

CARINE PAQUET-BOUCHARD

**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE LA
PROTÉINE ANTIBIOTIQUE P1 DU PHAGE AP205**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie-Immunologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MÉDICALE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

DÉCEMBRE, 2006

Résumé

La recrudescence de maladies infectieuses et le nombre grandissant de bactéries résistantes aux antibiotiques sont des problèmes majeurs de santé publique. Ainsi, le développement d'une nouvelle catégorie d'agents antimicrobiens est de plus en plus pressant. Nous nous sommes tournés vers les bactériophages afin d'en connaître davantage sur les moyens qu'ils utilisent pour tuer les bactéries. Cependant, jusqu'à maintenant il existe très peu de connaissances sur leur activité bactéricide. Nous avons donc caractérisé le mode d'action de la protéine de lyse P1 du phage AP205 à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo*. Ce phage a pour hôte *Acinetobacter*. La protéine P1 cible un élément essentiel à la survie bactérienne, la paroi de peptidoglycane. En fait, nous avons découvert qu'elle inhibe plusieurs enzymes impliquées au niveau de cette voie synthèse. Nous espérons que les connaissances acquises sur cette protéine antibiotique contribueront au développement d'une nouvelle classe d'agents antimicrobiens.

Abstract

The constant increase of infectious diseases and bacterial resistance to antibiotics are major problems of public health. Thus, development of a new class of antimicrobial agents is very urgent. We have decided to explore bacteriophages to learn more about the way they kill bacteria. Therefore, until now, the knowledge about this bactericidal activity is limited. We have characterized the inhibition mechanism of P1 lysis protein from phage AP205 using *in vitro* and *in vivo* approaches. The host of this phage is *Acinetobacter*. The P1 lysis protein targets an essential element for the bacterial survival, the bacterial cell wall. Actually, we hope that knowledge about this protein will contribute to the development of a new class of antibiotics.

Remerciements

Merci à tous! Tous ceux qui ont influencé ma vie, de près ou de loin, et qui font que je suis devenue qui je suis.

En commençant par mes parents, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir encouragé dans mes études, de m'avoir toujours soutenue et de vous être intéressés à mes travaux. Un merci spécial à mon père pour son soutien financier durant mes études. Je remercie aussi mon grand frère et ma petite sœur. Je suis sûre que vous êtes aussi fière de moi que moi de vous. À vous quatre, Merci!

Luc, je te remercie de m'avoir soutenue moralement dans les mauvais comme dans les beaux moments. Merci pour ta patience, ton écoute et ton amour. Ce n'était pas toujours facile, mais merci beaucoup d'avoir été là et d'avoir franchi cette étape avec moi.

Merci à Roger C. Levesque, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de faire une maîtrise sur un sujet passionnant. Merci de m'avoir donné l'encadrement nécessaire à ma réussite. Merci aussi de m'avoir transmis le goût de la recherche et les outils nécessaires pour bien performer dans ma carrière future. Merci pour tous les judicieux conseils et pour les nombreuses découvertes musicales.

Je veux remercier François Sanschagrin pour toute l'aide qu'il a su m'apporter. Merci de m'avoir enseigné toutes ces connaissances techniques. Merci d'avoir répondu à mes mille et une questions et merci pour le soutien informatique. Je te remercie pour les discussions sur le futur, pour les conseils sur la profession et de m'avoir aidé à m'orienter.

Merci à tous les étudiants qui ont été de passage, comme moi, dans le laboratoire de Roger. Vous avez tous contribué à un climat de travail amical et agréable. Un merci particulier à Catherine Paradis-Bleau pour avoir suivi des cours de step à l'université en même temps que moi. Merci surtout pour tes idées qui ont données naissance au projet phages. Merci aussi à Iréna Kukavica Ibrulj, Isabelle Cloutier, Karine Richard, Éric Potvin, Julien Trépanier et Pascale Simard. À tous, je vous souhaite un futur à la hauteur de vos attentes.

À tous ceux que j'ai oubliés ou que je n'ai pu nommer, MERCI!

Avant-Propos

Le présent mémoire est le résultat de mes travaux de maîtrise accomplis en deux ans et des poussières. Il s'inscrit dans le cadre d'un projet de caractérisation moléculaire de protéines phagiques antibiotiques. J'espère qu'il contribuera un jour au développement d'agents antimicrobiens innovateurs afin de résoudre les problèmes reliés aux résistances bactériennes aux antibiotiques.

Le mémoire est composé de trois parties. La première contient l'introduction et traite des maladies infectieuses, du mode d'action des antibiotiques et de la résistance des bactéries à ceux-ci. De plus, j'y ai décrit la voie de biosynthèse du peptidoglycane ainsi que les antibiotiques qui ciblent cette structure bactérienne. Ensuite, je présente les mécanismes de lyse des bactériophages pour finalement terminer avec la présentation de mon projet de maîtrise.

La seconde partie est rédigée en anglais sous forme d'un article scientifique où je suis l'auteure principale. Cet article décrit la caractérisation moléculaire de la protéine antibiotique P1 du phage AP205 et sera soumis au périodique *Journal of Virology* pour publication. Ma contribution dans cet article, mise à part la rédaction, se traduit par l'exécution des expérimentations avec l'aide précieuse de François Sanschagrin, professionnel de recherche. Mon directeur de recherche, Roger C. Levesque, ainsi que François Sanschagrin m'ont aidé dans l'analyse et l'interprétation des résultats. De plus, la correction de l'article a été faite par Roger C. Levesque.

La conclusion du projet de recherche se retrouve dans la troisième et dernière partie du mémoire.

À mes parents, Anne et Léandre

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Remerciements.....	iii
Avant-Propos	iv
Chapitre 1 INTRODUCTION	1
Partie 1 Maladies infectieuses.....	2
1.1 D’hier à aujourd’hui.....	2
1.2 Émergence et réémergence	4
Partie 2 Antibiotiques	5
2.1 Mode d’action	5
2.2 Résistances aux antibiotiques	6
2.2.1 Mécanismes de résistance.....	6
Partie 3 Peptidoglycane	8
3.1 Généralités	8
3.2 Étapes de la biosynthèse	9
3.2.1 Biosynthèse des précurseurs cytoplasmiques	9
3.2.2 Liaison du précurseur à la membrane	11
3.2.3 Insertion du nouveau peptidoglycane dans la paroi.....	12
Partie 4 Antibiotiques et peptidoglycane.....	13
4.1 Fosfomycine.....	13
4.1.1 Caractéristiques.....	13
4.1.2 Site et mécanisme d’action	14
4.2 Tunicamycine, Muréidomycines et Liposidomycines.....	16
4.2.1 Caractéristiques.....	16
4.2.2 Site et mécanisme d’action	18
4.3 Bacitracine	19
4.3.1 Caractéristiques.....	19
4.3.2 Site et mécanisme d’action	20
4.4 Ramoplanine	21
4.4.1 Caractéristiques.....	21
4.4.2 Site et mécanisme d’action	22
4.5 Vancomycine	23
4.5.1 Caractéristiques.....	23
4.5.2 Site et mécanisme d’action	23
4.6 Pénicillines et Céphalosporines	25
4.6.1 Caractéristiques.....	25

4.6.2 Site et mécanisme d'action	26
Partie 5 Mécanismes de lyse des bactériophages.....	28
5.1 Système holine-endolysine	29
5.2 Protéines inhibitrices de la biosynthèse du peptidoglycane.....	32
5.2.1 Φ X174.....	32
5.2.2 Q β	34
Partie 6 Mise en situation du projet de recherche.....	36
6.1 Problématique	36
6.2 Hypothèse et objectifs.....	36
6.3 Résumé de la méthodologie.....	36
Chapitre 2 RÉSULTATS.....	39
RÉSUMÉ	40
ABSTRACT.....	42
INTRODUCTION	43
MATERIALS AND METHODS.....	45
RESULTS	55
DISCUSSION.....	59
ACKNOWLEDGMENTS	62
REFERENCES	63
TABLES	67
FIGURE LEGENDS.....	72
FIGURES.....	73
Chapitre 3 CONCLUSION.....	77
Bibliographie	81
ANNEXE A.....	86
ANNEXE B	88
ANNEXE C	90
ANNEXE D.....	92
ANNEXE E.....	94
ANNEXE F.....	95

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples de maladies chroniques causées par des agents infectieux.	3
Tableau 2. Classification des bactériophages.	28

Liste des figures

Figure 1. Facteurs favorisant la diminution des maladies infectieuses au 20 ^e siècle.....	2
Figure 2. Facteurs menant à l'émergence de maladies infectieuses.	4
Figure 3. Résumé des principaux sites d'action des antibiotiques.	5
Figure 4. Exemple de mécanisme de résistance bactérien : pompe à efflux.	6
Figure 5. Structure d'une pénicilline avant et après l'action d'une β -lactamase.....	7
Figure 6. Représentation de la structure tridimensionnelle du peptidoglycane. Le squelette de glycans est représenté en orange et les ponts peptidiques en vert. (A) Octamère vu de côté (haut) et du dessous (bas). Polymère vu (B) d'en haut et (C) de côté.....	8
Figure 7. Représentation schématique des parois bactériennes des bactéries Gram négatif (gauche) et Gram positif (droite). Peptidoglycane (jaune), lipoprotéines (mauve), acides téichoïques (vert), phospholipides (brun) et lipopolysaccharides (orange).....	9
Figure 8. Étapes cytoplasmiques de la biosynthèse de peptidoglycane.....	10
Figure 9. Étapes de transfert du précurseur cytoplasmique à l'accepteur membranaire undécaprénol-phosphate et de formation du lipide II.	11
Figure 10. (A) Structure chimique du dimère. (B) Vue stéréoscopique de 20 conformations superposées de la structure RMN du dimère. (Les résidus L-Lys-D-Ala-D-Ala ont été omis pour plus de clarté.) Atomes d'oxygène en rouge, d'azote en bleu et de carbone en jaune.	12
Figure 11. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse de la paroi bactérienne.	13
Figure 12. Structure de la fosfomycine (A) et du phosphoénolpyruvate (B). Le groupement époxyde de la fosfomycine est encadré en bleu sur la figure.	14
Figure 13. Structure de MurA (en bleu) complexée à la fosfomycine (en rouge). En jaune, résidu de surface altéré. Remplacement de la lysine 138 par un résidu glutamine (Pour plus d'informations voir la Partie 5, section 5.2.2).....	14
Figure 14. Représentation de l'inactivation de MurA par la fosfomycine.	15
Figure 15. Réactions catalysées par une glutathione transférase (GSH), une L-cystéine thiol transférase (L-CySH) et une hydrolase (H ₂ O) menant à la l'inactivation de la fosfomycine.	16
Figure 16. Structure de la tunicamycine, de la liposidomycine B et de la muréidomycine A.	17
Figure 17. Modèle de biosynthèse de la tunicamycine proposé par Tsvetanova et collaborateurs.....	18
Figure 18. Structure de la bacitracine.	19
Figure 19. Biosynthèse du PG et site d'action de la bacitracine.....	20
Figure 20. Structure générale de la ramoplanine.	22

