont remplacés par cinq, six ou sept codons aléatoires (■) flanqués de deux codons cystéine (C).

2.3.2. Caractérisation des banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}

La taille des banques obtenues a été estimée à • 2,9.10⁶ clones pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}

• 1,3.10⁶ clones pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C}

• 5,1.10⁶ clones pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}

Treize clones ont été séquencés dans chaque banque. Les séquences obtenues sont difficilement lisibles ; cependant nous avons pu constater que l'insertion en L₂ et le remplacement en L₁ sont bien présents dans dix clones. La séquence des trois derniers clones est celle du vecteur de clonage, fd-bla4Δ2. Ce vecteur étant inactif, il est éliminé lors de la sélection des banques pour activité catalytique (cf. page 75).

Des tests de résistance à l'ampicilline ont à nouveau été réalisés. Comme le montre le Tableau 12, la résistance à l'ampicilline de ces trois nouvelles banques est assez élevée pour garantir une bonne diversité après sélection pour activité catalytique. La présence des deux cystéines de part et d'autre de l'insert en L₂ est donc bien nécessaire pour obtenir des banques actives.

Banque	Amp ₁₀	Amp ₂₀	Amp ₅₀	Amp ₁₀₀
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C}	9,9 %	4,9 %	2,5 %	0,7 %
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C}	10,7 %	8,6 %	3,6 %	1,7 %
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C}	6,1 %	4,7 %	2 %	1,5 %

Tableau 12 Pourcentages de colonies résistantes à l'ampicilline pour les banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C} et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}.

Quelques clones résistants à l'ampicilline ont été caractérisés par séquençage. Comme le montre le Tableau 13, les clones séquencés sont bien construits, sauf le clone fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}-Amp₁₀₀-#3 qui ne possède que six codons entre les deux cystéines en L₂, à la place des sept attendus. Aucun des clones séquencés n'est identique à un autre.

	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C} -Amp ₁₀₀ -#1	Cys-Ser-Gly-Ser-Phe-Ser-Cys	Gly-Lys-Asn
-Amp ₁₀₀ -#2	Cys-Tyr-Gln-Thr-Pro-Ala-Cys	Ala-Gly-Asn
-Amp ₅₀ -#1	Cys-Asn-Gly-Thr-Leu-Asn-Cys	Gly-Met-Lys
-Amp ₅₀ -#2	Cys-Arg-His-Leu-Ala-Tyr-Cys	Gly-Lys-Ser
-Amp ₂₀ -#1	Cys-Asn-Phe-Ser-Val-His-Cys	Gly-Arg-Gln
-Amp ₂₀ -#2	Cys-His-Phe-Val-Ser-Arg-Cys	Gly-Tyr-Arg
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} -Amp ₁₀₀ -#1	Cys-Arg-Ser-Ala-Ser-Pro-Ser-Cys	Gly-Arg-Met
-Amp ₁₀₀ -#2	Cys-Leu-Tyr-Ala-Asp-Pro-Tyr-Cys	Gly-Ser-Trp
-Amp ₁₀₀ -#3	Cys-Arg-Ala-Ala-Val-Ile-Pro-Cys	Ala-Lys-His
-Amp ₅₀ -#1	Cys-Gly-Leu-Gly-Ser-Arg-Pro-Cys	Gly-Lys-Val
-Amp ₅₀ -#2	Cys-Gly-Arg-Gly-Ser-Ser-Ser-Cys	Gly-Cys-Asn

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} -Amp ₅₀ -#3	Cys-Pro-Ser-Gly-Trp-Gly-Gly-Cys	Gly-Arg-Tyr
-Amp ₂₀ -#1	Cys-Val-Arg-Ser-Leu-Leu-Leu-Cys	Gly-Lys-Asn
-Amp ₂₀ -#2	Cys-Tyr-Met-Lys-Ser-Leu-Ser-Cys	Gly-Arg-Gly
-Amp ₂₀ -#3	Cys-Gln-Leu-Leu-Gly-Gly-Ser-Cys	Gly-Gly-Ala
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C} -Amp ₁₀₀ -#1	Cys-Val-Ile-Ser-Thr-Asp-Pro-Ser-Cys	Gly-Ser-Ala
-Amp ₁₀₀ -#2	Cys-Val-Thr-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Cys	Ala-Ala-Gln
-Amp ₁₀₀ -#3	Cys-Leu-Asp-Ser-Ser-Phe-Thr-Cys	Gly-Gly-Arg
-Amp ₅₀ -#1	Cys-Ala-Glu-Ser-Val-Ala-Ser-Ala-Cys	Gly-Thr-Arg
-Amp ₅₀ -#2	Cys-Ser-Leu-Val-Val-Lys-Ser-Arg-Cys	Gly-Gly-Tyr
-Amp ₅₀ -#3	Cys-Leu-Phe-Val-Ala-Ser-Arg-Gly-Cys	Gly-Leu-Arg
-Amp ₂₀ -#1	Cys-Pro-Gly-Ser-Gln-Phe-Ser-Gly-Cys	Ala-Gly-Asn
-Amp ₂₀ -#2	Cys-Arg-Gly-Tyr-Leu-Ser-Arg-Ile-Cys	Gly-His-Ala

Tableau 13 Séquences en positions 41-42 et 238-241 de clones des banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C} et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}, résistants à l'ampicilline.

2.3.3. Sélection *in vivo* des banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C} pour activité catalytique

Ces trois banques ont été sélectionnées pour ne garder que les phage-enzymes conférant une résistance bactérienne à l'ampicilline d'au moins 5 % de celle conférée par le phage-enzyme sauvage. En pratique, les bactéries transformées par les banques ont été étalées sur de grandes boîtes LB-Agar contenant 7,5 mg/l de tétracycline et 20 mg/l d'ampicilline. Après incubation à 37°C pendant une nuit, les bactéries ont été raclées avec du LB et centrifugées. Les phage-enzymes ont été purifiés à partir du surnageant et leur activité catalytique a été mesurée (cf. Tableau 14). Les activités obtenues sont assez élevées.

Banque	k _{obs}
fd-bla4	1.500 s ⁻¹
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C}	388 s ⁻¹
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C}	287 s ⁻¹
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C}	251 s ⁻¹

Tableau 14 Activité catalytique des phage-enzymes des banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C} et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}, sélectionnées pour résistance à 20 mg/l en ampicilline.

La taille des trois banques sélectionnées pour activité enzymatique a été estimée à

- 1,4.10⁵ clones pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}
- 1,1.10⁵ clones pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C}
- 2,4.10⁵ clones pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}

Ce qui nous fait un total de $4,9 \cdot 10^5$ clones différents. Cette diversité de clones actifs est suffisante pour utiliser ces banques dans la construction de la banque de seconde génération.

3. Ingénierie des boucles 1, 2 et 3

La boucle 3 est située entre le brin $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 8$ de la β -lactamase (cf. Figure 36). Elle est formée par six résidus et est connue pour accepter aisément une insertion peptidique. En effet, Hallet *et al.* [156] ont réalisé des insertions peptidiques de cinq résidus de façon aléatoire le long du gène de la β -lactamase TEM-1. Deux insertions ont été observées au niveau de la boucle 3 : en position 270 et 272 ; ces deux mutants possèdent une activité d'au moins 50 % par rapport l'activité sauvage.

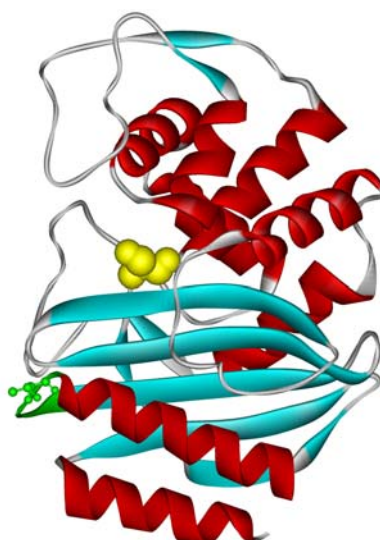


Figure 36 Structure de la β -lactamase. La sérine (Ser_{70}) active est indiquée en jaune et la boucle 3, symbolisée par le résidu 271, en vert.

L'ingénierie de la boucle 3 a déjà été réalisée précédemment au laboratoire par Daniel Legendre [136]. Le résidu Thr_{271} a été remplacé par six acides aminés aléatoires. La banque obtenue, nommée lib3B, a une taille de $2 \cdot 10^8$ clones et 7 % des clones ont une activité enzymatique supérieure à 2 % de l'activité sauvage. L'activité catalytique de la banque sélectionnée est de 239 s^{-1} . Il était raisonnable de penser que la combinaison de cette banque avec nos banques $\text{fd-blaA-L}_1^{\text{R}}\text{L}_2^{\text{C5C}}$, $\text{fd-blaA-L}_1^{\text{R}}\text{L}_2^{\text{C6C}}$ et $\text{fd-blaA-L}_1^{\text{R}}\text{L}_2^{\text{C7C}}$ pourrait permettre la création d'une banque de seconde génération de grande taille et avec un haut pourcentage de clones actifs.

3.1. Construction des banques $\text{fd-blaA-L}_1^{\text{R}}\text{L}_2^{\text{C5C} \rightarrow \text{C7C}}\text{L}_3^6$

Pour construire les banques de seconde génération possédant les trois boucles aléatoires, une PCR a été réalisée sur la banque lib3B sélectionnée pour activité catalytique. Le fragment de

PCR a ensuite été cloné dans les banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}, contenant le remplacement dans la boucle 1 et l'insertion flanquée de deux cystéines dans la boucle 2.

3.1.1. Construction des cassettes dégénérées L₃⁶

La cassette de clonage L₃⁶ a été construite par PCR sur l'ADN de la banque lib3B, sélectionnée pour activité catalytique. Une des amorces utilisées contient la mutation permettant l'introduction du site de restriction *ApaI* (cf. Construction du vecteur initial : fd-bla4, page 54).

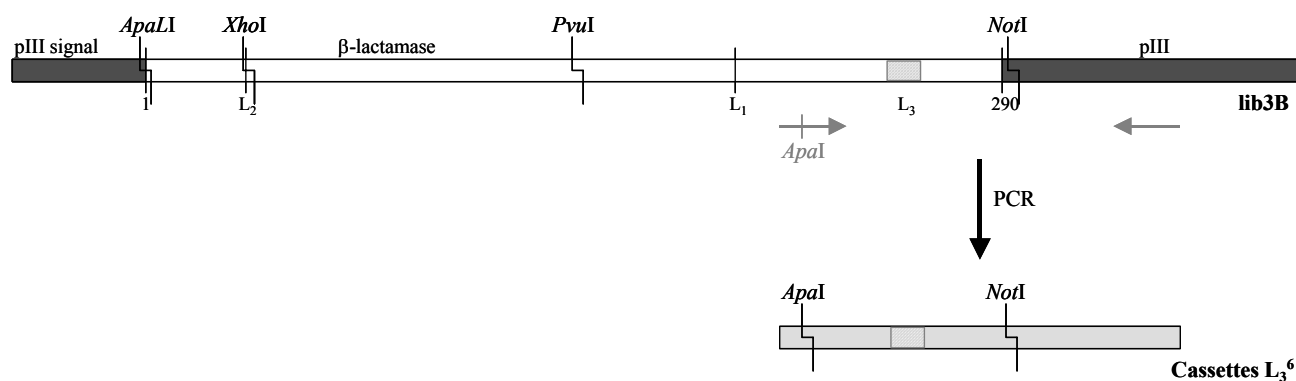


Figure 37 Construction de la cassette de clonage L₃⁶ par PCR sur la banque lib3B. Une des amorces contient la mutation permettant l'insertion du site de restriction *ApaI*. La partie dégénérée en L₃ est indiquée (■).

