

Résumé

L'objectif de ce travail est d'introduire, par ingénierie génétique, un site allostérique dans une enzyme pour moduler son activité catalytique par la liaison d'un ligand choisi. Ces enzymes pourraient servir de senseurs moléculaires pour la détection, voire le dosage du ligand.

Nous avons décidé de créer ces sites allostériques dans la β -lactamase TEM-1 d'*E. coli*, une enzyme dégradant les antibiotiques de type pénicilline, en réalisant l'ingénierie de trois boucles de l'enzyme. Celles-ci sont proches l'une de l'autre dans l'espace et pourraient servir d'épitope discontinu pour la reconnaissance par un anticorps ou de paratope, à savoir le site de liaison d'un anticorps, pour la reconnaissance d'autres protéines ou de petites molécules. Notre hypothèse de travail est que ces β -lactamases chimériques partageront certaines similitudes avec les anticorps de camélidés dont le site de reconnaissance n'est constitué que de trois boucles. Comme nous ne savions pas *a priori* quelles sont les séquences à introduire pour lier la molécule cible, nous avons introduit des séquences dégénérées pour créer une grande banque de mutants et sélectionner dans cette banque les clones ayant une affinité pour le ligand d'intérêt.

La partie la plus difficile de ce projet fut la création de la collection d'enzymes mutantes contenant trois boucles dégénérées. La dégénérescence de la boucle 1, située à proximité du site actif, a été réalisée en remplaçant aléatoirement trois résidus. Dans la boucle 2, un peptide aléatoire de 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 (trois tailles d'insert différentes dans la boucle 2). D'autre part, nous disposions déjà de la banque contenant l'insertion dans la boucle 3. Ces banques de première génération ont ensuite subi une sélection *in vivo* pour ne garder que les clones possédant une certaine activité catalytique, par culture des bactéries infectées sur un milieu contenant de l'ampicilline. Cette étape nous a permis d'avoir un contrôle sur la qualité des banques créées car tous les mutants d'insertions retenus ont obligatoirement une structure tertiaire. Nous avons également montré que la présence de deux résidus cystéines est nécessaire de part et d'autre de l'insert dans la boucle 2 pour maintenir une certaine activité enzymatique. D'autre part, la boucle 1 ne semble pas tolérer d'insertion peptidique et ne permet que la mutagenèse par remplacement. Les banques de première génération ont ensuite été combinées pour créer une banque de seconde génération contenant les trois boucles dégénérées. Cette construction hiérarchisée a permis, avec un bon rendement, la création d'une banque combinatoire de grande taille et de bonne qualité.

Grâce à la technique d'expression en surface de phage, cette banque a ensuite été soumise à une sélection *in vitro* afin d'isoler les clones ayant acquis de l'affinité pour des molécules cibles. Ces ligands sont un ion métallique, le Ni(II), et deux petites molécules organiques, la kanamycine et la sulfanilamide, pour lesquelles une protéine liante serait intéressante comme outil de détection. En ce qui concerne les clones sélectionnés avec le nickel, tous les clones testés contiennent des résidus histidine et montrent une modulation de l'activité en présence du métal, que ce soit une activation ou une inhibition de celle-ci. La meilleure activation a été obtenue pour le clone Ni-5-Amp₂₀-#11, qui voit son activité doublée lorsqu'il est complexé au nickel, tandis que la meilleure inhibition a été obtenue pour le clone Ni-5-#2 avec une diminution de 77 % de l'activité. Quant à la meilleure affinité, elle a été obtenue pour le clone Ni-5-#12 avec une constante de dissociation de 7.10^{-5} M. Les autres valeurs de K_d varient entre 10^{-4} M et 10^{-3} M. Parmi les clones issus de la sélection avec la kanamycine, nous avons trouvé un mutant dont l'activité catalytique est augmentée de 44 % en présence du ligand. Sa constante de dissociation est de $6,6.10^{-4}$ M. Quant à la sélection avec la sulfanilamide, elle ne nous a pas permis à ce jour d'isoler des clones ayant acquis une affinité détectable pour cette molécule.

Ces résultats nous laissent espérer que la banque construite contient potentiellement des clones ayant la capacité de lier une variété de cibles différentes. Si c'est le cas, ces enzymes chimériques possèdent des avantages sur les anticorps conjugués habituellement utilisés en immuno-détection, car la fonction de reconnaissance et la fonction enzymatique sont portées par la même molécule. Ces protéines pourraient donc être produites facilement et à plus faible coût. De plus, la modulation d'activité permet en principe de détecter la présence du ligand cible en phase homogène.