Figure 21. Structure de la vancomycine.	23
Figure 22. Séquestration de l'extrémité terminale du PG contenant les résidus D-Ala-D-Ala par la vancomycine.	24
Figure 23. Différentes générations de (A) pénicillines et (B) céphalosporines selon les différentes chaînes latérales.	25
Figure 24. Hydrolyse des noyaux β -lactames des (A) pénicillines et des (B) céphalosporines par les β -lactamases.	27
Figure 25. Représentation schématique du cycle de vie d'un bactériophage à ADN. (1) Adsorption et injection de l'ADN; (2) Réplication de l'ADN; (3) Production des têtes et des queues du phage; (4) Synthèse de la holine et de l'endolysine; (5) Empaquetage de l'ADN; (6) Assemblage des virions; (7) Lyse de la bactérie et relâche des virions.	29
Figure 26. Résumé des principaux sites de clivage des endolysines au niveau du PG des bactéries à Gram positif.	30
Figure 27. Structure de base des endolysines phagiques. L'endolysine peut contenir jusqu'à deux domaines catalytiques en N-terminal (jaune et bleu) relié à un domaine de liaison en C-terminal (rose).	30
Figure 28. Système holine-endolysine. (A) Accumulation de l'endolysine dans le cytoplasme et de la holine dans la membrane interne (IM). OM : membrane externe; Murein : PG; LPP : lipoprotéine et OP : oligopeptide. (B) Formation d'un pore par la holine dans la IM et passage de l'endolysine du cytoplasme au périplasme pour dégrader le peptidoglycane.	31
Figure 29. Micrographie électronique du <i>Microviridae</i> Φ X174. La barre représente 100 nm.	33
Figure 30. Modèle proposé pour le mécanisme de lyse cellulaire de la protéine E.....	34
Figure 31. Structure tridimensionnelle de la capsidie icosaédrique du coliphage Q β	34
Figure 32. Résumé de la méthodologie utilisée.	38

Chapitre 1 INTRODUCTION

Partie 1 Maladies infectieuses

1.1 D'hier à aujourd'hui

Au début du 20^e siècle, la première cause mondiale de mortalité était les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, la pneumonie et les maladies diarrhéiques. Cependant, l'amélioration des conditions de vie telles que les conditions sanitaires, une meilleure nutrition ainsi qu'une eau de qualité ont permis de diminuer la mortalité et la morbidité reliées à ces maladies. En effet, ces améliorations ont contribué à diminuer la susceptibilité de l'hôte, mais aussi à restreindre la transmission de maladies. Voir la figure 1 pour un résumé des facteurs favorisant la diminution des maladies infectieuses au 20^e siècle (Cohen, 2000).

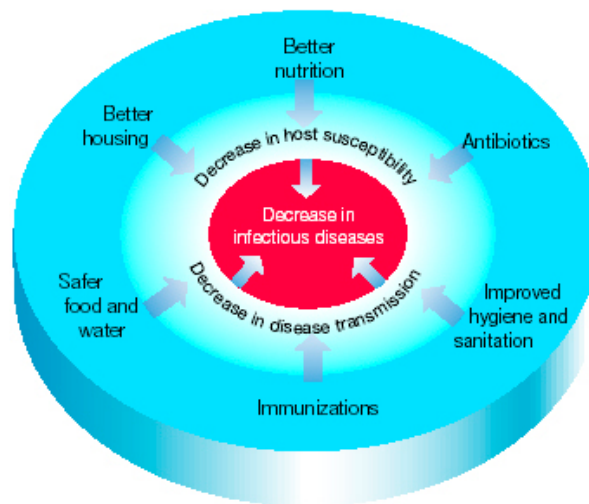


Figure 1. Facteurs favorisant la diminution des maladies infectieuses au 20^e siècle.

Source : (Cohen, 2000)

L'introduction d'agents antimicrobiens au milieu du 20^e siècle n'a fait qu'accélérer le déclin des maladies infectieuses. Malheureusement, dans les pays en voie de développement, les maladies infectieuses sont demeurées la cause majeure de décès (Cohen, 2000). En effet, les avancées technologiques n'ont eu que très peu d'influence dans

ces pays. Dans la deuxième moitié du 20^e siècle, dans la plupart des pays développés, la mortalité reliée aux maladies infectieuses a été remplacée par la mortalité reliée aux maladies chroniques comme le cancer, les maladies cardiaques et cérébrales (Cohen, 2000). De plus dans cette même période, il a été démontré que certaines maladies chroniques étaient directement causées par des infections microbiennes ou résultaient indirectement de microbes infectieux (Fauci, 2001). On peut voir dans le tableau 1 quelques exemples de maladies chroniques et les agents infectieux qui y sont associés. On estimait alors que 16% de tous les cancers étaient directement ou indirectement associés à un agent microbien (Fauci, 2001).

Tableau 1. Exemples de maladies chroniques causées par des agents infectieux.

Source : (Fauci, 2001)

Microbe	Disease
<i>Helicobacter pylori</i>	Peptic ulcers, gastric carcinoma
Human papillomavirus	Cervical, anal, vulvar carcinoma
Hepatitis B/C viruses	Hepatocellular carcinoma
Epstein-Barr virus	Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma
Human T lymphotropic virus type I	Adult T cell leukemia
Human herpesvirus 8	Kaposi's sarcoma
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lyme arthritis
<i>Tropheryma whippelii</i>	Whipple's disease

En 1998, selon le National Institute of Health (NIH), les maladies infectieuses sont la seconde cause de mortalité dans le monde. Les trois principales maladies sont : les infections des voies respiratoires inférieures, le VIH/SIDA et les maladies diarrhéiques. Au cours du 21^e siècle, les maladies infectieuses soulèveront d'importantes considérations de santé publique tant au niveau domestique qu'international. En fait, l'évolution continue des maladies émergentes et réémergentes ne fera qu'accroître l'impact global des maladies infectieuses au cours de ce siècle (Fauci, 2001).

1.2 Émergence et réémergence

L'émergence et la réémergence de maladies infectieuses ont débuté vers la fin du 20^e siècle. Effectivement, de nouvelles maladies et de nouveaux microorganismes ont été identifiés : la maladie du Légionnaire, le syndrome du choc toxique, le VIH, et bien d'autres. Certaines maladies comme le choléra, la tuberculose, la fièvre jaune et la malaria ont, quant à elles, réémergé (Cohen, 2000). Une multitude de facteurs (voir figure 2) peut contribuer aux phénomènes de l'émergence et de la réémergence de maladies. Par exemple, les conditions de vie, les comportements et le vieillissement de la population contribuent à l'augmentation de la transmission des maladies et de la susceptibilité de l'hôte aux agents pathogènes (Cohen, 2000; Lashley, 2003).

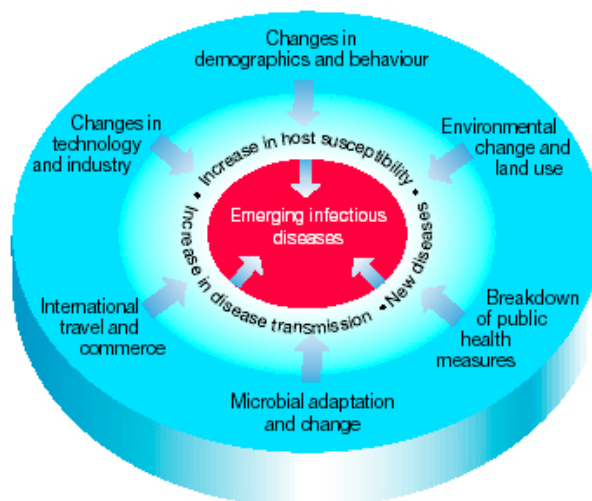


Figure 2. Facteurs menant à l'émergence de maladies infectieuses.

Source : (Cohen, 2000)

L'adaptation microbienne fait aussi partie de ces facteurs. En effet, la surutilisation d'agents antimicrobiens a mené à l'apparition de plusieurs résistances dans le monde bactérien (Cohen, 2000).

Partie 2 Antibiotiques

2.1 Mode d'action

Les antibiotiques sont d'origine naturelle ou synthétique. Les différentes classes d'antibiotiques agissent à différents niveaux chez la bactérie (voir la figure 3 pour un résumé des sites d'action) (Walsh, 2003). Ils agissent notamment au niveau de la biosynthèse de la paroi bactérienne, des protéines, de la réplication de l'ADN et de l'ARN et de la biosynthèse de l'acide folique. Ils peuvent entraîner la mort des bactéries (bactéricides) ou seulement inhiber leur croissance (bactériostatiques) (Walsh, 2003).

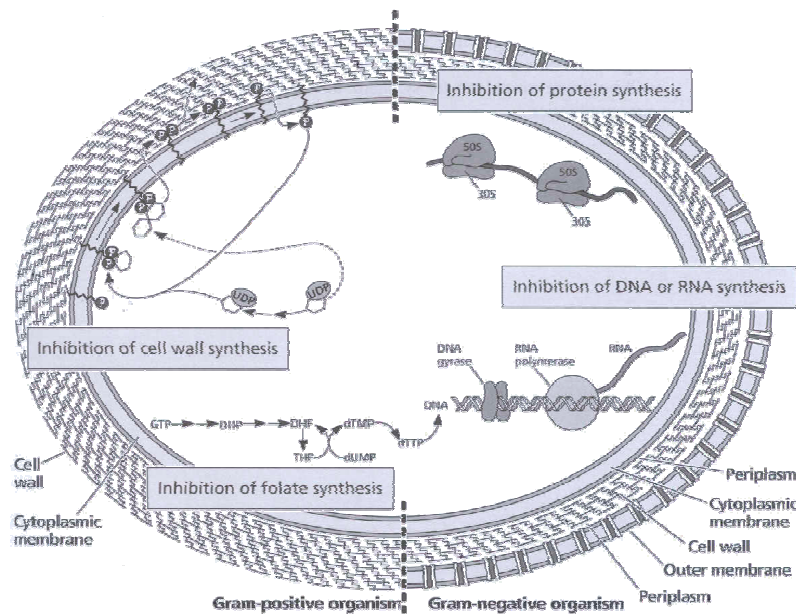


Figure 3. Résumé des principaux sites d'action des antibiotiques.

Source : (Walsh, 2003)

2.2 Résistances aux antibiotiques

2.2.1 Mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé des résistances à tous les antibiotiques auxquels elles ont été confrontées. En fait, la résistance aux antibiotiques est un résultat de la sélection Darwinienne classique (Normark et Normark, 2002). Trois principaux types de stratégies sont employées par les bactéries pour annuler l'effet des antibiotiques sur elles : la pompe à efflux, l'inactivation ou la modification de l'antibiotique et la modification de la cible (Walsh, 2003).