Le nombre de cycles de PCR a été optimisé de sorte à ne pas biaiser l'amplification de la banque. Après chaque cycle, une partie du mélange de PCR a été analysé sur gel d'agarose. Chaque puits correspond au nombre de cycles subi. Comme le montre la Figure 60, la quantité d'ADN n'augmente plus à partir du cycle 19. L'amplification de la banque lib3B a donc été réalisée par 18 cycles de PCR, afin d'éviter les cycles 'inutiles'.

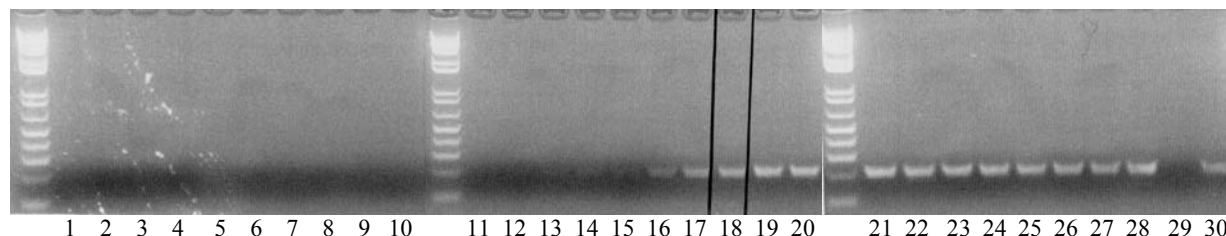


Figure 38 Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après différents cycles de PCR sur l'ADN de la banque lib3B.

3.1.2. Construction des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶

La cassette aléatoire L₃⁶ et l'ADN des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C}, fd-blaA-L₁^RL₂^{C6C} et fd-blaA-L₁^RL₂^{C7C} ont été clivés par *ApaI* et *NotI*. La ligation de la cassette a été réalisée indépendamment dans les trois banques de première génération. Ces nouvelles banques sont appelées fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶, fd-blaA-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶ et fd-blaA-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶ (L₃⁶ pour insertion de six résidus dans la boucle 3) et sont décrites dans la Figure 39.

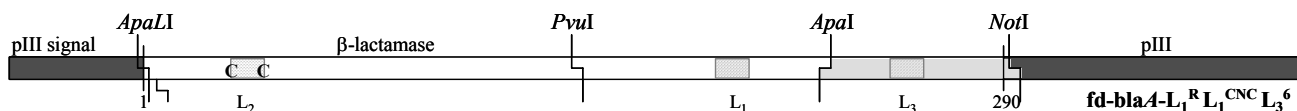


Figure 39 Banque fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶. L'insertion de la cassette L₃⁶ (en gris clair) a été réalisée entre les sites *ApaI* et *NotI* de fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}, permettant le remplacement du codon 271 par les six codons de la banque lib3B.

Après électroporation des mélanges de ligation dans les bactéries, celles-ci ont directement été mises en culture liquide dans du LB contenant de la tétracycline. Après une nuit d'incubation à 37°C, les cultures ont été centrifugées et le surnageant a été utilisé pour la préparation de phages.

3.1.3. Caractérisation des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶

Malheureusement, nous ne disposons d'aucun moyen pour éliminer les vecteurs de clonage qui sont en fait les trois banques de première génération fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C}, fd-blaA-L₁^RL₂^{C6C} et fd-blaA-L₁^RL₂^{C7C}. Nous avons dû nous y reprendre à plusieurs fois et optimiser chaque étape pour construire les banques de seconde génération contenant le moins de vecteurs de clonage possible. Nous avons finalement réussi à construire des banques dont la taille a été estimée à

- 8.10⁶ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶
- 2.10⁸ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶
- 8,8.10⁷ clones pour fd-blaA-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶

Cela nous permet donc d'obtenir une banque finale de 2,9.10⁸ clones. La faible diversité obtenue pour la banque fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶ est due à une défaillance technique de l'électroporateur. Quelques clones ont été séquencés au niveau des boucles 1 et 3. Le début du gène de la β-lactamase (où est située la boucle 2) n'a pas été séquencé. Ceci nous permet néanmoins de savoir si les vecteurs ont bien intégré la cassette aléatoire contenant la dégénérescence en L₃. Comme le montre le Tableau 15, seul un clone sur les 28 séquencés ne possède pas l'insertion en L₃ mais une mutation du résidu Thr₂₇₁. Si nous extrapolons ce rapport 1/28 sur la banque totale, cela

signifie qu'environ 10^7 clones sont mal construits, ce qui ne représente qu'une faible partie de la banque.

Clone	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Glu-Arg	Thr	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C} L ₃ ⁶ -#1	Ala-His-His	Ser-Lys-Met-Pro-Ala-Ser	
-#2	Gly-Pro-Asp	Thr-Ser-Arg-Ile-Ala-Ser	
-#3	Ser-Gln-Thr	Thr-Pro-Gly-Lys-Ala-Asn	
-#4	Gly-Asn-Ala	Thr-Asn-Arg-Pro-Thr-Ser	
-#5	Gly-Pro-Asp	Thr-Ser-Arg-Ile-Ala-Ser	
-#6	Ala-Glu-Asn	Lys- X -Gln-Trp-Ile- X	
-#7	Gly-Arg-His	Pro-Gly-Glu-Glu-Arg-Gly	
-#8	Gly-Gln-Glu	Asn-Lys-Asn- X -Pro-Ser	
-#9	Gly-Ala-Leu	Ala-Ile-Ala-Phe-Pro-Ser	
-#10	Ala-Lys-His	Arg-Thr-Glu-Phe-Pro-Gly	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} L ₃ ⁶ -#1	Gly-Lys-His	Gly-Ala-Ser-Asp-Val-Gly	Ala ₂₇₀ →Thr
-#2	Ala-Asn-Asn	His-Met-Thr-Glu-Pro-Thr	
-#3	Gly-Trp-Asn	Thr-Ser-Ile-Lys- X -Thr	Gln ₂₆₉ →Arg
-#4	Gly-Ala-Arg	Arg-Ala-Glu-Gln-Val-Ser	Ala ₂₇₀ →Glu
-#5	Gly-Lys-Ala	Ser-Gly-Thr-Tyr-Ser-Thr	
-#7	Ser-Glu-His	Lys-Gln- X -Tyr- X -Ser	
-#8	Gly-Asn-Arg	Asn-Ser-Pro-Gln-Arg-Gly	
-#9	Gly-Arg-His	Gln-Gly-Arg-Glu-Pro-Thr	
-#10	Gly-Arg-His	Lys-Tyr-Lys-Glu-Val-Gly	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C} L ₃ ⁶ -#1	Ser-Glu-Ala	Glu-Gly-Glu-Pro-Ile-Gly	
-#2	Gly-Thr-Leu	Gly-Ser-Arg-Gly-Ser-Thr	
-#3	Gly-Pro-Arg	Arg-Ala-Lys-Thr-Val-Ala	
-#4	Gly-Ala-Gln	Ser-Arg-Gly-Tyr-Ala-Thr	
-#5	Gly-Thr-Lys	Leu-Cys-Arg-Asn-Ala-Cys	
-#6	Gly-Pro-Asn	Lys-His-Arg-Ala-Ile-Thr	
-#7	Ser-Pro-Asn	Thr-Ser-Leu-Phe- X -Thr	
-#8	Ala-Lys-Val	Gly	
-#10	Ser-Ala-Asp	Asn-Gly-Ser-Glu-Val-Thr	

Tableau 15 Séquences en positions 238-241 et 271 de clones des banques pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶ et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

L'infectivité des phages des trois banques a ensuite été évaluée. En effet, l'infection des bactéries par les phages se fait grâce à la pIII (cf. Structure des phages filamenteux, page 26) et la fusion pIII–enzyme pourrait risquer de perturber cette infection. En pratique, d'une part, la concentration des solutions de phages a été mesurée par densité optique et d'autre part, des infections de bactéries par ces solutions ont été réalisées. Nous avons obtenu des pourcentages d'infection compris entre 0,5 et 3 %, selon les préparations de phages ; ce qui est du même ordre de grandeur que les phages fd-bla sauvages.

Les phages du mélange des trois banques ont également été caractérisés par Western Blot. Cette technique permet de mettre en évidence la protéine de fusion pIII- β -lactamase. En pratique, les phages ont été produits à partir de cultures bactériennes réalisées à 23°C, 30°C ou 37°C. Les phages ont ensuite subi une dénaturation thermique permettant la libération des protéines. Celles-ci ont été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane. La révélation a été réalisée avec un anticorps de souris dirigé contre la protéine pIII du phage et un anticorps 'anti-souris' couplé à la phosphatase alcaline. Comme le montre la Figure 40, les phages produits à 37°C montrent le plus faible rapport protéine de fusion / pIII libre, tandis que ce rapport est à peu près le même pour les phages produits à 23°C ou à 30°C. Ceci s'explique par la protéolyse bactérienne qui est plus efficace à 37°C et que les phages la subissent principalement au niveau du peptide connectant la β -lactamase à la pIII. Nous pouvons également constater que le taux de présentation sur phage des enzymes mutantes est plus faible que celui de l'enzyme sauvage.

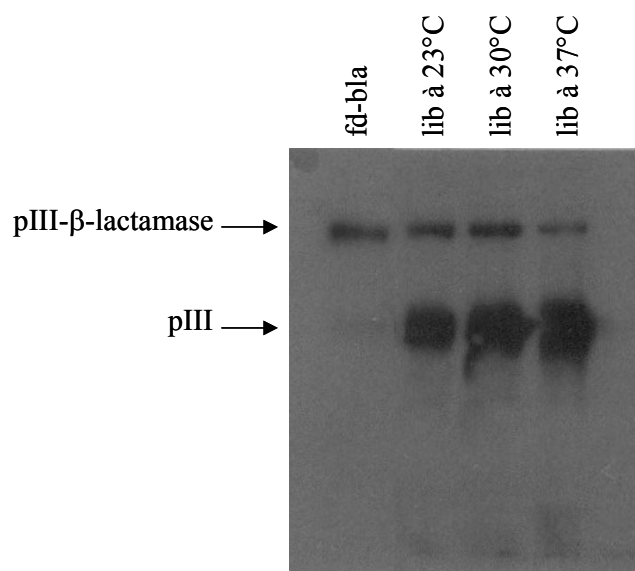


Figure 40 Western blot des phages fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ produits à 23°C, 30°C ou 37°C, comparés aux phages fd-bla sauvage.

L'activité enzymatique du mélange des trois banques a été mesurée et le k_{obs} obtenu est de 95 s⁻¹. La résistance à l'ampicilline a ensuite été caractérisée par étalement des bactéries transformées sur des boîtes contenant ou non de l'ampicilline à une concentration de 20 mg/l. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 16.

Banque	Amp ₂₀
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C} L ₃ ⁶	6,7 %
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} L ₃ ⁶	3,5 %
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C} L ₃ ⁶	6,5 %

Tableau 16 Pourcentages de colonies résistantes à 20 mg/l en ampicilline, pour les banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶ et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶.