Abréviations et symboles

A	ampère
Å	Angström
aa	acide aminé
Ab	‘antibody’ ou anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNdb	ADN double brin
ADNsb	ADN simple brin
Amp	ampicilline
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
Biot	biotine
BSA	‘Bovine Serum Albumin’ ou albumine de sérum de bœuf
°C	degré Celsius
CDR	‘complementary-determining region’ ou région déterminant la complémentarité
C _H	domaine constant de la chaîne lourde
Chl	chloramphénicol
C _L	domaine constant de la chaîne légère
Da	Dalton
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dCTP	désoxycytosine triphosphate
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dUTP	désoxyuridine triphosphate
ϵ	coefficient d’absorption molaire
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylènediamine tétra-acétique
ELISA	‘Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay’
epPCR	‘error-prone PCR’ ou PCR mutagénisante
Fab	‘antigen-binding fragment’ ou fragment liant l’antigène
Fv	fragment variable
g	gramme
h	heure
HCAb	‘heavy chain antibody’ ou anticorps à chaînes lourdes
Ig	immunoglobuline
Kana	kanamycine
kb	kilobase
k _{cat}	constante catalytique
K _d	constante de dissociation
kDa	kilo Dalton
K _M	constante de Michaëlis–Menten
l	litre

LB	milieu de culture Luria Bertani
M	molaire
min.	minute
pb	paire de bases
PBP	penicillin binding protein
PCR	'Polymerase Chain Reaction'
PEG	polyéthylène glycol
penG	benzyl-pénicilline
pH	potentiel hydrogène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	révolution par minute
s	seconde
scFv	'single-chain' Fv ou fragment variable à chaîne unique
Sulf	sulfanilamide
TEMED	N,N,N',N'-tétra-méthyléthylènediamine
Tet	tétracycline
TU	'transforming unit'
UV	ultraviolet
V	volt
V _H	domaine variable de la chaîne lourde
V _L	domaine variable de la chaîne légère
v/v	rapport volume / volume
w/v	rapport poids / volume

Table des matières

Résumé	1
Abréviations et symboles	3
Table des matières	5

Introduction

I. Reconnaissance moléculaire	13
II. Ingénierie des protéines	17
1. Le design rationnel	18
1.1. Ingénierie des interactions par design rationnel	18
1.2. Ingénierie de la régulation par design rationnel	20
2. L'évolution dirigée	22
2.1. Techniques	22
2.1.1. Création de la diversité	22
(a) Mutagenèse dirigée par oligonucléotide	22
(b) Mutagenèse chimique, souches mutagènes et irradiation UV	23
(c) La PCR mutagénisante	23
(d) Le 'DNA shuffling'	23
(e) Recombinaison <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	24
(f) Approche informatisée	25
2.1.2. Lien génotype – phénotype	25
(a) 'Phage display'	26
(b) Fusions ARN-peptide	29
(c) 'Ribosome display'	30
(d) Micro-compartmentalisation	30
(e) Peptide sur plasmide	30
(f) Expression en surface de cellule	30
2.1.3. Criblage et sélection	31
(a) Criblage	31
(b) Sélection	31
2.2. Ingénierie des interactions par évolution dirigée	32
2.2.1. Peptides	33
2.2.2. Anticorps	34

2.2.3.	Inhibiteurs de protéase	35
2.2.4.	Protéines constituées d'un fuseau d'hélices	36
2.2.5.	Lipocalines	36
2.2.6.	Autres protéines	37
2.3.	Ingénierie de la régulation par évolution dirigée	37
III.	<i>β-lactamase TEM-1</i>	38
1.	Structure	40
2.	Mécanisme catalytique	42
3.	Tolérance à la mutagenèse	43
IV.	Objectifs et stratégie générale	46