2.2.1.1 Pompe à efflux

La bactérie peut produire une protéine membranaire, la pompe à efflux, qui permet l'exportation de l'antibiotique. Comme on peut le voir à la figure 4, la pompe permet une sortie d'antibiotique plus rapide que l'entrée. Ainsi, la concentration intracellulaire d'antibiotique demeure à un niveau faible et inefficace (Walsh, 2000).

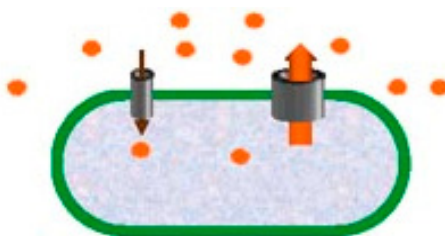


Figure 4. Exemple de mécanisme de résistance bactérien : pompe à efflux.

Source : Adaptée de (Walsh, 2000)

Les pompes à efflux sont des variantes de pompes membranaires bactériennes servant à la base à transporter des molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Certaines sont même utilisées par des bactéries productrices d'antibiotiques. Elles leur évitent ainsi d'être tuées par leurs propres armes chimiques. La pompe à efflux est surtout utilisée contre les antibiotiques qui ciblent la biosynthèse protéique tels que les tétracyclines et les macrolides de la classe des érythromycines (Walsh, 2000).

2.2.1.2 Inactivation ou modification de l'antibiotique

La seconde stratégie vise à détruire ou modifier l'antibiotique afin qu'il devienne inactif. L'exemple classique d'inactivation est celui des pénicillines et céphalosporines. Le groupement actif de ces antibiotiques est le noyau β -lactame. Cet anneau est hydrolysé par des β -lactamases produites par les bactéries (voir figure 5). Ainsi, l'antibiotique devient inactif avant même d'avoir pu atteindre sa cible, soient les protéines liant la pénicilline (PLPs) (Walsh, 2000).

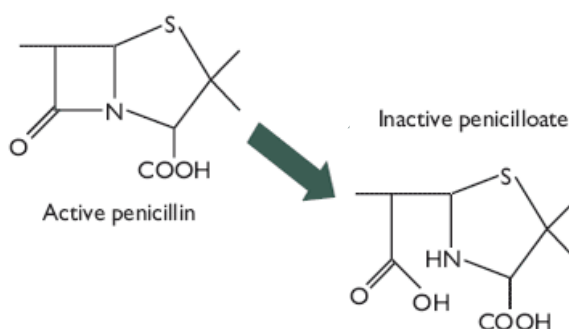


Figure 5. Structure d'une pénicilline avant et après l'action d'une β -lactamase.

Source : http://www.hpa.org.uk/hpa/publications/amr_report_05/3_mdr.htm

De plus, l'antibiotique peut être modifié par ajout de groupements chimiques sur sa structure. Par exemple, les aminoglycosides, qui ciblent la synthèse protéique, peuvent être modifiés par des enzymes bactériennes avec trois types de groupements chimiques. Ces modifications vont mener à l'acétylation, la phosphorylation et à l'adénylation de l'antibiotique. L'aminoglycoside aura donc une plus faible affinité pour sa cible, l'ARN du ribosome. Ainsi, l'antibiotique perd son activité destructrice (Walsh, 2000).

2.2.1.3 Modification de la cible

La troisième stratégie met l'accent sur la cible de l'antibiotique. Elle consiste à reprogrammer ou camoufler la cible. La résistance aux pénicillines peut se situer au niveau des β -lactamases mais aussi des PLPs. En effet, les bactéries peuvent produire de nouvelles PLPs ou y introduire des mutations. Dans les deux cas, les PLPs auront moins d'affinité pour la pénicilline. De cette façon, l'antibiotique devient inefficace (Walsh, 2000).

Partie 3 Peptidoglycane

3.1 Généralités

Le peptidoglycane (PG), ou muréine, est un composant important de la paroi bactérienne. Cette structure confère une résistance mécanique contre la pression osmotique interne bactérienne et permet le maintien de la forme de la bactérie. De plus, le PG est une structure unique aux cellules procaryotes absente des cellules eucaryotes (El Zoeiby *et al.*, 2003). Ceci en fait une très bonne cible pour des antimicrobiens.

Le PG est un polymère fait de longues chaînes de glycans reliées entre elles par des ponts peptidiques flexibles afin de former une structure solide, mais élastique (voir figure 6) (Scheffers et Pinho, 2005).

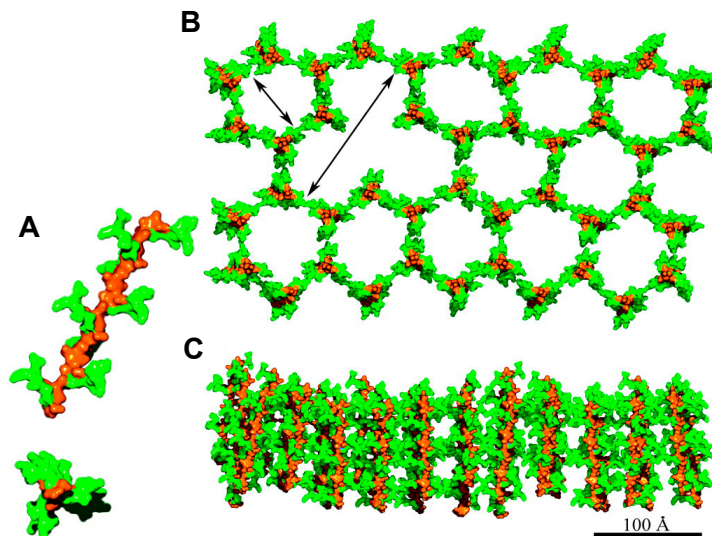


Figure 6. Représentation de la structure tridimensionnelle du peptidoglycane. Le squelette de glycans est représenté en orange et les ponts peptidiques en vert. (A) Octamère vu de côté (haut) et du dessous (Meroueh *et al.*). Polymère vu (B) d'en haut et (C) de côté.

Source : Adaptée de (Meroueh *et al.*, 2006)

La paroi des bactéries à Gram positif est constituée d'au moins 10 à 20 couches de PG, tandis que celle des bactéries à Gram négatif de seulement 1 à 3 couches. De plus, le PG

des bactéries à Gram positif est lié de façon covalente ou non aux acides téichoïques et téichuroniques ainsi qu'aux protéines ancrées dans la membrane cytoplasmique. Cependant, le PG des bactéries à Gram négatif est attaché de façon covalente à la membrane externe via les lipoprotéines (voir figure 7) (Scheffers et Pinho, 2005).

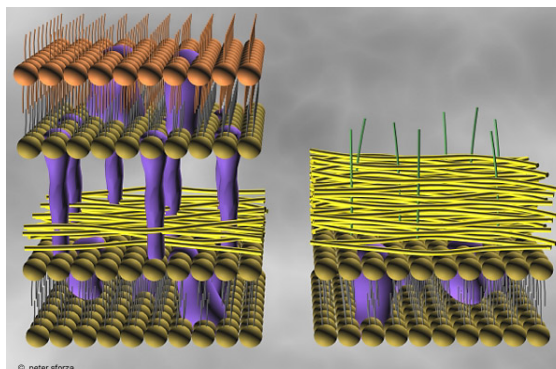


Figure 7. Représentation schématique des parois bactériennes des bactéries à Gram négatif (gauche) et à Gram positif (droite). Peptidoglycane (jaune), lipoprotéines (mauve), acides téichoïques (vert), phospholipides (brun) et lipopolysaccharides (orange).

Source : http://oak.ppws.vt.edu/~sforza/prokaryote/cell_walls.html

Malgré ces quelques différences, la biosynthèse du PG est similaire d'une bactérie à l'autre et les enzymes impliquées sont très conservées dans le monde bactérien. La biosynthèse comporte trois principales étapes. Tout d'abord, il y a la formation des précurseurs cytoplasmiques, suivi de leur transfert à la membrane et finalement de leur ajout au PG préexistant (Scheffers et Pinho, 2005).

3.2 Étapes de la biosynthèse

3.2.1 Biosynthèse des précurseurs cytoplasmiques

La première étape survient dans le cytoplasme et permet la formation du monomère UDP-N-acétylmuramate-pentapeptide (MurNAc-pentapeptide). La première étape de la voie de biosynthèse est le transfert d'un résidu énoypyruvate du phosphoénolpyruvate (PEP) à la position 3 de l'UDP-N-acétylglucosamine (GlcNAc) (El Zoeiby *et al.*, 2003). Cette

réaction est catalysée par l'enzyme MurA. Ensuite, MurB, une réductase, catalyse la réduction du groupement énoypyruvate en D-lactate, menant ainsi à la formation de l'UDP-N-acétylmuramate (MurNAc). Finalement, MurC, MurD, MurE et MurF, des amides ligases dépendantes de l'ATP, catalysent l'ajout progressif d'acides aminés au groupe D-lactate réduit pour mener à la formation du MurNAc-pentapeptide (voir figure 8) (El Zoeiby *et al.*, 2003).

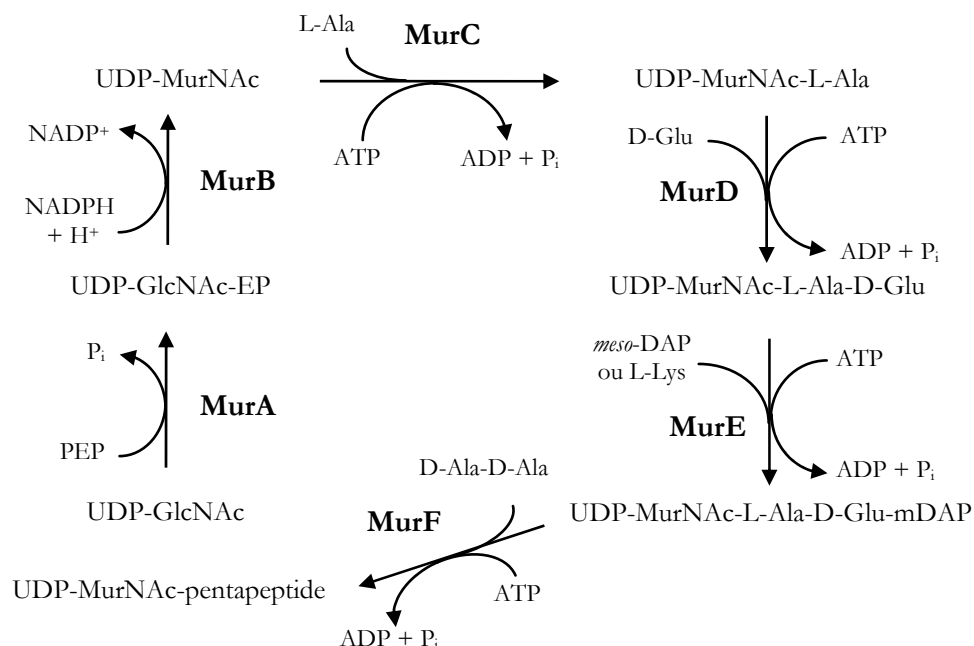


Figure 8. Étapes cytoplasmiques de la biosynthèse de peptidoglycane.