Quelques clones résistants ont été séquencés au niveau des boucles 1 et 3 (cf. Tableau 17) et nous avons remarqué qu'ils possèdent tous les modifications apportées en position 238-241 mais que la majorité ne contient pas d'insertion en position L₃ : sur les 24 clones séquencés, un seul est bien construit, 18 possèdent la séquence sauvage, Thr, à la position 271 et les cinq derniers clones possèdent un résidu 271 muté, sans l'insertion de six acides aminés. Le clone #4 de la banque fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶ possède la séquence en acides aminés sauvage en L₁ mais la séquence nucléotidique est différente.

Clone	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Glu-Arg	Thr	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#2	Gly-Arg-Met	Thr	
-#3	Gly-Lys-Thr	Thr	
-#4	Gly-Glu-Arg	Thr	
-#5	Gly-Arg-Asn	Gly	
-#6	Gly-Gln-Asn	Thr	
-#7	Gly-Gly-Ala	Thr	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#1	Gly-Gln-Arg	Thr	
-#2	Gly-Gln-Ser	Thr	
-#3	Gly-Gln-Ala	Pro	
-#5	Gly- X -Asn	His- X -Gly- X - X -Gly	
-#6	Gly-Gly-Ser	Thr	
-#7	Gly-Gln-His	Thr	
-#8	Gly- X -Gly	Thr	
-#9	Gly-Ala-Arg	Thr	

Clone	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#1	Gly- X -Gln	Thr	Ala ₂₇₀ →Ser
-#2	Gly-Ser-Trp	Thr	
-#3	Gly-Ala-Met	Ser	
-#4	Ala-Thr-His	Thr	
-#5	Gly-Arg-His	Thr	
-#6	Gly-Gly-Ala	Pro	
-#7	Gly-Ala-Arg	Thr	
-#8	Ala-Ala-Thr	Thr	
-#9	Gly-Gln-Arg	Thr	
-#10	Gly-Leu-Arg	Pro	

Tableau 17 Séquences en positions 238-241 et 271 de clones des banques pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶ et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶, résistants à 20 mg/l d'ampicilline. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

Par la suite, nous avons séquencé 96 clones résistants supplémentaires, afin d'avoir une meilleure approximation de la quantité de clones actifs bien construits. Tout le gène de la β -lactamase a été séquencé et, pour tous les clones, les boucles 1 et 2 possèdent la dégénérescence introduite. En ce qui concerne la boucle 3,

- 8 clones possèdent l'insertion de 6 résidus,
- 3 clones possèdent une insertion peptidique, mais plus courte,
- 25 clones ne contiennent pas d'insertion, mais le résidu 271 est néanmoins muté, et
- 60 clones contiennent la séquence sauvage en 271.

La séquence des 11 clones possédant un insert dans la boucle 3 est montrée dans le Tableau 25. Comme nous l'avons observé pour les insertions dans la boucle 1, il semblerait qu'il y ait également excision du peptide inséré dans la boucle 3, qui expliquerait les mutations, sans insertion, en 271 ou la présence de peptides plus courts.

Clone	Séquence en 41-42 (L ₂)	Séquence en 238-241 (L ₁)	Séquence en 271 (L ₃)	Autres mutations
fd-bla4	Gly-Ala	Gly-Glu-Arg	Thr	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#3 -#20	Cys-Tyr-Asn-Ala-Gly-Ser-Cys Cys-Arg-Thr-Leu-Ile-His-Cys	Gly-Gly-Asn Gly-Leu-Asn	Arg-Val-Thr Thr-Gly	Ala ₂₇₀ →Glu
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#2 -#7 -#12 -#18 -#28 -#31 -#32	nd Cys-Val- X -Gly-Gly-Gln-Met-Cys Cys-Ala-Gly-Leu-Ala-Thr-Ala-Cys Cys-Arg-Ala-His-Phe-Ala-Asn-Cys Cys-Gly-Val-His-Trp-Arg-Ser-Cys Cys- X -Ser-Gln-His-Asp-Val-Cys Cys-Ile-Ala-Met-Ser-Ser-Ser-Cys	Gly-Lys-Met Gly-Ala-Tyr Gly-Arg-Asn Gly-Thr-Arg Gly-Leu-Asn Gly-Arg-Gln Gly-Gly-Arg	Thr-Gly-Arg-His-Ala-Leu Ala-Pro-Tyr-Ala-Gly-Gly Gly-Glu-Arg-Gly-Ala-Ser Gly-Arg-Ala-Gly-Ala-Gly Ala-Ser Gly-Gly-Thr-Val-Thr-Gly Thr-Arg-Gln-Gly-Ser-Asn	
fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#8 -#20	nd Cys-Val-Arg-Ser-Ala-Ile-His-Ser-Cys	X - X -Arg Gly-Arg-Asn	Glu-Asn-Ser-Glu- X -Thr Gly-Lys-Asp-Phe-Lys-Asn	Met ₂₇₂ →Gln

Tableau 18 Séquences en positions 41-42, 238-241 et 271 de clones des banques pour fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}L₃⁶, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶ et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶, résistants à 20 mg/l d'ampicilline et possédant une insertion en 271. X signifie que la séquence du codon n'est pas lisible.

L'activité catalytique de quatre clones sélectionnés pour activité et possédant les trois boucles aléatoires a été mesurée ; les résultats sont repris dans le Tableau 19. Nous pouvons constater que ces activités sont assez différentes d'un clone à l'autre.

Clone	k_{obs}
fd-blaA	1.500 s^{-1}
fd-blaA-L ₁ ^R L ₂ ^{C6C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#31	128 s^{-1}
-#32	67 s^{-1}
fd-blaA-L ₁ ^R L ₂ ^{C7C} L ₃ ⁶ -Amp ₂₀ -#8	380 s^{-1}
-#20	722 s^{-1}

Tableau 19 Activité catalytique de phage-enzymes isolés des banques fd-blaA-L₁^RL₂^{C6C}L₃⁶ et fd-blaA-L₁^RL₂^{C7C}L₃⁶ sélectionnées pour résistance à 20 mg/l en ampicilline et possédant les trois boucles aléatoires.

En résumé, le remplacement dans la boucle 1 et l'insertion dans la boucle 2 sont toujours présents. D'autre part, l'insertion dans la boucle 3 est présente majoritairement dans la banque naïve ; par contre, la majorité des clones sélectionnés pour activité catalytique ne contiennent pas d'insertion dans la boucle 3. Ceci signifie que la sélection favorise les clones ne possédant que la dégénérescence en L₁ et en L₂. En effet, ces derniers ont déjà été sélectionnés pour activité catalytique. Le nombre de clones comportant ou non cet insert a été extrapolé pour la banque totale et les résultats sont donnés à la Figure 41. Nous pouvons constater que la taille de la banque active, contenant les trois boucles modifiées, est estimée à plus de 10^6 clones différents, ce qui constitue une grande diversité.

L₁ et L₂ bien construites, L₃ :

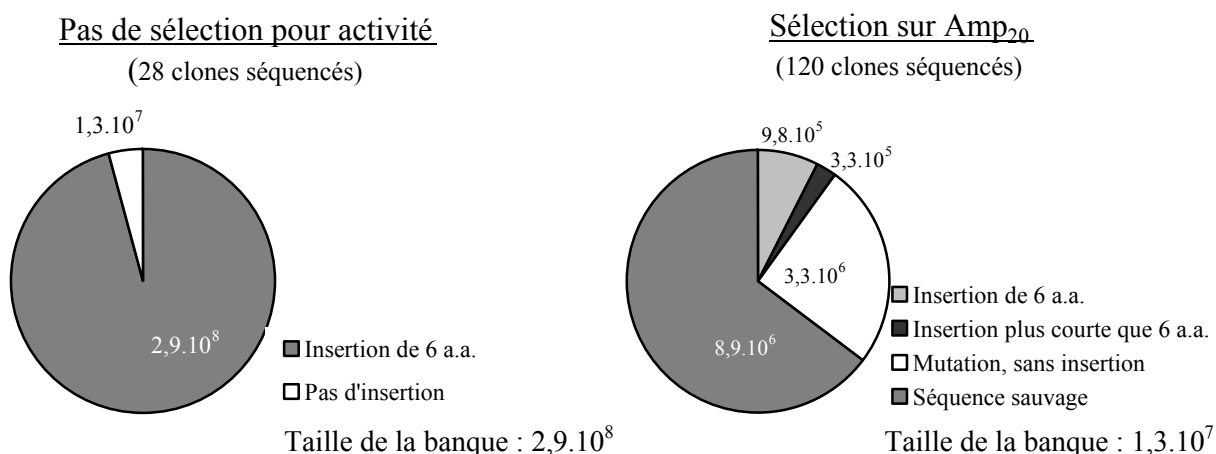


Figure 41 Graphiques représentant la proportion des clones possédant l'insert dans la boucle 3, avant (à gauche) et après sélection pour activité catalytique (à droite).

Suite à ces résultats, la banque fd-blaA-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ n'a pas été sélectionnée pour activité catalytique et les sélections pour affinité (cf. Chapitre 2) sont poursuivies avec la banque naïve. En effet, comme nous sommes intéressés par la liaison des petites molécules, la présence des trois boucles aléatoires semble plus importante. Si cela s'avère nécessaire, la sélection pour activité catalytique pourra toujours être réalisée après la sélection pour affinité.

4. Analyse des séquences de clones résistants à l'ampicilline

De nombreux clones résistants à l'ampicilline ont été séquencés, ce qui a permis l'analyse statistique de la permissivité des acides aminés introduits. Pour déterminer si le nombre d'observations (x_{obs}) d'un acide aminé à une position donnée s'écarte significativement de la moyenne attendue (x_{att}), nous nous sommes basés sur la loi binomiale de probabilité [166, 167] :

$$P_{x_{obs}} = C_N^{x_{obs}} \cdot p^{x_{obs}} \cdot (1-p)^{N-x_{obs}} \quad \text{où} \quad C_N^{x_{obs}} = \frac{N!}{x_{obs}!(N-x_{obs})!},$$

N est le nombre d'observations et p est la proportion du nombre de codons propre à l'acide aminé (c) par rapport au nombre total de codons (C).

Dans les graphiques présentés dans cette section, nous avons indiqué si l'écart entre x_{obs} et x_{att} est significatif (+), hautement significatif (++) ou très hautement significatif (+++). Ce symbolisme représente la probabilité que l'écart observé soit dû au hasard : + = 5%, ++ = 1% et +++ = 0,1%.