Chapitre 1 : Construction des banques

I.	Introduction	49
1.	Choix des sites d'insertion	49
2.	Stratégie	51
II.	Résultats	54
	Construction du vecteur initial : fd-bla4	54
1.	Ingénierie de la boucle 1	55
1.1.	Première tentative de construction de la banque fd-bla4-L ₁ ⁶	56
1.1.1.	Construction du vecteur de clonage 1 : fd-bla4I	56
1.1.2.	Construction de la cassette dégénérée L ₁ ⁶	58
1.1.3.	Construction de la banque fd-bla4-L ₁ ⁶	59
1.1.4.	Caractérisation de la banque fd-bla4-L ₁ ⁶	60
1.2.	Seconde tentative de construction de la banque fd-bla4-L ₁ ⁶	61
1.2.1.	Construction du vecteur de clonage 2 : fd-bla4 Δ 1	61
1.2.2.	Construction de la banque fd-bla4-L ₁ ⁶	62
1.2.3.	Caractérisation de la banque fd-bla4-L ₁ ⁶	62
1.3.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^{3→5}	64
1.3.1.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^{3→5}	64
1.3.2.	Caractérisation des banques fd-bla4-L ₁ ^{3→5}	64
2.	Ingénierie des boucles 1 et 2	66
(a)	Remplacement en L ₁	66
(b)	Insertion en L ₂	67

2.2.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{6→9}	68
2.2.1.	Construction du vecteur de clonage 3 : fd-bla4Δ2	68
2.2.2.	Construction des cassettes dégénérées L ₁ ^R L ₂ ^{6→9}	68
2.2.3.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{6→9}	70
2.2.4.	Caractérisation des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{6→9}	70
2.3.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C}	73
2.3.1.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C}	73
2.3.2.	Caractérisation des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C}	74
2.3.3.	Sélection <i>in vivo</i> des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C} pour activité catalytique	75
3.	Ingénierie des boucles 1, 2 et 3	76
3.1.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C} L ₃ ⁶	76
3.1.1.	Construction des cassettes dégénérées L ₃ ⁶	77
3.1.2.	Construction des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C} L ₃ ⁶	78
3.1.3.	Caractérisation des banques fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C} L ₃ ⁶	78
4.	Analyse des séquences de clones résistants à l'ampicilline	85
4.1.	Boucle 1 (238-241)	85
4.1.1.	Boucle 1 – position 238	86
4.1.2.	Boucle 1 – position 240	86
4.1.3.	Boucle 1 – position 241	88
4.2.	Boucle 2 (41-42)	89
4.2.1.	Boucle 2 – position 1	90
4.2.2.	Boucle 2 – position 2	90
4.2.3.	Boucle 2 – positions intermédiaires	91
4.2.4.	Boucle 2 – position n-1	91
4.2.5.	Boucle 2 – position n	92
4.3.	Boucle 3 (271)	93
4.4.	Bilan	93
III.	Conclusions	94
(a)	Tolérance à l'insertion	94
(b)	Spécificité de substrat	96
IV.	Matériels et méthodes	97
1.	Construction des vecteurs	97
1.1.	Vecteur initial : fd-bla4	97
1.2.	Vecteur de clonage 1 : fd-bla4I	98
1.3.	Vecteur de clonage 2 : fd-bla4Δ1	98

1.4.	Vecteur de clonage 3 : fd-bla4Δ2	99
2.	Construction des banques	100
2.1.	fd-bla4-L ₁ ^{3→6}	100
2.1.1.	Construction des cassettes dégénérées L ₁ ^{3→6}	100
2.1.2.	Clonage de la cassette L ₁ ⁶ dans le vecteur fd-bla4I	100
2.1.3.	Clonage des cassettes L ₁ ^{3→6} dans le vecteur fd-bla4Δ1	101
2.2.	fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{6→9} et fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C}	101
2.2.1.	Construction des cassettes dégénérées L ₁ ^R L ₂ ^{6→9} et L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C}	101
2.2.2.	Clonage des cassettes L ₁ ^R L ₂ ^{6→9} et L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C} dans le vecteur fd-bla4Δ2	102
2.3.	fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C} L ₃ ⁶	102
2.3.1.	Construction de la cassette dégénérée L ₃ ⁶	102
2.3.2.	Clonage de la cassette L ₃ ⁶ dans fd-bla4-L ₁ ^R L ₂ ^{C5C→C7C}	103
3.	Caractérisation des banques	103
3.1.	Banques de première génération	103
3.2.	Banques de seconde génération	104
4.	Sélection <i>in vivo</i> pour activité catalytique	104

Chapitre 2 : Sélections pour affinité et criblages pour régulation

I.	Introduction	105
1.	Choix des ligands	105
1.1.	Le nickel	105
1.2.	La kanamycine A et la sulfanilamide	106
1.2.1.	La kanamycine A	106
1.2.2.	La sulfanilamide	107
2.	Sélection pour affinité	108
3.	Criblage pour la régulation	110
II.	Résultats	111
1.	Sélections pour affinité et pour activité	111
1.1.	Affinité pour le nickel	111
1.1.1.	Sélection pour affinité	111
	Caractérisation de la population sélectionnée Ni-5	112
1.1.2.	Sélection <i>in vivo</i> pour activité catalytique	115
1.2.	Affinité pour la kanamycine ou pour la sulfanilamide	117
1.2.1.	Première tentative de sélection : Sulf _I et Kana _I	117