Source : Adaptée de (El Zoeiby *et al.*, 2003)

MurC engendre l'ajout du résidu L-Alanine (L-Ala), MurD de l'acide D-Glutamique (D-Glu), MurE du résidu L-Lysine (L-Lys) dans le cas des bactéries à Gram positif et de l'acide *meso*-diaminopimélique (mDAP) dans le cas des bactéries à Gram négatif. Finalement, MurF ajoute le résidu D-Alanine-D-Alanine (D-Ala-D-Ala) (El Zoeiby *et al.*, 2003).

3.2.2 Liaison du précurseur à la membrane

La deuxième étape se situe à la membrane cytoplasmique et implique le transfert du précurseur cytoplasmique du cytoplasme à la membrane. Les enzymes impliquées à cette étape de la biosynthèse sont des enzymes membranaires. La réaction de transfert est catalysée par la translocase *MraY*. L'enzyme transfère le groupement phospho-MurNAc-pentapeptide de l'UDP-MurNAc-pentapeptide à l'accepteur membranaire, undécaprénol-phosphate, pour mener à la formation du MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprénol ou lipide I. Par la suite, la transférase *MurG* ajoute un résidu GlcNAc au lipide I pour former le GlcNAc-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprénol ou lipide II (voir figure 9) (van Heijenoort, 2001).

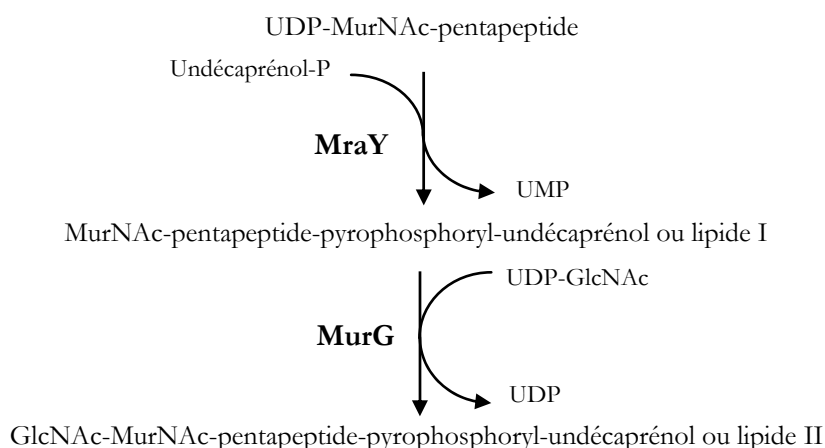


Figure 9. Étapes de transfert du précurseur cytoplasmique à l'accepteur membranaire undécaprénol-phosphate et de formation du lipide II.

Source : Adaptée de (Liu *et al.*, 2003; Bouhss *et al.*, 2004)

Le lipide II, avec le transporteur membranaire en moins, correspond à un monomère. Cette unité disaccharide-pentapeptide est considérée comme l'unité de base du PG et est ajoutée au PG préexistant. On peut voir une représentation de cette structure à la figure 10. De plus, au cours de cette étape, la sous unité peptidique peut subir diverses modifications, par exemple l'ajout d'un acide aminé (van Heijenoort, 2001).

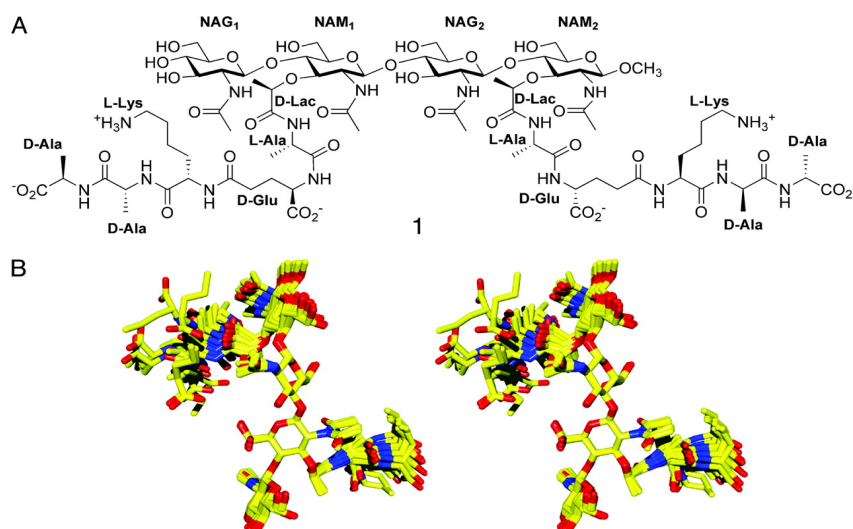


Figure 10. (A) Structure chimique du dimère. (B) Vue stéréoscopique de 20 conformations superposées de la structure RMN du dimère. Les résidus L-Lys-D-Ala-D-Ala ont été omis pour plus de clarté. Atomes d'oxygène en rouge, d'azote en bleu et de carbone en jaune.

Source : (Meroueh *et al.*, 2006)

3.2.3 Insertion du nouveau peptidoglycane dans la paroi

L'intermédiaire lipidique, ou lipide II, est ensuite transféré au périplasma par un mécanisme inconnu. Cependant, les flippases sont des candidates potentielles à cette fonction (van Heijenoort, 2001). La dernière étape de biosynthèse est catalysée par des PLPs et implique des réactions de transglycosylation et de transpeptidation (Scheffers et Pinho, 2005). Lors de la transglycosylation, il y a élongation de la chaîne de glycans. En fait, l'extrémité réduite du MurNac du PG naissant lié à la membrane est transférée au résidu GlcNac du PG préformé et entraîne la relâche concomitante de l'undécaprénol-pyrophosphate. L'accepteur membranaire sera ensuite déphosphorylé pour être réutilisé (Scheffers et Pinho, 2005). Au cours de la transpeptidation, il y a formation d'une liaison entre l'extrémité N-terminale du troisième acide aminé (mDAP ou L-Lys) et l'extrémité C-terminale de l'avant dernier résidu D-Ala du pentapeptide. La réaction de transpeptidation est accompagnée du clivage du lien D-Ala-D-Ala pour permettre la formation d'un térapeptide (Matsuhashi *et al.*, 1990; van Heijenoort, 2001). Ainsi, la forme finale du polymère de peptidoglycane contient une chaîne térapeptidique et non pentapeptidique.

Partie 4 Antibiotiques et peptidoglycane

Certains des antibiotiques qui affectent la paroi bactérienne inhibent des enzymes ou séquestrent des substrats impliqués dans les étapes d'assemblage du PG. Parmi tous les antibiotiques qui existent, seulement quelques uns ciblent la biosynthèse du PG (voir figure 11) (Walsh, 2003).

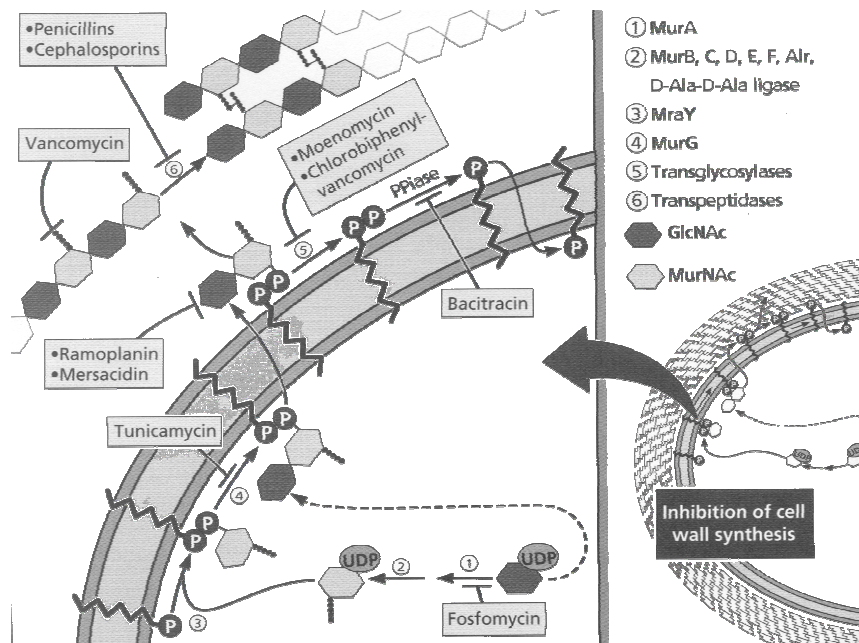


Figure 11. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse de la paroi bactérienne.

Source : (Walsh, 2003)

4.1 Fosfomycine

4.1.1 Caractéristiques

La fosfomycine a été découverte par Hendlin et collaborateurs en 1969. C'est un antibiotique naturel produit par *Streptomyces fradiae*, *S. viridochromogenes* et *S. wedmorensis* (Hendlin *et al.*, 1969). La fosfomycine possède un large spectre d'activité, c'est-à-dire qu'elle agit, à la fois, sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cet

antibiotique bactéricide est hautement polaire et optiquement actif (Hendlin *et al.*, 1969). Il pénètre dans la bactérie par le système de transport actif de l' α -glycerophosphate et du glucose-6-phosphate (El Zoeiby *et al.*, 2003). La structure de la fosfomycine a été déterminée par Christensen et collaborateurs (Christensen *et al.*, 1969). Le groupement chimique réactif de l'antibiotique est l'époxyde, l'hétérocycle oxygéné à trois chaînons (voir figure 12) (Walsh, 2003).

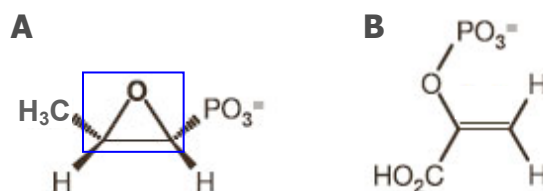


Figure 12. Structure de la fosfomycine (A) et du phosphoénolpyruvate (B). Le groupement époxyde de la fosfomycine est encadré en bleu sur la figure.

Source : Adaptée de (Higgins *et al.*, 2005)

4.1.2 Site et mécanisme d'action

La fosfomycine bloque la biosynthèse du PG en inhibant MurA, l'UDP-GlcNac-enolpyruvyl transférase, de façon irréversible (voir figure 13) (El Zoeiby *et al.*, 2003).