4.1. Boucle 1 (238-241)

La dégénérescence de la boucle 1, située à l'entrée du site actif, a été réalisée en mutant les résidus Gly₂₃₈-Glu₂₄₀-Arg₂₄₁. Nous avons analysé les acides aminés observés pour chaque position et comparé ces résultats avec ceux obtenus par Huang *et al.* [155]. Comme nous l'avons vu précédemment, ces auteurs ont déterminé la tolérance à la mutation de chaque résidu de la β -lactamase TEM-1. Leur stratégie consistait à rendre aléatoire trois codons contigus pour créer une banque contenant toutes les substitutions d'acides aminés possibles pour la région mutagenisée. Les clones actifs ont ensuite été sélectionnés sur un milieu contenant 1 mg/ml en ampicilline qui correspond à la concentration maximale sur laquelle poussent les cellules d'*E. coli* contenant le gène sauvage de l'enzyme. Dans notre cas, les conditions de sélection étaient moins sévères car nous avons sélectionné tous les phage-enzymes conférant une résistance bactérienne à l'ampicilline d'au moins 5 % de celle conférée par le phage-enzyme sauvage. Cependant, l'expression de l'enzyme étant réalisée sous forme de protéine de fusion avec une protéine minoritaire du manteau du phage, elle est nettement plus faible que l'expression périplasmique de Huang *et al.*

4.1.1. Boucle 1 – position 238

Lors de la construction de la banque, le codon 238 a été remplacé par la dégénérescence (G/T)(C/G)(T/C). Seules quatre résidus étaient donc autorisés à la place de la Gly₂₃₈ : la glycine, la sérine, l'alanine et la cystéine, chaque acide aminé étant codé par deux codons. Comme le montre la Figure 42, la position 238 est préférentiellement occupée par une glycine, qui est l'acide aminé de la séquence sauvage de la β -lactamase. Les résidus alanine et sérine sont autorisés à cette position mais ils sont clairement défavorisés par rapport à la glycine. La cystéine, quant à elle, n'a été retrouvée dans aucun des 124 clones séquencés.

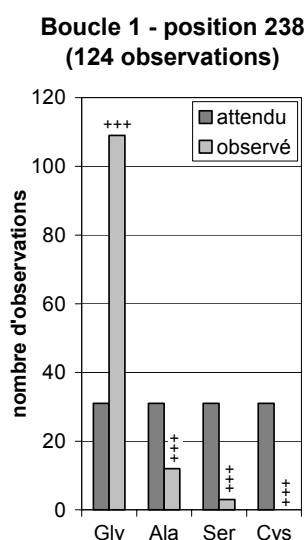


Figure 42 Analyse de la permissivité en position 238.

Ces résultats sont parfaitement en accord avec les expériences de Huang *et al.* qui ne retrouvèrent que la glycine, l'alanine et la sérine dans les clones actifs de la banque de remplacement aléatoire tripeptidique. D'autre part, des mutations sont souvent observées en position 238 chez les β -lactamases actives envers les céphalosporines de troisième génération [168, 169]. Cantu et Palzkill ont créé des mutants de la β -lactamase TEM-1 dans lesquels la glycine 238 a été remplacée par une alanine, une sérine, une cystéine, une thréonine, une asparagine ou une valine [170]. Tous ces clones montrent une activité envers l'ampicilline au moins dix fois plus basse que celle observée avec l'enzyme sauvage.

4.1.2. Boucle 1 – position 240

Le codon 240 a été remplacé par la dégénérescence NN(G/T), ce qui signifie que tous les acides aminés étaient permis à la place du glutamate 240. Dans cette construction, les acides aminés peuvent être codés par un, deux ou trois codons et ils seront donc présents dans des proportions différentes. Pour les calculs statistiques, nous n'avons tenu compte que d'un nombre total de 31

codons et non 32 car nous considérons que le codon stop est éliminé lors de la sélection pour activité.

Nous pouvons remarquer que les résidus lysine et glycine sont favorisés à cette position (cf. Figure 43), tandis que la valine, l'isoleucine, la phénylalanine et le tryptophane sont défavorisés. Cette position montre une préférence pour les résidus chargés et accepte mal les résidus hydrophobes, exception faite de la leucine. Il est étonnant de retrouver autant de résidus lysine, chargés positivement, alors que l'acide aminé naturel, le glutamate, possède une charge négative. En fait, cette mutation est souvent retrouvée dans des mutants de β -lactamases TEM qui ont évolué pour être actifs envers les antibiotiques à spectre étendu [171]. Le clone Glu₂₄₀Lys a été construit par Cantu *et al.* et montre une activité deux fois moins élevée envers l'ampicilline par rapport à la TEM-1 sauvage [172]. Cependant, il a été démontré que cette mutation stabilise l'enzyme [173], ce qui expliquerait nos résultats.

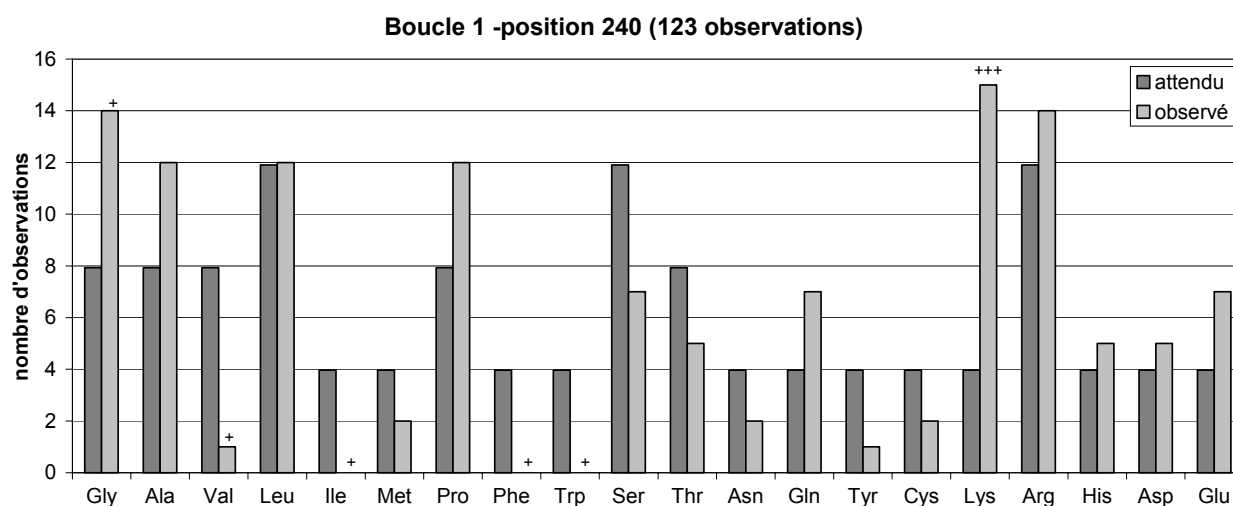


Figure 43 Analyse de la permissivité en position 240.

Dans l'étude de Huang *et al.*, les résidus permis à cette position étaient Glu, Tyr, Arg, Gln, Cys, Lys, Asp, Ser et Leu. Ici, nous retrouvons en plus les acides aminés Gly, Ala, Val, Met, Pro, Thr, Asn et His. Ceci peut être expliqué par les conditions de sélections appliquées, qui étaient plus douces dans notre cas (concentration moins élevée en ampicilline).

Nous pouvons également constater la présence d'un certain nombre de prolines. Ce qui est très étonnant car, dans l'enzyme sauvage, le glutamate 240 occupe la position 1 du coude β (cf. Figure 44). Normalement, la proline est surtout présente en position 2 (correspondant à l'arginine 241) dans ce type de structure [174].

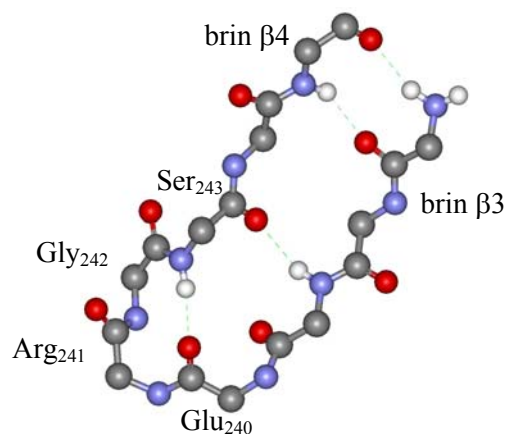


Figure 44 Structure du coude β situé entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ de la β -lactamase TEM-1 sauvage. Les atomes de carbone, d'azote et d'oxygène sont respectivement indiqués en gris, bleu et rouge. Les atomes d'hydrogène (en blanc) intervenant dans des ponts hydrogène (en vert) sont également indiqués. Les chaînes latérales ne sont pas reprises dans ce schéma.

4.1.3. Boucle 1 – position 241

De la même manière que dans le cas de la position 240, tous les acides aminés étaient permis à la place de l'arginine 241. Globalement, la position 241 (cf. Figure 45) montre une nette préférence pour les résidus polaires, chargés ou non, tandis que les résidus hydrophobes sont défavorisés.

Huang *et al.* n'ont trouvé que cinq acides aminés en 241 : l'arginine, l'aspartate, l'histidine, la phénylalanine, l'alanine et la thréonine. Curieusement, nous ne retrouvons aucune phénylalanine dans les 126 clones séquencés.

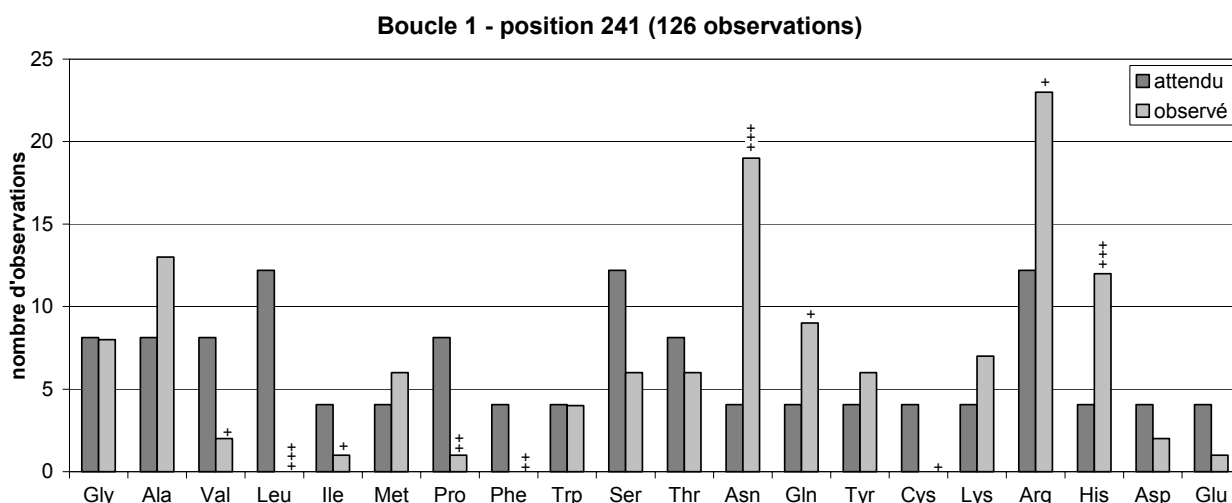


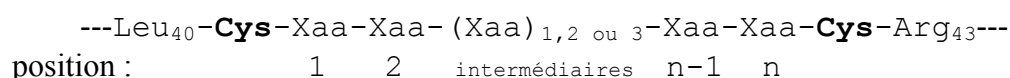
Figure 45 Analyse de la permissivité en position 241.

Il est très étonnant de constater que la proline ne soit que faiblement admise dans cette position qui correspond à la position 2 du coude β . Ce constat, combiné à la préférence de la position 240

pour la proline, pourrait signifier qu'il y a eu un décalage du coude β qui, au lieu d'être formé par les résidus 240-243 dans l'enzyme sauvage, serait constitué des résidus 239-242 dans certains clones.

4.2. Boucle 2 (41-42)

L'insert dans la boucle 2 a été réalisé en remplaçant les résidus 41-42 par cinq, six ou sept résidus aléatoires, flanqués de deux cystéines. La numérotation des positions est définie comme suit :



A nouveau, la dégénérescence des acides aminés insérés a été réalisée grâce à une construction de type NN(G/T).