Caractérisation des populations sélectionnées Kana ₁ -6 et Sulf ₁ -5	118
1.2.2. Deuxième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana ₂	122
Caractérisation de la population sélectionnée Kana ₂ -6	123
1.2.3. Troisième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana ₃	126
Caractérisation de la population sélectionnée Kana ₃ -6	127
2. Criblage pour régulation	130
2.1. Régulation par le nickel	130
2.1.1. Effet du nickel sur l'activité de clones isolés	130
(a) Effet sur l'activité envers la pénicilline G	130
(b) Effet sur l'activité envers le CENTA	133
2.1.2. Calcul de constantes de dissociation	134
2.1.3. Contrôles	138
(a) Effet du nickel sur l'activité du phage sauvage et de la banque naïve	138
(b) Complexation du nickel par l'EDTA	138
2.2. Régulation par la kanamycine ou la sulfanilamide	138
2.2.1. Influence du ligand sur l'activité catalytique de clones Sulf ₁ -5 et Kana ₁ -6	138
2.2.2. Influence du ligand sur l'activité catalytique de clones Kana ₂ -6	139
III. Conclusions	140
IV. Matériels et méthodes	142
1. Sélections <i>in vitro</i> pour affinité	142
1.1. Sélection sur la kanamycine et la sulfanilamide	142
1.1.1. Première tentative de sélection : Sulf ₁ et Kana ₁	142
1.1.2. Deuxième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana ₂	143
1.1.3. Troisième tentative de sélection sur la kanamycine : Kana ₃	144
1.2. Sélection sur le nickel	144
1.3. Calcul du rendement des tours de sélection	145
1.4. Amplification des phages élus	145
2. Caractérisation des phages sélectionnés	145
2.1. Tests ELISA	145
2.1.1. ELISA sur la kanamycine biotinylée	146
2.1.2. ELISA sur la BSA	146
2.2. Criblage PCR et séquençage	146
3. Criblage pour régulation	146
4. Sélection <i>in vivo</i> pour activité catalytique	146

Conclusions et perspectives

I. Conclusions	149
II. Perspectives	150
1. Perspectives à court terme	150
2. Perspectives d'applications	151
2.1. Détection	151
2.2. Ingénierie de la catalyse	154

Partie expérimentale

1. Bactéries	155
1.1. Souches bactériennes utilisées	155
1.2. Préparation de cellules électro-compétentes	155
1.3. Transformation d'ADN par électroporation	156
2. Phage display	156
2.1. Amplification et purification des phages	156
2.1.1. Infection des bactéries	156
2.1.2. Amplification des phages	157
2.1.3. Purification des phages	157
2.2. Caractérisation des solutions de phages	157
2.2.1. Mesure de la concentration des phages	157
2.2.2. Titrage d'une solution de phages	158
2.2.3. Mesure de l'infectivité des phages	158
2.3. Mesure de l'activité catalytique des phage-enzymes	158
2.4. Western Blot	158
3. Préparation de l'ADN des phages	159
3.1. Préparation de l'ADNsb	159
3.2. Préparation d'ADNdb	159
3.2.1. Technique de purification par gradient de concentration de chlorure de césium	159
(a) Lyse des bactéries et récupération de l'ADNdb	159
(b) Purification de l'ADN par gradient de concentration de chlorure de césium	160
3.2.2. Préparation d'ADNdb par kits commerciaux	160
4. Manipulations de l'ADNdb	160
4.1. Oligonucléotides	160
Phosphorylation des oligonucléotides	160

4.2.	Ligations	161
4.3.	Restrictions	161
4.4.	Purification de fragments d'ADNdb	161
4.4.1.	Purification par extraction au phénol ou 'clean-up'	161
4.4.2.	Purification par kits commerciaux	161
4.5.	Analyse par électrophorèse	162
4.5.1.	Gel de polyacrylamide	162
4.5.2.	Gel d'agarose	162
4.6.	Criblage PCR	162
4.7.	Séquençage	163

Bibliographie

<i>Bibliographie</i>	165
----------------------	-----

Annexes

Annexe 1	177
Annexe 2	178
Annexe 3	180
Annexe 4	181