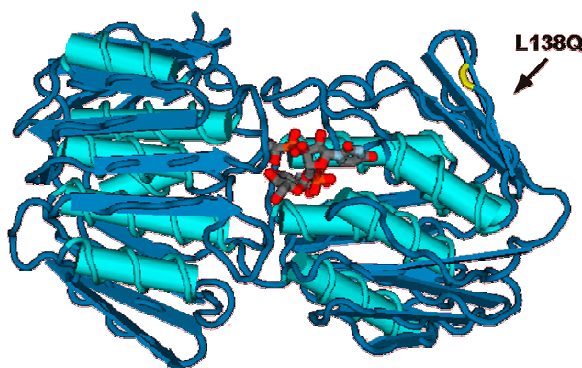


Figure 13. Structure de MurA (en bleu) complexée à la fosfomycine (en rouge). En jaune, résidu de surface altéré. Remplacement de la lysine 138 par un résidu glutamine (Pour plus d'informations voir la Partie 5, section 5.2.2).

Source : (Bernhardt *et al.*, 2001) Données supplémentaires : <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/292/5525/2326/DC1>

Le mécanisme d'action de cet antibiotique a beaucoup été étudié. L'inhibition de MurA par la fosfomycine est compétitive pour le GlcNAc et dépendante du temps (Marquardt *et al.*, 1994). Dans un premier temps, le GlcNAc doit se lier à MurA pour permettre par la suite la liaison de la fosfomycine et l'inhibition de l'enzyme. L'antibiotique joue le rôle d'un analogue de PEP (voir figure 12) et forme un lien covalent avec le résidu actif cystéine en position 115 de MurA (voir figure 14) (El Zoeiby *et al.*, 2003).

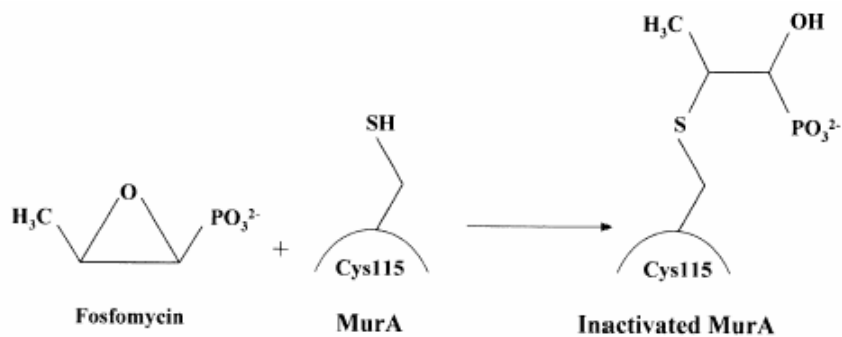


Figure 14. Représentation de l'inactivation de MurA par la fosfomycine.

Source : (El Zoeiby *et al.*, 2003)

Il existe une grande fréquence de résistance à la fosfomycine dans le monde bactérien, d'où l'importance d'administrer cet antibiotique en combinaison avec d'autres antibiotiques. La résistance est souvent due à une diminution de l'entrée de la drogue via des mutations dans les systèmes de transport utilisés par l'antibiotique (El Zoeiby *et al.*, 2003). Cependant, la résistance peut aussi être due à l'inactivation de la drogue par trois différentes enzymes : une glutathione transférase, une L-cystéine thiol transférase ou une hydrolase (voir figure 15) (Rigsby *et al.*, 2005).

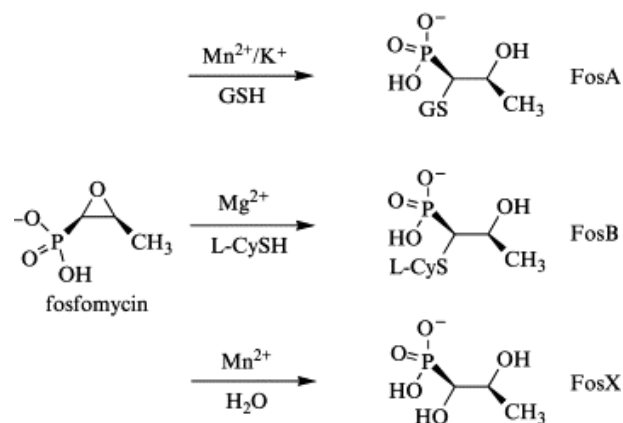


Figure 15. Réactions catalysées par une glutathione transférase (GSH), une L-cystéine thiol transférase (L-CySH) et une hydrolase (H₂O) menant à la l'inactivation de la fosfomicine.

Source : (Rigsby *et al.*, 2005)

4.2 Tunicamycine, Muréidomycines et Liposidomycines

4.2.1 Caractéristiques

La tunicamycine, les muréidomycines et les liposidomycines sont des antibiotiques naturels produits par plusieurs espèces de *Streptomyces* (Brandish *et al.*, 1996; Brandish *et al.*, 1996; Tsvetanova et Price, 2001; Tsvetanova *et al.*, 2002). En plus d'être un antimicrobien du même genre que les muréidomycines et les liposidomycines, la tunicamycine est toxique pour les cellules eucaryotes puisqu'elle peut entraîner l'apoptose (Fujita *et al.*, 2002). De plus, la tunicamycine bloque la N-glycosylation des protéines (Tsvetanova *et al.*, 2002). Les muréidomycines et les liposidomycines ne sont pas toxiques pour les organismes eucaryotiques. Les structures de ces trois antibiotiques ont été élucidées (voir figure 16) (Brandish *et al.*, 1996). La structure de la tunicamycine a été rapportée par Takatsuki et collaborateurs en 1977 (Heifetz *et al.*, 1979).

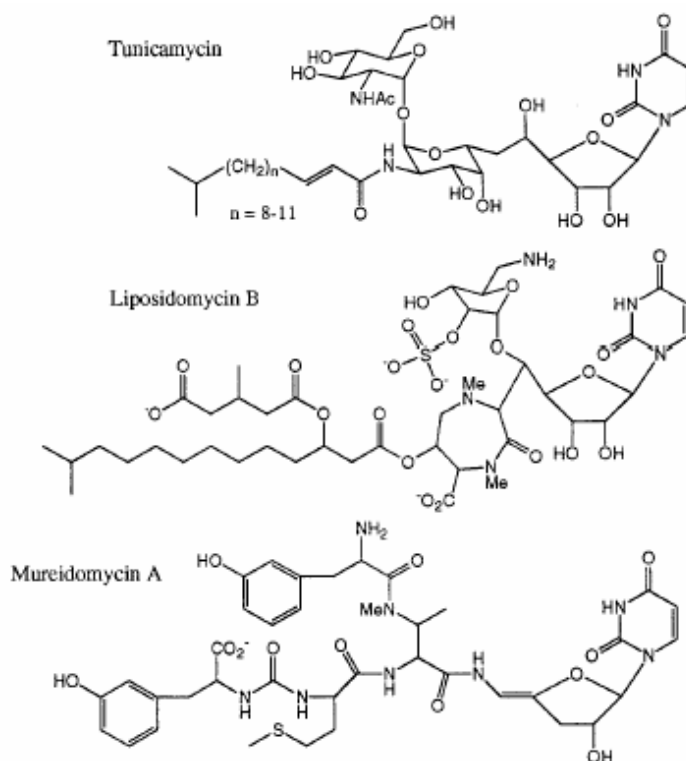


Figure 16. Structure de la tunicamycine, de la liposidomycine B et de la muréidomycine A.
Source : (Heifetz *et al.*, 1979)

La tunicamycine possède une structure inhabituelle composée d'uracile, de GlcNAc, d'un sucre unique dialdose appelé tunicamine et d'un acide gras lié par un groupement amide (Tsvetanova et Price, 2001). Le sentier de biosynthèse de la tunicamycine proposé par Tsvetanova et collaborateurs en 2002 est illustré à la figure 17 (Tsvetanova *et al.*, 2002).

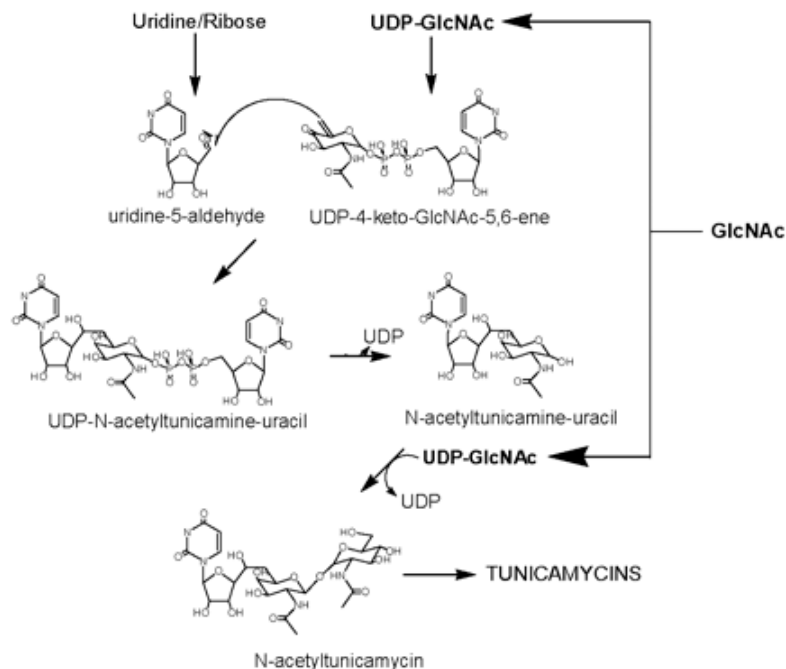


Figure 17. Modèle de biosynthèse de la tunicamycine proposé par Tsvetanova et collaborateurs.

Source : (Tsvetanova *et al.*, 2002)

4.2.2 Site et mécanisme d'action

L'un des sites d'action de ces antibiotiques est la biosynthèse du PG. En fait, ils ciblent la translocase I bactérienne, *MraY*. Cependant, la tunicamycine peut inhiber des enzymes mammaliennes qui catalysent la formation de liens lipidiques entre les sucres (Inukai *et al.*, 1993). L'inhibition de *MraY* par la tunicamycine est compétitive seulement pour le MurNAc-pentapeptide et semble réversible. La muréidomycine A et la liposidomycine B sont des inhibiteurs sélectifs qui se lient lentement à *MraY* (Brandish *et al.*, 1996). L'inhibition de *MraY* par la muréidomycine A est compétitive pour les deux substrats, le MurNAc-pentapeptide et l'undécaprénol-P, et est dépendante du temps (Brandish *et al.*, 1996). Cependant, la liposidomycine B est un inhibiteur non compétitif (Brandish *et al.*, 1996).