La Figure 46 montre les proportions retrouvées pour chaque acide aminé dans la boucle 2, quelle que soit la position ou la taille de l'insert. Globalement, les résidus glycine, alanine et valine sont favorisés et la sérine est très favorisée. D'autre part, nous constatons que la lysine et le tryptophane sont relativement défavorisés et que la cystéine est totalement absente. Nous retrouvons un taux assez élevé de résidus hydrophobes, ce qui suggère que la boucle n'est pas entièrement accessible au solvant, du moins pour une fraction importante de mutants.

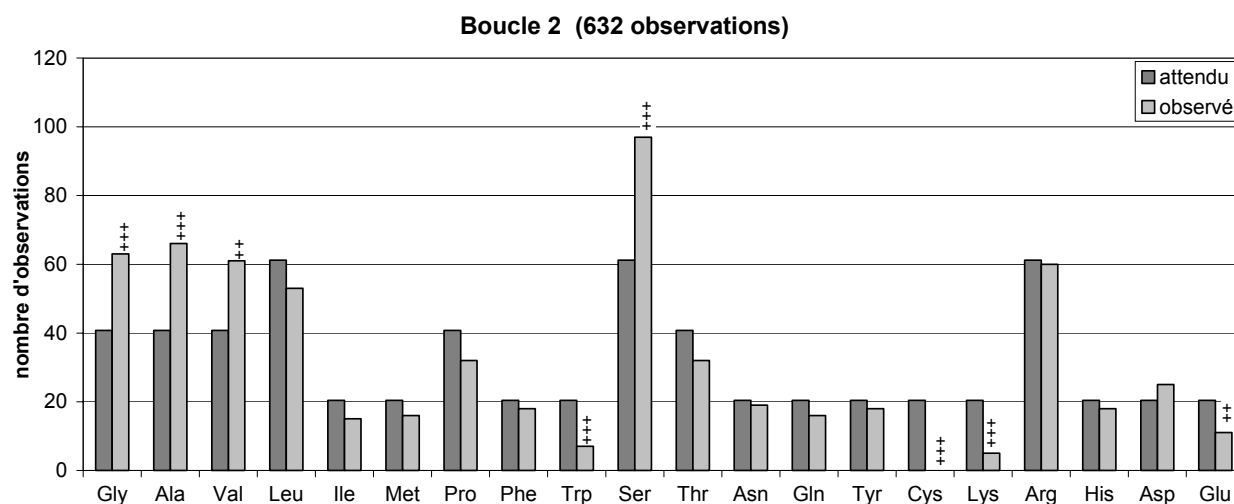


Figure 46 Analyse de la permissivité de la boucle 2 (41-42).

Nous avons ensuite analysé ces séquences position par position en faisant la distinction en fonction de la taille de l'insert.

4.2.1. Boucle 2 – position 1

La Figure 47 montre la distribution des acides aminés en position 1 dans la boucle 2. Nous constatons qu'il y a une préférence pour les résidus alanine et valine et qu'elle est plus marquée pour les inserts de sept acides aminés. Par contre, les résidus tryptophane, cystéine, lysine et aspartate sont fortement défavorisés quelle que soit la taille de l'insert. La sérine n'est défavorisée en position 1 que pour l'insert de six résidus, tandis que la tyrosine n'est préférée que dans le cas d'une insertion de cinq résidus.

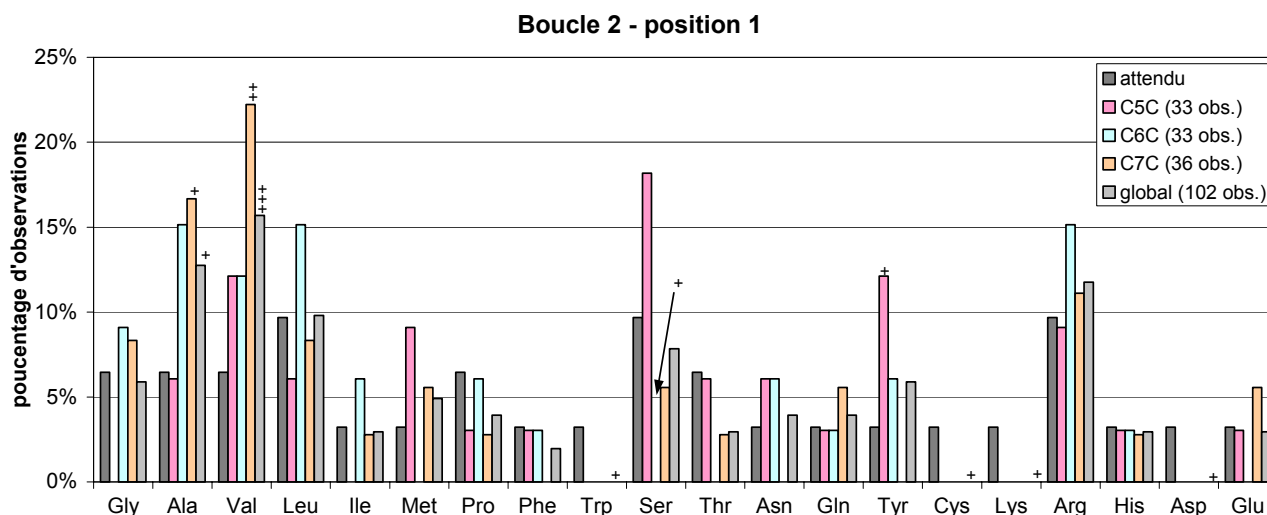


Figure 47 Analyse de la permissivité en position 1 de la boucle 2 (41-42), en fonction des différentes tailles d'insert. C5C, C6C et C7C indiquent qu'il s'agit respectivement de l'insert de cinq, six ou sept résidus, flanqué de deux cystéines. Le nombre d'observations est indiqué entre parenthèses.

4.2.2. Boucle 2 – position 2

Globalement, nous constatons que les résidus tryptophane, cystéine et lysine sont défavorisés en deuxième position (cf. Figure 48), tandis que la glycine est favorisée. Dans cette position, nous ne remarquons rien de significatif en fonction de la taille de l'insert.

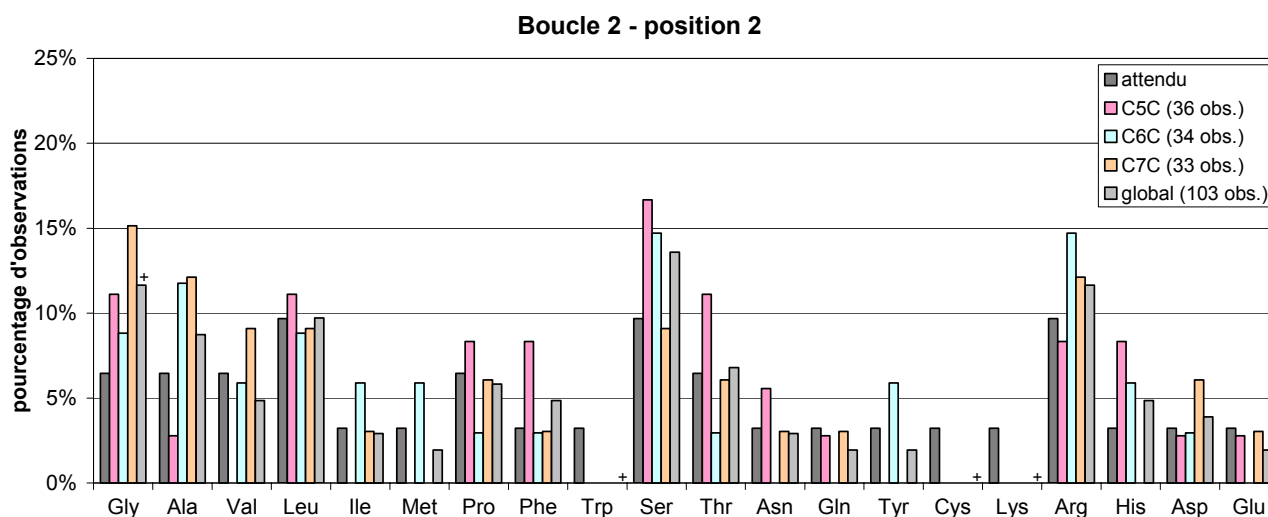


Figure 48 Analyse de la permissivité en position 2 de la boucle 2 (41-42), en fonction des différentes tailles d'insert.

4.2.3. Boucle 2 – positions intermédiaires

Les positions intermédiaires de la boucle 2 (cf. Figure 49) montrent une préférence pour les résidus de petite taille, comme la glycine, l'alanine, la valine et la sérine, tandis que la cystéine et la proline sont mal acceptées.

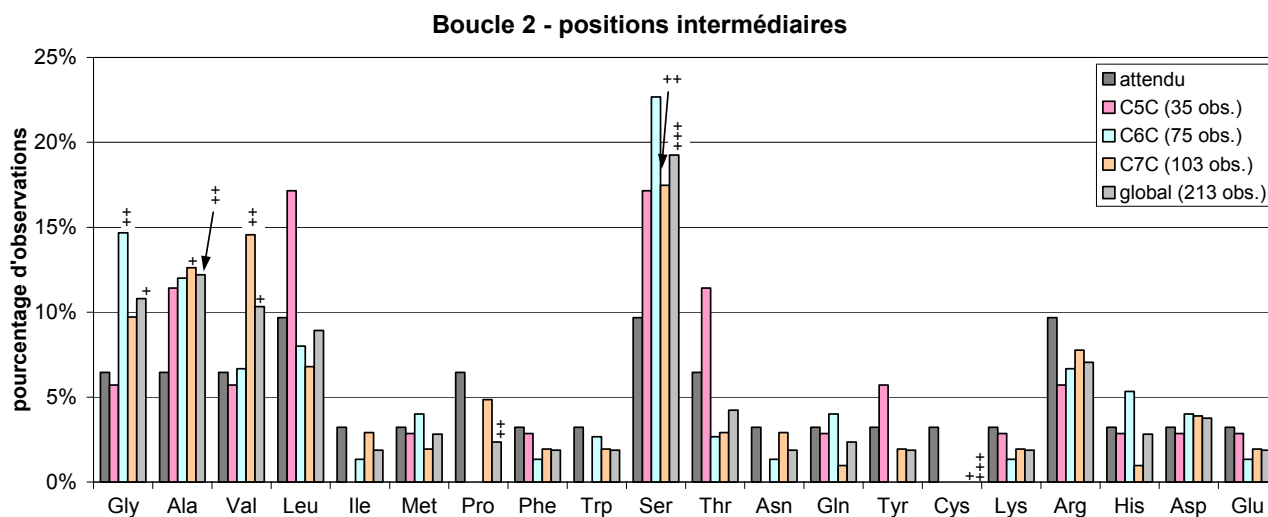


Figure 49 Analyse de la permissivité des positions intermédiaires de la boucle 2 (41-42), en fonction des différentes tailles d'insert.

4.2.4. Boucle 2 – position n-1

L'avant-dernière position de la boucle 2 (cf. Figure 50) montre une préférence pour la proline particulièrement marquée pour l'insert de six résidus et pour la sérine, spécialement dans l'insert de cinq acides aminés. L'arginine n'est favorisée que dans le cas d'un insert de sept résidus et

l'aspartate dans l'insert de cinq. Globalement, l'asparagine, la tyrosine, la cystéine et le glutamate sont défavorisés.

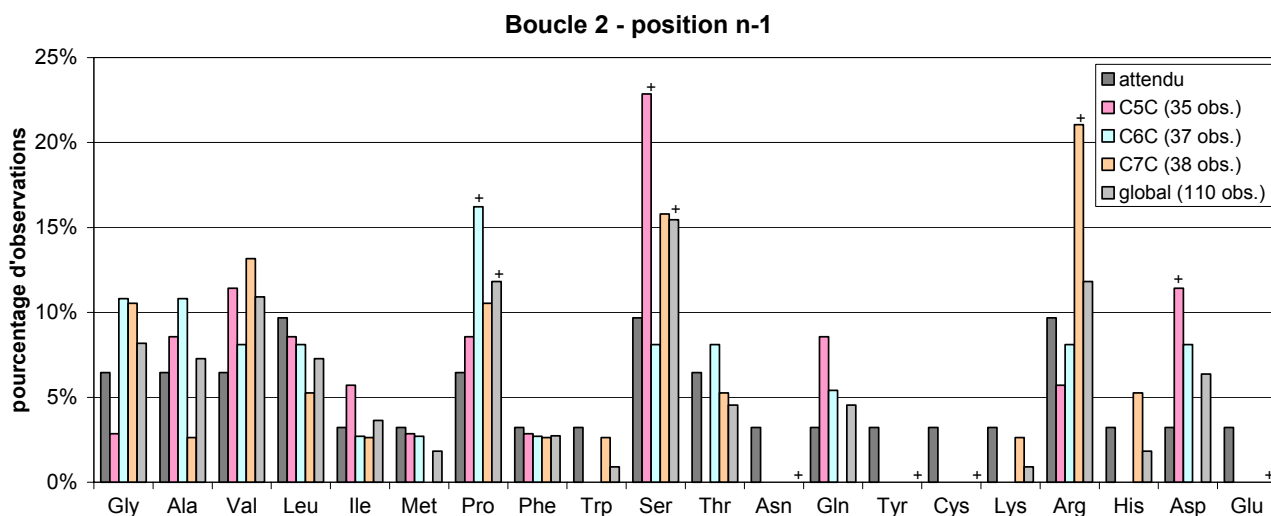


Figure 50 Analyse de la permissivité en position n-1 de la boucle 2 (41-42), en fonction des différentes tailles d'insert.

4.2.5. Boucle 2 – position n

La dernière position de la boucle 2 (cf. Figure 51) montre une préférence pour la glycine, la sérine et l'asparagine. La glycine est surtout favorisée dans l'insert de sept résidus, la sérine, dans l'insert de six et l'asparagine, dans l'insert de cinq. D'autre part, les résidus glutamine, cystéine et lysine ne sont pas admis.

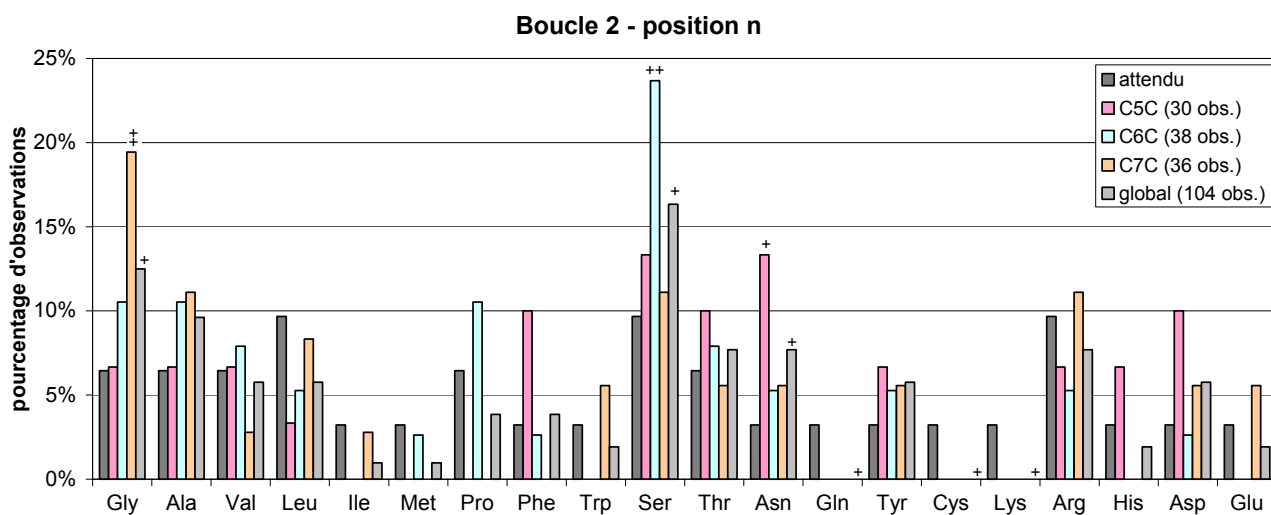


Figure 51 Analyse de la permissivité en position n de la boucle 2 (41-42), en fonction des différentes tailles d'insert.

Comme nous l'avons vu, nous avons retrouvé beaucoup de prolines en avant-dernière position et de glycine en dernière position. Or une séquence Pro-Gly est classique en fin de coude β . Les séquences ont été analysées une à une, mais ce doublet n'a pas été retrouvé.

4.3. Boucle 3 (271)

Comme nous l'avons vu précédemment, peu de clones actifs possèdent la boucle bien construite en 271. Compte tenu du faible nombre d'observations disponibles, il n'a donc pas été possible de réaliser l'étude statistique.

4.4. Bilan

Cette étude met en évidence que la probabilité pour qu'un acide aminé occupe préférentiellement telle ou telle position au sein des boucles est difficilement prévisible.

Cependant, nous avons pu mettre en évidence quelques observations : tout d'abord, nous pouvons noter le cas particulier de la cystéine. La seule position où ce résidu semble toléré est en 240, dans la boucle 1. Ce phénomène proviendrait d'une contre-sélection *in vivo* provoquée par la présence d'un résidu cystéine 'libre' en surface de phage qui va être oxydé dans le périplasme [85]. Ensuite, au niveau de la boucle 2, il est étonnant de constater que dans certains cas la probabilité de présence privilégiée d'un acide aminé par rapport à un autre dépend de la taille de l'insert.

III. Conclusions

Nous avons donc construit une banque d'enzymes contenant trois boucles dégénérées. 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, un peptide aléatoire de trois tailles différentes (cinq, six ou sept résidus) a été inséré entre deux cystéines et dans la boucle 3, une insertion de six résidus aléatoires a été réalisée. En pratique, l'ingénierie des boucles 1 et 2 a été effectuée dans la même construction pour créer trois banques de première génération (trois tailles différentes dans la boucle 2). Ces trois banques ont été sélectionnées pour ne garder que les clones conférant une résistance bactérienne à l'ampicilline d'au moins 5 % de celle conférée par le phage-enzyme sauvage. La banque de première génération contenant l'insertion dans la boucle 3 a été construite et sélectionnée pour activité par Daniel Legendre. Les banques de première génération ont ensuite été combinées pour créer une banque de seconde génération contenant les trois boucles dégénérées. Cette banque contient un faible pourcentage de clones ne contenant que la dégénérescence dans les boucles 1 et 2. Ces clones deviennent majoritaires lorsque cette banque est à son tour sélectionnée pour activité catalytique. Pour les expériences de sélection *in vitro* pour affinité (cf. Chapitre 2), nous avons décidé de partir de la banque de seconde génération naïve, c'est-à-dire non sélectionnée pour activité.

(a) Tolérance à l'insertion

Malgré les progrès réalisés dans l'étude des structures de protéines, les effets sur la stabilité structurale d'une insertion peptidique dans les boucles ou les coudes restent difficiles voire impossibles à prédire [175]. L'augmentation de la longueur des boucles dans les structures des protéines provoque habituellement une diminution de la stabilité globale de celle-ci, diminution liée au coût entropique de l'organisation des résidus additionnels dans la boucle [176, 177]. Ces données suggèrent que, si la séquence insérée est de taille suffisante, elle peut perturber le repliement de la protéine hôte. Cependant, si la séquence insérée est capable de se replier dans une structure indépendante, le coût entropique de la protéine hôte sera minimal et celle-ci gardera sa capacité de repliement [178, 179].

De plus, même si les boucles ou les coudes ne sont en général pas essentiels pour le repliement de la protéine, ces connections peuvent, dans certains cas, contribuer à celui-ci ou à la stabilité de la protéine. Une analyse détaillée des cinétiques de repliement de la protéine L [180] a montré

que le rôle des coudes β lors de cette étape ne peut pas être généralisé ; en effet, dans la même protéine, deux coudes β disposés symétriquement ont des effets différents sur le repliement.

Des expériences d'insertion dans les boucles de la phosphoglycérate kinase de levure [181] et dans la phosphorybosyl anthranilate isomérase [182] suggèrent que les longues boucles $\beta\alpha$ tolèrent mieux les insertions que les courtes boucles $\alpha\beta$. Il se peut que ces dernières contribuent au repliement des protéines. Les résultats obtenus dans les boucles 2 et 3 de la β -lactamase vont dans ce sens. En effet, la boucle 3 (boucle $\beta\alpha$ composée par 6 résidus) tolère aisément l'insertion, tandis que la boucle 2 (boucle $\alpha\beta$ composée de 2 résidus) nécessite la présence de deux cystéines, et donc très probablement la présence d'un pont disulfure, pour être tolérante à l'insertion.

Les boucles plus larges que les coudes β peuvent aussi avoir un effet majeur sur la stabilité de la protéine. Par exemple, des mutations ponctuelles ou des expériences de remplacement de boucle peuvent déstabiliser [183, 184] ou stabiliser [185] considérablement une protéine. Dans le cas de la boucle 1, les mutations sont bien tolérées par l'enzyme et ne semblent pas avoir d'effet sur la stabilité de celle-ci. Par contre, une insertion d'acides aminés dans cette boucle affecte considérablement l'activité catalytique, même si cette insertion est de très petite taille. Cet effet sur l'activité est plus vraisemblablement dû à un encombrement du site actif de l'enzyme plutôt qu'à une déstabilisation de la protéine.

Plusieurs expériences ont également démontré que des modifications relativement limitées ou des insertions/délétions dans des boucles ou des coudes peuvent, dans certains cas, avoir des conséquences importantes sur la structure quaternaire de la protéine. En effet, ce type de modifications peut provoquer un échange de domaines qui résulte en un changement de l'état oligomérique de la protéine [186-189]. De tels échanges de domaines ont été observés, au sein de notre laboratoire, sur un clone de la β -lactamase TEM-1 (communication personnelle de Patrice Soumilion). Ce clone est issu de la banque d'insertion en 271, sélectionnée pour affinité pour la ferritine. Une chromatographie d'exclusion a montré l'existence d'un dimère non covalent, plus stable que le monomère. L'hypothèse qui a été émise suggère l'échange, entre deux molécules d'enzyme, de la dernière hélice de la β -lactamase, située juste en aval de l'insertion. Dans notre cas, nous pourrions observer le même type de comportement avec la première hélice de l'enzyme, qui est située juste en amont de l'insert en 41-42. Les résidus cystéine imposés de part et d'autre de l'insert pourraient permettre la formation de ponts disulfure intermoléculaires.