Un cas de résistance à la tunicamycine a été observé chez *Bacillus subtilis*. La protéine membranaire liant l'ATP, *TmrB*, serait la cause de cette résistance. En fait, il est possible

qu'une des fonctions de TmrB soit de diminuer la concentration intracellulaire de tunicamycine, comme le ferait une pompe à efflux (Noda *et al.*, 1992).

4.3 Bacitracine

4.3.1 Caractéristiques

La bacitracine a été découverte par Johnson et collaborateurs en 1943 (Meleney et Johnson, 1949). Elle a été isolée de tissus contaminés prélevés d'une fracture du tibia. Cet antibiotique est produit par certaines espèces de *Bacillus*. La bacitracine est neutre, soluble dans l'eau et non toxique pour les cellules eucaryotes (Johnson, 1945). On peut voir la structure générale de la bacitracine à la figure 18.

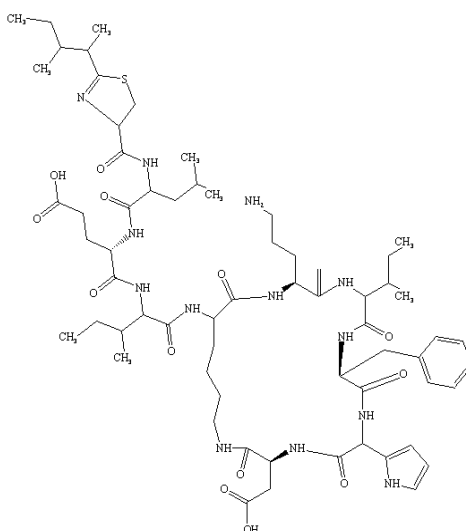


Figure 18. Structure de la bacitracine.

Source : <http://www.chemicalforums.com/index.php?page=molecules#Bacitracin>

Elle agit principalement contre les bactéries à Gram positif telles que les *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium difficile* et certaines Archaeobactéries telles que *Methanobacterium*, *Methanococcus* et *Halococcus* (Ming et Epperson, 2002; Ming, 2003). La bacitracine a été utilisée pour traiter plusieurs types d'infections : les infections

ophtalmiques, systémiques, neurologiques, gastro-intestinales, mais aussi les pneumonies. Tous les traitements donnaient de très bons résultats (Meleney et Johnson, 1949; Ming et Epperson, 2002). La bacitracine est l'un des trois antibiotiques retrouvés dans les onguents topiques Polysporin[®] et Neosporin[®]. Les deux autres étant la néomycine et la polymyxine B (Ming et Epperson, 2002). La bacitracine est un antibiotique polypeptide cyclique (Tsuda *et al.*, 2002). Elle est produite sous forme d'un mélange de plusieurs peptides qui sont tous des produits non ribosomaux. Les composants majeurs du mélange sont les bacitracines A₁ et B₁ (Ming et Epperson, 2002). De plus, la bacitracine nécessite un ion métallique divalent, tel que le zinc, pour exercer son activité biologique. La bacitracine possède cependant une certaine affinité pour le cuivre, le nickel, le cobalt, le zinc et le manganèse (Ming et Epperson, 2002). À cause de cette caractéristique, la bacitracine est aussi appelé « métalloantibiotique » (Ming, 2003).

4.3.2 Site et mécanisme d'action

La bacitracine bloque la biosynthèse de la paroi bactérienne en séquestrant l'accepteur membranaire undécaprényl-pyrophosphate. Elle empêche ainsi la réaction de déphosphorylation de l'undécaprényl-pyrophosphate afin qu'il soit réutilisé dans la voie de biosynthèse du PG. Il y a donc moins d'undécaprényl-P disponible pour se lier au MurNAc-pentapeptide et poursuivre la biosynthèse (voir figure 19) (Ming et Epperson, 2002).

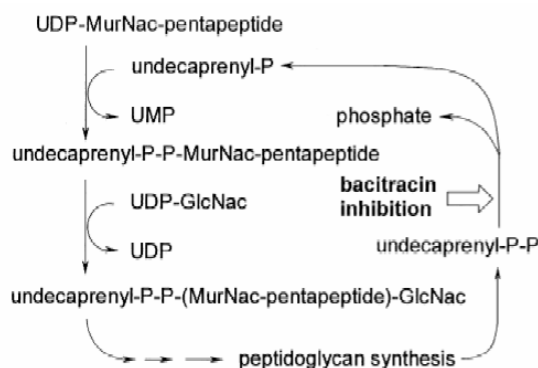


Figure 19. Biosynthèse du PG et site d'action de la bacitracine.

Source : (Ming et Epperson, 2002)

Malgré la grande utilisation qu'on a faite de la bacitracine, très peu de bactéries résistantes sont apparues (Ming et Epperson, 2002). En fait, l'émergence de résistance contre les peptides antibiotiques est en général beaucoup plus faible que celle contre les antibiotiques conventionnels (Zasloff, 2002). Cependant, dans le cas de la bacitracine, quelques cas de résistance ont été caractérisés. Par exemple chez *Escherichia coli*, le gène *bacA* produit une protéine ayant une activité phosphatase sur l'undécaprénol-pyrophosphate. Donc, il y a modification de la cible de l'antibiotique et la bactérie devient résistante (Tsuda *et al.*, 2002; El Ghachi *et al.*, 2004). Les bactéries comportant des mutations qui bloquent la synthèse des exopolysaccharides sont aussi reconnues comme résistantes à la bacitracine. La synthèse de ces polymères est non essentielle et requiert aussi le transporteur undécaprénol-P. Les mutations bloquant la formation de ces polymères permettent une plus grande disponibilité de transporteur pour la biosynthèse du PG (El Ghachi *et al.*, 2004). Finalement, les bactéries productrices de bacitracine doivent évidemment être résistantes. Elles emploient donc des pompes à efflux de type ABC pour faire sortir l'antibiotique (Ohki *et al.*, 2003).

4.4 Ramoplanine

4.4.1 Caractéristiques

La ramoplanine a été isolée en 1984 (Cavalleri *et al.*, 1984) et sa structure a été élucidée en 1989 (voir figure 20) (Boger, 2001). La ramoplanine est un peptide cyclique composé de 17 acides aminés et d'une unité dimannose. Sa synthèse est non ribosomale et sa charge nette est positive (Breukink et de Kruijff, 2006).

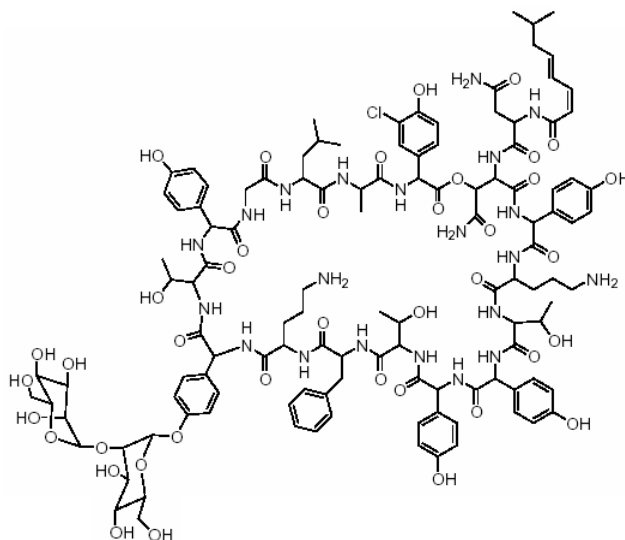


Figure 20. Structure générale de la ramoplanine.

Source : Adaptée de (Lazar et Walker, 2002)

Cet antibiotique bactéricide est actif contre les bactéries à Gram positif incluant les *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* résistants à la méthicilline. La ramoplanine est un antibiotique lipoglycopeptidique produit par une souche d'*Actinoplanes* (Somner et Reynolds, 1990). Bien que son mode d'entrée dans la bactérie est encore inconnu, on sait où cet antibiotique agit.

4.4.2 Site et mécanisme d'action

La ramoplanine inhibe la biosynthèse du PG au niveau de l'étape lipidique. En fait, l'antibiotique est capable d'inhiber la transférase MurG en s'y liant directement. De plus chez *E. coli*, l'antibiotique peut se lier au lipide II et empêcher l'étape de transglycosylation effectuée par la PLP1b (Walker *et al.*, 2005). Des essais de liaison avec de courtes chaînes variantes du lipide II ont démontré que la ramoplanine lie n'importe laquelle des chaînes du lipide II qui contiennent un groupement pyrophosphate. Le pyrophosphate du lipide II occupe donc un rôle central au niveau de la liaison avec l'antibiotique (Breukink et de Kruijff, 2006).

4.5 Vancomycine

4.5.1 Caractéristiques

La vancomycine est produite par les *Streptomyces* et les *Actinoplanes* et a été isolé la première fois au cours des années 1950. Sa structure a été décrite 25 à 30 ans plus tard (voir figure 21) (Boger, 2001). La vancomycine fait partie de la famille des glycopeptides (Walsh, 2003).

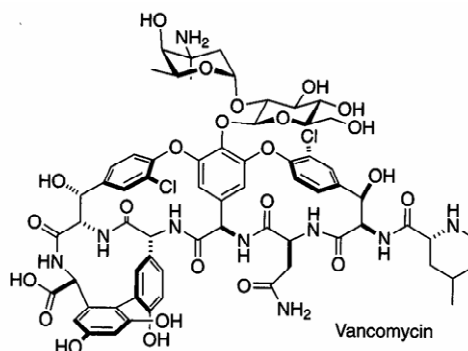


Figure 21. Structure de la vancomycine.

Source : Adaptée de (Walsh, 2003)

Deux antibiotiques de la famille des glycopeptides ont été approuvés pour l'utilisation clinique chez l'homme, soient la vancomycine et la téicoplanine (Walsh, 2003). En fait, la vancomycine a été introduite en 1958 (Allen et Nicas, 2003). Cet antibiotique cible seulement les bactéries à Gram positif telles que les *Staphylococcus*, *Streptococcus* et les *Enterococcus*. Elle ne peut pas pénétrer par les pores de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Walsh, 2003). Elle est surtout utilisée pour traiter les patients allergiques aux antibiotiques de la famille des β -lactames (Boger, 2001).

4.5.2 Site et mécanisme d'action

La vancomycine cible elle aussi la paroi de PG. En fait, elle bloque la transpeptidation en se complexant aux extrémités peptidiques du PG nouvellement formé qui se terminent par D-Ala-D-Ala. La vancomycine forme cinq liens hydrogènes avec ces résidus (voir figure 22) (Walsh, 2003).