(b) Spécificité de substrat

Dans le cadre de son travail de mémoire, Julie Deherve a criblé les banques d'insertion en 240-241 (fd-blaA-L₁^{3→6}) pour tester si une insertion peptidique dans cette région avait également le pouvoir de modifier la spécificité de substrat et d'augmenter l'activité enzymatique contre les céphalosporines de troisième génération. Aucun clone ne semble avoir acquis de la résistance envers la céfotaxime ou la ceftazidime.

IV. Matériels et méthodes

Dans cette section, seules les expériences spécifiques au travail de construction des banques sont décrites. Les techniques plus générales sont reprises dans la Partie expérimentale générale (page 155).

1. Construction des vecteurs

Le phage exprimant la β -lactamase TEM-1 en fusion avec la pIII, fd-bla, a été construit précédemment au laboratoire, par insertion du gène de la β -lactamase entre les sites *Apa*LI et *Not*I du phage fd-dog [162]. Il contient un gène de résistance à la tétracycline, permettant la sélection des bactéries infectées.

1.1. Vecteur initial : fd-blaA

Oligonucléotides :

PM43 : 5'-GGA-GGG-CTT-ACC-ATC-GGG-CCC-CAG-TGC-TGC-A-3'

PM44 : 5'-TGC-AGC-ACT-GGG-GCC-CGA-TGG-TAA-GCC-CTC-C-3'

Le «QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit» (Stratagene) a été utilisé pour introduire un site *Apa*I en position 251-252 dans le gène de la β -lactamase de fd-bla. La PCR a été réalisée sur 100 ng de fd-bla double brin avec les oligonucléotides complémentaires PM43 et PM44 (la mutation introduite y est indiquée en gras et le site *Apa*I est souligné), suivant les instructions fournies avec le kit de mutagenèse. Après digestion du brin parental par *Dpn*I, une exonucléase spécifique de l'ADN méthylé, l'ADN mutant a été transformé par choc thermique dans la souche *E. coli* XL1-Blue fournie avec le kit. Les bactéries ont été étalées sur boîte LB-Tet-Amp (LB-agar contenant 7,5 mg/l de tétracycline et 100 mg/l d'ampicilline).

Dix clones ont été repiqués et mis en culture dans 5 ml de LB-Tet-Amp. Après incubation à 37°C, pendant une nuit, l'ADNdb des dix mutants a été extrait et purifié avec le «Quantum Prep Plamid Miniprep Kit» (Bio-Rad). Un test de restriction a ensuite été réalisé sur l'ADN des 10 clones : les clones ont été digérés par *Eco*RI et *Apa*I et la taille des fragments obtenus a été déterminée par migration sur gel d'agarose 1 %. Le gène de la β -lactamase des six clones montrant la double restriction a été séquencé.

1.2. Vecteur de clonage 1 : fd-blaAI

Oligonucléotide :

LD49 : 5'-GAT-ACC-GCG-AGA-CCC-GTC-TTC-AAC-CGA-AGA-CAG-ATT-TAT-CAG-CAA-TAA-ACC-3'

Un premier vecteur de clonage a été construit par mutagenèse dirigée sur fd-blaA pour y introduire un site de restriction *Bbs*I, un codon stop et un décalage de phase de lecture. La méthode du brin uracile a été utilisée. Dans un premier temps, la souche bactérienne CJ236 a été infectée par les phages fd-blaA. Cette souche permet de préparer de l'ADN contenant des uraciles à la place de thymines. Après culture dans 250 ml de LB-Tet-Chl (LB contenant 7,5 mg/l de tétracycline, 100 mg/l d'ampicilline et 30 mg/l de chloramphénicol), les phages ont été purifiés et leur ADNsb a été extrait grâce au «QIAprep M13 Kit» (QIAGEN). La mutagenèse a ensuite été réalisée à l'aide du «Muta-Gene M13 *in vitro* Mutagenesis Kit» (Bio-Rad), avec l'oligonucléotide LD49 (le codon stop est indiqué en gras et le site *Bbs*I est souligné), préalablement phosphorylé. Ensuite, l'ADN a été transformé par électroporation dans les cellules TG1 et les bactéries ont été étalées sur boîte LB-Tet. Quelques clones ont été repiqués sur boîte LB-Tet et en parallèle sur boîte LB-Tet-Amp. Les clones non résistants à l'ampicilline ont été repiqués et mis en culture dans 5 ml de LB-Tet. Après incubation à 37°C, pendant une nuit, l'ADNdb de ces clones a été isolé avec le kit le «Quantum Prep Plamid Miniprep Kit» (Bio-Rad) et des tests de restriction par *Bbs*I ont été réalisés. Les clones contenant le site de restriction ont été séquencés. L'ADNdb de ce nouveau vecteur a été préparé en grande quantité par purification au chlorure de césium (cf. Partie expérimentale générale, page 159).

1.3. Vecteur de clonage 2 : fd-blaAΔ1

Oligonucléotides :

PM55 : 5'-TCG-AGT-GGG-TTA-CAT-CGA-ACT-GGA-AGA-CGG-GTC-TCG-CGG-TAT-CAT-TGC-AGC-ACT-GGG-GCC-3'

PM56 : 5'-CCA-GTG-CTG-CAA-TGA-TAC-CGC-GAG-ACC-CGT-CTT-CCA-GTT-CGA-TGT-AAC-CCA-C-3'

Un deuxième vecteur de clonage a été construit en remplaçant les codons 50 à 241 de fd-blaA par six paires de bases formant un site de restriction *Bbs*I. En pratique, deux oligonucléotides synthétiques complémentaires, PM55 et PM56 (le site *Bbs*I y est souligné) ont été hybridés en plaçant le mélange des deux oligonucléotides (à 7,4 μM chacun, dans un volume final de 39 μl) dans un bain d'eau à 70°C et en laissant refroidir à une vitesse d'environ 1°C par min., jusqu'à 37°C. Cette cassette synthétique a ensuite été phosphorylée. D'autre part, le vecteur fd-blaA a subi une digestion par *Xho*I et *Apa*I, suivie d'une purification par 'clean-up' (voir Partie

expérimentale générale, page 161). La ligation de la cassette synthétique dans le vecteur restreint a été réalisée avec un mélange insert/vecteur dans un rapport molaire de 5. La ligase a ensuite été inactivée et ce mélange a subi une restriction par *PvuI*. Après purification par 'clean-up', le mélange de ligation a été transformé par électroporation dans les cellules TG1 et les bactéries ont été étalées sur boîte LB-Tet. Quelques clones ont ensuite été repiqués sur boîte LB-Tet et en parallèle sur boîte LB-Tet-Amp. Les clones non résistants à l'ampicilline ont été mis en culture dans 10 ml de LB-Tet. Après incubation à 37°C, l'ADNdb a été purifié avec le kit «QIAGEN MiniPrep» (QIAGEN) et des tests de restriction par *BbsI* ont été réalisés. La construction des clones contenant le site *BbsI* a été vérifiée par séquençage. L'ADNdb de fd-*blaAΔ1* a été préparé en grande quantité par purification au chlorure de césium.

1.4. Vecteur de clonage 3 : fd-*blaAΔ2*

Oligonucléotides :

PM60 : 5'-TGC-ACA-GCC-AGA-AAC-GCT-GGT-GAA-AGT-AAA-AGA-TGC-TGA-AGA-TCA-GGT-CTT-CGC-3'

PM61 : 5'-TCG-AGC-GAA-GAC-CTG-ATC-TTC-AGC-ATC-TTT-TAC-TTT-CAC-CAG-CGT-TTC-TGG-CTG-3'

Le troisième vecteur de clonage a été construit par mutagenèse du vecteur fd-*blaAΔ1* pour y créer un site de restriction *BbsI* au niveau des codons 40 et 41. En pratique, deux oligonucléotides synthétiques complémentaires, PM60 et PM61 (le site *BbsI* y est souligné) ont été hybridés et phosphorylés. D'autre part, le vecteur fd-*blaAΔ1* a subi une digestion par *ApaI* et *XhoI*, suivie d'une purification sur une colonne «Chroma Spin 1.000» (Clontech). La ligation de la cassette synthétique dans le vecteur restreint a été réalisée avec un mélange insert/vecteur dans un rapport molaire de 5. Après purification par 'clean-up', le mélange de ligation a été transformé par électroporation dans les cellules TG1 et les bactéries ont été étalées sur boîte LB-Tet. Quelques clones ont ensuite été mis en culture dans 10 ml de LB-Tet et l'ADNdb a été purifié avec le «High Pure Plasmid Isolation Kit» (Roche). Leur séquençage a permis de déterminer les clones ayant intégré le nouveau site *BbsI*. Le vecteur a été préparé en grande quantité avec le kit «QIAGEN MaxiPrep» (QIAGEN).

2. Construction des banques

2.1. **fd-blaA-L₁^{3→6}**

2.1.1. **Construction des cassettes dégénérées L₁^{3→6}**

Oligonucléotides :

LD57 : 5'-CAG-TTG-GGT-GCT-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-G-3'

PM57 : 5'-GTC-GAA-ACT-CGA-AGA-CGC-AGA-CCC-(MNN)₃-ACC-GGC-TCC-AGA-TTT-ATC-AGC-AAT-AAA-CC-3'

PM58 : 5'-GTC-GAA-ACT-CGA-AGA-CGC-AGA-CCC-(MNN)₄-ACC-GGC-TCC-AGA-TTT-ATC-AGC-AAT-AAA-CC-3'

PM59 : 5'-GTC-GAA-ACT-CGA-AGA-CGC-AGA-CCC-(MNN)₅-ACC-GGC-TCC-AGA-TTT-ATC-AGC-AAT-AAA-CC-3'

LD58 : 5'-GTC-GAA-ACT-CGA-AGA-CGC-AGA-CCC-(MNN)₆-ACC-GGC-TCC-AGA-TTT-ATC-AGC-AAT-AAA-CC-3'

Les cassettes de clonage L₁³, L₁⁴, L₁⁵ et L₁⁶ ont été construites par PCR sur fd-blaAI en utilisant comme amorces, d'une part LD57 et d'autre part PM57, PM58, PM59 ou LD58. Ces quatre derniers oligonucléotides contiennent une partie dégénérée (indiquée en gras) qui permet le remplacement des résidus 240 et 241 par respectivement 3, 4, 5 ou 6 acides aminés aléatoires. Ils contiennent également un site de restriction *Bbs*I (le site de reconnaissance de l'enzyme est souligné). Les PCR ont été réalisées sur 200 ng d'ADNdb de fd-blaAI, avec 12,5 unités de polymérase Vent (New England BioLabs), 0,4 mM d'un mélange des quatre dNTP, 0,4 µM en amorces, 2 mM de MgSO₄, le tout dans 1 ml de tampon fourni avec l'enzyme (ThermoPol Buffer : 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100, pH 8,8). Les conditions de PCR comprenaient un cycle de 5 min. de dénaturation à 94°C, suivi de 30 cycles comportant chacun 1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'appariement à 54°C et 1 min. d'élongation à 74°C, pour finir par un cycle de 10 min. d'élongation à 74°C. Les fragments de PCR ainsi obtenus ont été purifiés soit avec le «High Pure PCR Product Purification Kit» (Roche), soit par migration sur gel d'agarose à bas point de fusion 2 % et purification de la bande d'ADN avec le «Wizard PCR Preps DNA Purification System» (Promega).