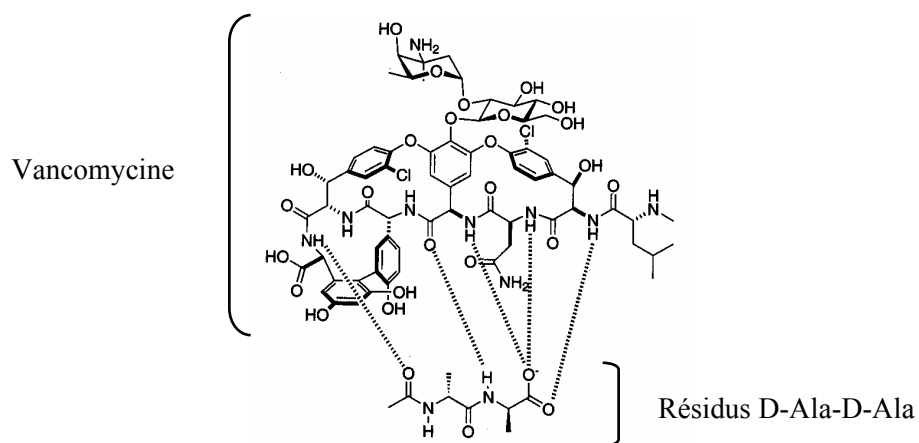


Figure 22. Séquestration de l'extrémité terminale du PG contenant les résidus D-Ala-D-Ala par la vancomycine.

Source : (Walsh, 2003)

La résistance à la vancomycine est apparue la première fois environ 30 ans après son introduction clinique. Ce grand délai est dû à l'utilisation limitée qu'on avait faite de cet antibiotique dans les 25 premières années suivant sa découverte. La modification de la cible de l'antibiotique est le mécanisme de résistance utilisé par les bactéries. Le premier phénotype d'entérocoques résistant à la vancomycine a été nommé VanA (Allen et Nicas, 2003). Pour pouvoir observer ce phénotype, la bactérie doit porter un plasmide qui contient cinq gènes importants. Trois de ces gènes codent pour des enzymes impliquées dans la reprogrammation de l'enzyme responsable de la formation de l'extrémité D-Ala-D-Ala du PG pour qu'elle forme une extrémité D-Ala-D-lactate. Les deux autres gènes produisent des protéines régulatrices. La modification du D-Ala-D-Ala entraîne une diminution d'affinité de 1000 fois avec la vancomycine. Ce mécanisme est utilisé notamment par les bactéries productrices de vancomycine (Walsh, 2003).

4.6 Pénicillines et Céphalosporines

4.6.1 Caractéristiques

Les pénicillines et céphalosporines ont été découvertes en 1928 et 1948, respectivement. Elles font partie de la famille des β -lactames. Ce sont des métabolites secondaires de mycètes. La pénicilline est produite par *Penicillium chrysogenum* et la céphalosporine, par *Acremonium chrysogenum* (Walsh, 2003; Bentley, 2005). En 1945, le prix Nobel de physiologie et médecine a été décerné à Chain, Fleming et Florey pour la découverte de la pénicilline et son effet curatif envers plusieurs maladies infectieuses (Bentley, 2005). Différentes générations de pénicillines et céphalosporines ont été obtenues en modifiant leurs chaînes latérales (voir figure 23) (Walsh, 2003).

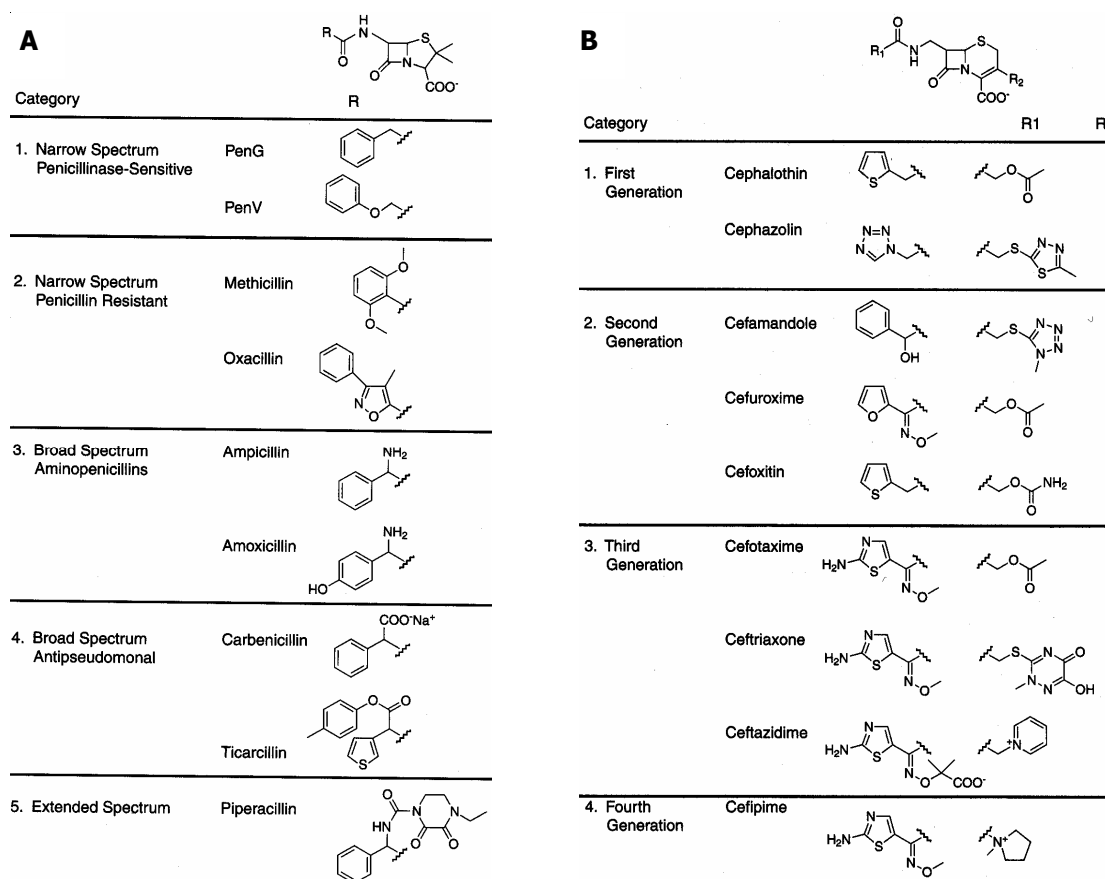


Figure 23. Différentes générations de (A) pénicillines et (B) céphalosporines selon les différentes chaînes latérales.

Source : (Walsh, 2003)

Les pénicillines possèdent un spectre étroit d'activité, elles ciblent uniquement les bactéries à Gram positif. De plus, elles peuvent engendrer des réactions allergiques. Les céphalosporines ont un spectre plus élargi, en plus de cibler les bactéries à Gram positif, elles ciblent aussi les bactéries à Gram négatif. Comme les pénicillines, elles peuvent engendrer des allergies. De plus, des thrombophlébites et des lésions rénales peuvent aussi être engendrées par les céphalosporines. Ces deux types d'antibiotiques β -lactame ont un effet bactéricide (Prescott, 1995).

Les céphalosporines font partie des antibiotiques qui ont été les plus prescrits étant donné leur large spectre. De plus, ces antibiotiques étaient souvent prescrits aux gens aux prises avec des allergies à la pénicilline. Malheureusement, la surutilisation a engendré l'émergence de résistance bactérienne aux β -lactames et a permis à d'autres pathogènes de prendre le dessus. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (Walsh, 2003).

4.6.2 Site et mécanisme d'action

Le noyau β -lactame de ces antibiotiques est le groupement actif. Les antibiotiques β -lactame agissent de façon générale en inhibant la biosynthèse du PG via les transpeptidases. En fait, les transpeptidases, ou PLPs, lient l'antibiotique au lieu de lier leurs substrats. De plus, ces intermédiaires nouvellement formés ont une très longue durée de vie. Il s'ensuit donc un affaiblissement du PG et une lyse osmotique qui mène à la mort bactérienne (Walsh, 2003). D'autre part, les antibiotiques de cette famille peuvent activer des enzymes responsables de la dégradation naturelle du PG, les autolysines (Prescott, 1995). Les résistances aux β -lactames sont causées par modification de l'antibiotique. Effectivement, les antibiotiques sont modifiés par les β -lactamases (voir figure 24) (Walsh, 2003).

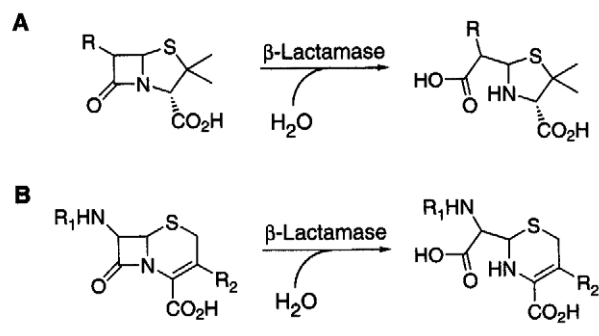


Figure 24. Hydrolyse des noyaux β -lactames des (A) p \acute{e} nicillines et des (B) c \acute{e} phalosporines par les β -lactamases.

Source : Adapt \acute{e} e de (Walsh, 2003)

Les β -lactamases hydrolysent le noyau β -lactame et d \acute{e} truisent ainsi l'activit \acute{e} antibact \acute{e} rienne de l'antibiotique. Jusqu' \grave{a} maintenant, plus de 190 β -lactamases ont \acute{e} t \acute{e} d \acute{e} crises (Walsh, 2003). Ces enzymes sont divis \acute{e} es en quatre classes : A, B, C et D. La classe B comprend les enzymes qui n \acute{e} cessitent un ou deux atomes de zinc pour leur activit \acute{e} . Les enzymes des classes A, C et D sont des s \acute{e} riques hydrolases. Les enzymes de classe C sont actives principalement contre les c \acute{e} phalosporines (Lim *et al.*, 2001).

Finalement, vu le caract \acute{e} re essentiel de la paroi bact \acute{e} rienne, il n'est pas \acute{e} tonnant de constater que plusieurs antibiotiques s'y attaquent. Il est donc logique de penser que certains bact \acute{e} riophages ciblent eux aussi cette paroi pour r \acute{e} ussir \grave{a} sortir de la bact \acute{e} rie apr \acute{e} s s'y \hat{e} tre multiplier. Pour ce faire, les bact \acute{e} riophages ont d \acute{e} velopp \acute{e} deux principales strat \acute{e} gies.

Partie 5 Mécanismes de lyse des bactériophages

Les bactériophages (phages) ont été indépendamment découverts vers les années 1920 par Twort et d'Hérelle. Depuis la fin du 20^e siècle, plus de 5000 bactériophages ont été rapportés. Ils sont classés dans 14 familles différentes selon leur morphologie, leur type d'acide nucléique et la présence ou non d'enveloppe ou de lipide (voir tableau 2)(Arnold *et al.*, 2000; Matsuzaki *et al.*, 2005).