2.1.2. **Clonage de la cassette L₁⁶ dans le vecteur fd-blaAI**

Le fragment de PCR L₁⁶ et le vecteur de clonage fd-blaAI ont tous deux été digérés par les enzymes de restriction *Bbs*I et *Xho*I et purifiés par 'clean-up'. La ligation de la cassette dégénérée dans le vecteur a été réalisée avec un mélange insert/vecteur dans un rapport molaire de 5. La ligase a ensuite été inactivée par incubation du mélange de ligation à 65°C, pendant

15 min. Ce mélange a alors subi une restriction par *Bbs*I. Après une nouvelle purification par 'clean-up', l'ADN a été électroporé dans les bactéries TG1. Les bactéries ont été étalées sur boîtes LB-Tet.

2.1.3. Clonage des cassettes $L_1^{3 \rightarrow 6}$ dans le vecteur fd-*blaA*Δ1

Les cassettes dégénérées L_1^3 , L_1^4 , L_1^5 et L_1^6 et le vecteur fd-*blaA*Δ1 ont été digérés par *Xho*I et *Bbs*I. Les cassettes digérées ont été purifiées avec le «High Pure PCR Purification Kit» (Roche) et le vecteur, sur une colonne «Chroma Spin 1.000» (Clontech). La ligation des fragments de PCR dans le vecteur a été réalisée avec un mélange insert/vecteur dans un rapport molaire de 5, dans des expériences indépendantes pour chaque cassette aléatoire. La ligase a ensuite été inactivée et les mélanges de ligation ont subi une restriction par *Bbs*I. Après purification avec le «High Pure PCR Purification Kit» (Roche), l'ADN a été électroporé dans les TG1 et les bactéries étalées sur boîtes LB-Tet.

2.2. fd-*blaA*- $L_1^R L_2^{6 \rightarrow 9}$ et fd-*blaA*- $L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$

2.2.1. Construction des cassettes dégénérées $L_1^R L_2^{6 \rightarrow 9}$ et $L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$

Oligonucléotides :

- PM62 : 5'-GTC-GAA-ACT-CGA-AGA-CGC-AGA-CCC-MNN-MNN-RSM-GGC-TCC-AGA-TTT-ATC-AGC-AAT-AAA-CCA-GCC-3'
- PM63 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-(NNK)₆-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'
- PM64 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-(NNK)₇-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'
- PM65 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-(NNK)₈-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'
- PM66 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-(NNK)₉-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'
- PM67 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-TGC-(NNK)₅-TGC-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'
- PM68 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-TGC-(NNK)₆-TGC-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'
- PM69 : 5'-CAG-CTT-TGA-GGA-AGA-CAA-GAT-CAG-TTG-TGC-(NNK)₇-TGC-CGA-GTG-GGT-TAC-ATC-GAA-CTG-GAT-CTC-AAC-AGC-G-3'

Les cassettes $L_1^R L_2^{6 \rightarrow 9}$ et $L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$ ont été construites par PCR sur fd-*blaA*. Les amorces utilisées étaient d'une part PM62, dont la partie dégénérée (en gras) permet le remplacement aléatoire des résidus 238-241 et d'autre part les amorces PM63 à PM69. Les amorces PM63, PM64, PM65 et PM66 ont un partie dégénérée (en gras) autorisant le remplacement des résidus 41 et 42 par respectivement 6, 7, 8 ou 9 acides aminés aléatoires. Les amorces PM67, PM68 et

PM69 permettent également le remplacement des résidus 41 et 42, mais en fixant deux cystéines (codons en italique) de part et d'autre de la partie dégénérée de 5, 6 ou 7 codons (en gras). Toutes ces amorces contiennent également un site de restriction *Bbs*I (souligné). Les PCR ont été réalisées sur 200 ng d'ADNdb de *fd-blaA*, avec 20 unités de polymérase Taq (Roche), 0,4 mM d'un mélange des quatre dNTP, 0,4 μ M en amorces, le tout dans 1 ml de tampon fourni avec l'enzyme (Taq Buffer : 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 8,3). Les conditions de PCR comprenaient un cycle de 5 min. de dénaturation à 94°C, suivi de 30 cycles comportant chacun 1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'appariement à 70°C et 1 min. d'élongation à 74°C, pour finir par un cycle de 10 min. d'élongation à 74°C. Les 7 fragments de PCR ($L_1^R L_2^6$, $L_1^R L_2^7$, $L_1^R L_2^8$, $L_1^R L_2^9$, $L_1^R L_2^{C5C}$, $L_1^R L_2^{C6C}$ et $L_1^R L_2^{C7C}$) ont été posés sur gel d'agarose à bas point de fusion. Après migration, la bande a été découpée et l'ADN purifié avec le «High Pure PCR Purification Kit» (Roche).

2.2.2. Clonage des cassettes $L_1^R L_2^{6 \rightarrow 9}$ et $L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$ dans le vecteur *fd-blaA* Δ 2

Les fragments de PCR $L_1^R L_2^{6 \rightarrow 9}$ et $L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$ et le vecteur de clonage *fd-blaA* Δ 2 ont été digérés par *Bbs*I. Le vecteur restreint a été purifié sur une colonne «Chroma Spin 1.000» (Clontech) et les fragments de PCR, sur une colonne «Chroma Spin 200». La ligation des cassettes dégénérées dans le vecteur a été réalisée avec un mélange insert/vecteur dans un rapport molaire de 5 et ce, dans des expériences indépendantes pour chaque cassette aléatoire. La ligase a ensuite été inactivée et les mélanges ont alors subi une restriction par *Bbs*I. Après purification des mélanges de ligation avec le «High Pure PCR Purification Kit» (Roche), l'ADN a été électroporé dans les bactéries TG1. Les bactéries ont ensuite été étalées sur boîtes LB-Tet.

2.3. *fd-blaA*- $L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C} L_3^6$

2.3.1. Construction de la cassette dégénérée L_3^6

Oligonucléotides :

AB348 : 5'-TTC-TGT-ATG-AGG-TTT-TGC-TAA-3'

PM44 : 5'-TGC-AGC-ACT-GGG-GCC-CGA-TGG-TAA-GCC-CTC-C-3'

La banque contenant l'insertion en L_3 a déjà été construite précédemment au laboratoire [136]. Le résidu 271 a été remplacé par 6 acides aminés aléatoires. Cette banque, lib3B, a été sélectionnée pour activité catalytique. Nous avons récupéré cette banque active par PCR. Les amorces utilisées sont AB348, qui s'hybride au début du gène de la pIII mature et PM44, qui contient la mutation permettant la création d'un site de restriction *Apa*I (cf. page 97).

Dans un premier temps, le nombre de cycles de PCR a été optimisé. En pratique, le mélange de PCR réparti dans 30 tubes. Après chaque cycle, un tube est sorti de l'appareil PCR et incubé à 74°C, pendant 10 min. Les fragments ainsi obtenus ont été analysés par migration sur gel d'agarose 2 %, afin de déterminer le nombre optimal de cycles.

La PCR permettant l'amplification de la banque pour le clonage a finalement été réalisée sur 120 ng d'ADNdb de lib3B, avec 120 unités de polymérase Taq (Roche), 0,4 mM d'un mélange des quatre dNTP, 0,4 µM de l'amorce PM44, 0,4 µM de l'amorce AB348, le tout dans 6 ml de tampon fourni avec la Taq. Les conditions de PCR comprenaient un cycle de 10 min. de dénaturation à 94°C, suivi de 18 cycles comportant chacun 1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'appariement à 56°C et 1 min. d'élongation à 74°C, pour finir par un cycle de 10 min. d'élongation à 74°C.

La polymérase a été ajoutée au mélange de PCR après les 10 min. de dénaturation à 94°C pour augmenter son efficacité. Le fragment de PCR a ensuite été purifié par 'clean-up'.

2.3.2. Clonage de la cassette L_3^6 dans $fd\text{-}blaA\text{-}L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$

Le fragment de PCR L_3^6 et l'ADNdb des banques $fd\text{-}blaA\text{-}L_1^R L_2^{C5C}$, $fd\text{-}blaA\text{-}L_1^R L_2^{C6C}$ et $fd\text{-}blaA\text{-}L_1^R L_2^{C7C}$ ont été digérés par *NotI* et *ApaI*¹⁰. Les vecteurs restreints ont été purifiés sur colonne «Chroma Spin 1.000» (Clontech) et le fragment de PCR, par 'clean-up'. La ligation de la cassette dégénérée dans les vecteurs a été réalisée avec un mélange insert/vecteur dans un rapport molaire de 3 ou 5, dans des expériences indépendantes pour chaque vecteur. Après purification des mélanges de ligation par 'clean-up', l'ADN a été électroporé dans les bactéries TG1. Ensuite, les bactéries ont directement été mises en culture dans du LB-Tet. Après incubation d'une nuit à 37°C, les bactéries ont été centrifugées à 6.000 rpm pendant 10 min. Le surnageant a permis la préparation de phages ; le culot de bactéries a été resuspendu dans une solution de glycérol 40 % et conservé à -80°C.

3. Caractérisation des banques

3.1. Banques de première génération

Les banques de première génération ($fd\text{-}blaA\text{-}L_1^{3 \rightarrow 6}$, $fd\text{-}blaA\text{-}L_1^R L_2^{6 \rightarrow 9}$ et $fd\text{-}blaA\text{-}L_1^R L_2^{C5C \rightarrow C7C}$) ont été caractérisées, en général, de la manière suivante :

La taille des banques a été estimée par étalement suivant différentes dilutions de bactéries transformées sur boîtes LB-Tet et comptage des colonies. Pour quelques clones, le gène de la β -

¹⁰ Les trois banques de première génération servent ici de vecteur de clonage.

lactamase a été amplifié par criblage PCR et la taille du fragment de PCR a été estimée par migration sur gel d'agarose à 2 %. Ensuite, ces fragments de PCR ont été séquencés.

Dans un second temps, la résistance des banques à l'ampicilline a été testée en étalant les bactéries sur boîtes LB-Tet et sur boîtes LB-Tet contenant de l'ampicilline à différentes concentrations (en général : 10, 20, 50 et 100 mg/l). Après incubation à 37°C, pendant une nuit, les clones ont été comptés et le rapport des clones poussant sur Tet et Tet-Amp a été calculé. Des amplifications par criblage PCR ont ensuite été réalisées sur quelques clones résistants et l'ADN a été séquencé.

3.2. Banques de seconde génération

Les banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C}L₃⁶ ont également été caractérisées par leur taille, le pourcentage de clones actifs et le séquençage de clones sélectionnés ou non pour activité catalytique. De plus, l'infectivité de ces banques a été estimée et la protéine de fusion pIII-enzyme mutante a été mise en évidence par 'Western Blot'. Ces techniques sont décrites dans la Partie expérimentale générale, page 158.

4. Sélection *in vivo* pour activité catalytique

Seules les banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C→C7C} ont subi une sélection pour activité catalytique.

Après électroporation des banques fd-bla4-L₁^RL₂^{C5C}, fd-bla4-L₁^RL₂^{C6C} et fd-bla4-L₁^RL₂^{C7C} dans les cellules bactériennes, celles-ci ont été étalées sur grandes boîtes (Nunc) LB-agar contenant 7,5 mg/l de tétracycline et 20 mg/l d'ampicilline. Après incubation d'une nuit à 37°C, les bactéries ont été raclées avec 5 ml de LB-Tet par boîte, puis centrifugées à 10.000 rpm, pendant 10 min. Le surnageant a permis la préparation de phages et le culot de bactéries a été utilisé pour la préparation d'ADNdb avec le kit «QIAGEN MaxiPrep» (QIAGEN).