Tableau 2. Classification des bactériophages.

Source : Adaptée de (Matsuzaki *et al.*, 2005) et (Arnold *et al.*, 2000).

Order	Family	Morphology	Nucleic acid
Caudovirales	Myoviridae		
	Siphoviridae		
	Podoviridae		
	Tectiviridae ^a		
	Corticoviridae ^a		
	Lipothrixviridae ^b		
	Plasmaviridae ^b		
	Rudiviridae		
	Fuselloviridae		
	Guttaviridae		
	Inoviridae		
	Microviridae		
	Leviviridae		
	Cytoviridae ^b		
		Double-stranded DNA	
		Single-stranded DNA	
		Single-stranded RNA	
		Segmented, double-stranded RNA	

^aLipid containing

^bEnveloped

Le cycle lytique du phage débute par son adsorption au récepteur bactérien (voir figure 25). Ensuite, il y a pénétration du génome viral dans la bactérie. Le génome est répliqué et le phage est reproduit en plusieurs copies. Finalement, le phage doit franchir la barrière physique que représentent les membranes et la paroi de la bactérie pour permettre aux nouveaux virions de sortir et d'infecter d'autres bactéries (Weinbauer, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2005).

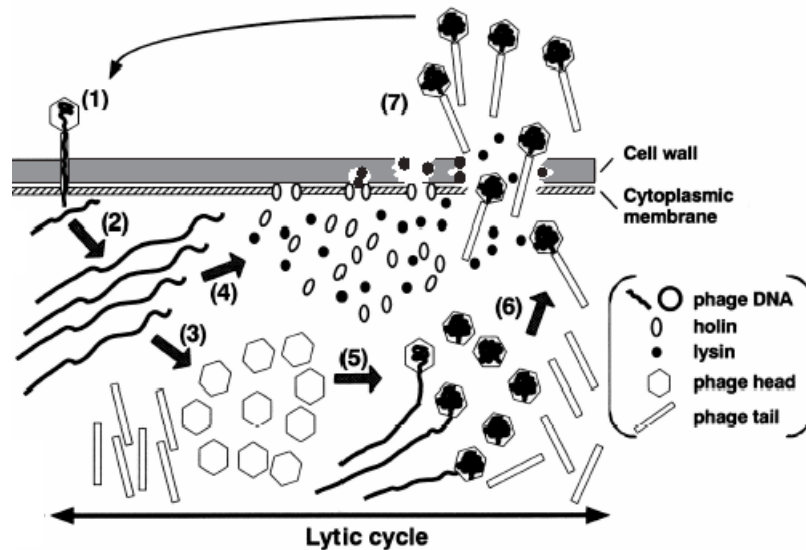


Figure 25. Représentation schématique du cycle de vie d'un bactériophage à ADN. (1) Adsorption et pénétration de l'ADN; (2) Réplication de l'ADN; (3) Production des capsides et des queues du phage; (4) Synthèse de la holine et de l'endolysine; (5) Empaquetage de l'ADN; (6) Assemblage des virions; (7) Lyse de la bactérie et relâche des virions.

Source : Adaptée de (Matsuzaki *et al.*, 2005)

Pour outrepasser les barrières physiques de la bactérie, les phages ont développé au cours de l'évolution deux principales stratégies : le système holine-endolysine et les protéines inhibitrices de la biosynthèse du PG (Bernhardt *et al.*, 2000).

5.1 Système holine-endolysine

Le système holine-endolysine est utilisé par les phages à ADN double brin comme le phage λ . Ces phages produisent une enzyme muralytique soluble, l'endolysine. Cette enzyme hydrolyse les liaisons retrouvées entre les principaux constituants du PG. Les endolysines sont des protéines très diversifiées. Quatre types d'activité muralytique sont associées aux différentes endolysines : glucosaminidase, muraminidase, endopeptidase ou amidase. Ces quatre activités sont dirigées contre les trois principaux liens covalents retrouvés dans le PG

(Young *et al.*, 2000). Les deux premiers types d'activité permettent le clivage au niveau des sucres. Les endopeptidases clivent au niveau des peptides, tandis que les amidases permettent l'hydrolyse du lien amide entre les unités de glycans et les groupements peptidiques (voir figure 26) (Matsuzaki *et al.*, 2005).

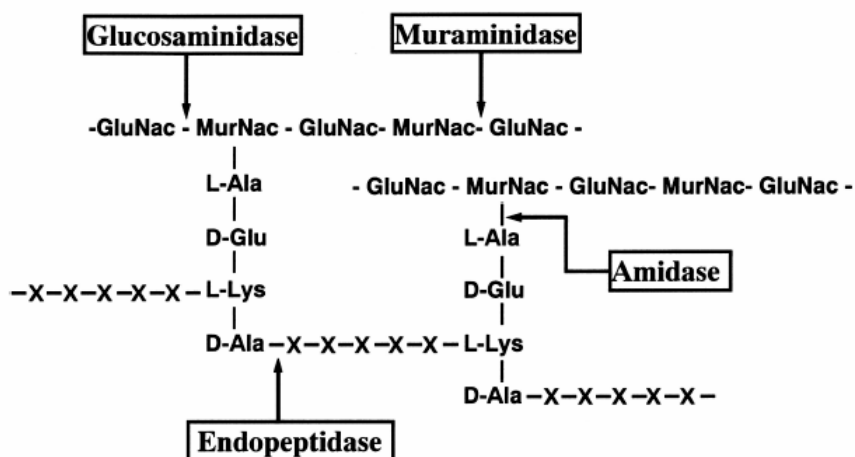


Figure 26. Résumé des principaux sites de clivage des endolysines au niveau du PG des bactéries à Gram positif.

Source : (Matsuzaki *et al.*, 2005)

Les endolysines possèdent deux principaux domaines : un domaine catalytique à l'extrémité N-terminal et un domaine de liaison en C-terminal (voir figure 27) (Fischetti, 2005). Jusqu'à deux différents domaines catalytiques peuvent être reliés à un seul domaine de liaison (Navarre *et al.*, 1999).



Figure 27. Structure de base des endolysines phagiques. L'endolysine peut contenir jusqu'à deux domaines catalytiques en N-terminal (jaune et bleu) reliés à un domaine de liaison en C-terminal (rose).

Source : (Fischetti, 2005)

Une fois le domaine C-terminal lié à un substrat spécifique retrouvé dans le PG de la bactérie hôte, le domaine catalytique exerce sa fonction en clivant le PG. La comparaison des séquences d'endolysines de mêmes familles démontre une grande similarité de séquence pour le domaine catalytique et une faible similarité pour le domaine de liaison (Fischetti, 2005). Seulement quelques endolysines possèdent une séquence signal qui leur permet d'atteindre le périplasma. Pour la majorité des endolysines, la membrane cytoplasmique est un obstacle. Le phage produit donc une petite protéine membranaire, la holine. Au cours du développement du phage dans la bactérie, l'endolysine s'accumule dans le cytoplasme et la holine au niveau de la membrane cytoplasmique, aussi appelée membrane interne. Par la suite, les molécules de holine s'assemblent de façon à former un pore. De cette façon, la membrane devient perméable et les molécules d'endolysine peuvent atteindre le PG et le dégrader (voir figure 28) (Young *et al.*, 2000; Matsuzaki *et al.*, 2005).

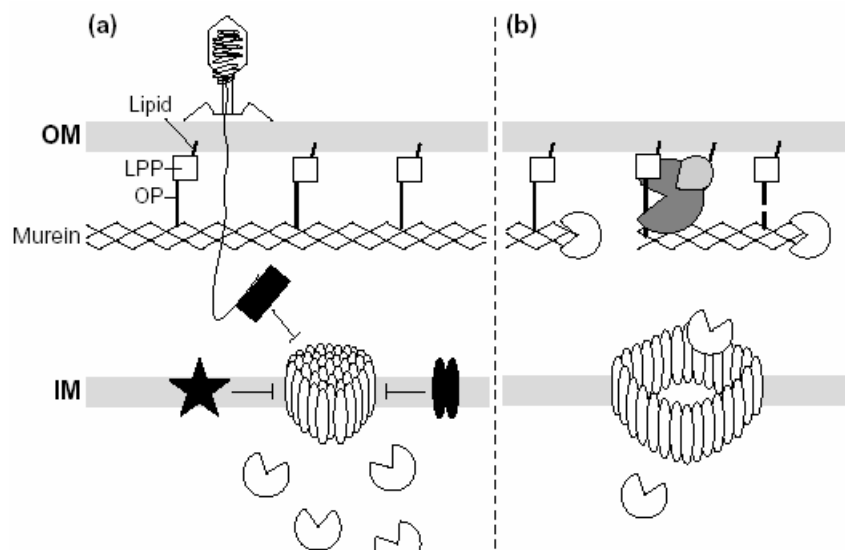


Figure 28. Système holine-endolysine. (A) Accumulation de l'endolysine dans le cytoplasme et de la holine dans la membrane interne (IM). OM : membrane externe; Murein : PG; LPP : lipoprotéine et OP : oligopeptide. (B) Formation d'un pore par la holine dans la IM et passage de l'endolysine du cytoplasme au périplasma pour dégrader le peptidoglycane.

Source : (Young *et al.*, 2000)

L'action de la holine est programmée dans le temps par une autre protéine, l'antiholine. Cette protéine bloque l'activité de la holine jusqu'au moment opportun. Les holines

constituent une classe de protéines très diversifiée (Young *et al.*, 2000; Wang, 2006). Elles sont codées par des gènes faisant partie d'au moins 35 familles différentes. De plus, aucune origine commune n'a pu être identifiée pour ces familles de gènes (Grundling *et al.*, 2001). La plupart des séquences de holines sont courtes et de nature hydrophobe avec un domaine C-terminal hautement hydrophile. Elles possèdent de deux à trois domaines transmembranaires (Young *et al.*, 2000).

5.2 Protéines inhibitrices de la biosynthèse du peptidoglycane

L'autre stratégie utilisée par les phages est la lyse induite par l'inhibition de la biosynthèse du PG à l'aide de petites protéines de lyse. Cette stratégie est utilisée par les petits phages à ADN et ARN simple brin (ADN_{ss} et ARN_{ss}). Ces phages possèdent un gène de lyse unique compris dans un cadre de lecture alternatif d'un autre gène. Les phages à ADN_{ss} sont représentés par un membre de la famille des *Microviridae*, le coliphage ΦX174 (Young *et al.*, 2000). Le gène de lyse de ce phage est entièrement inclus dans le gène essentiel *D* codant pour une protéine structurale (Roof et Young, 1995). Un des représentants des phages à ARN_{ss} est le coliphage Qβ, membre de la famille des *Leviviridae* (Bernhardt *et al.*, 2001). Le gène de lyse de Qβ est inclus dans un cadre alternatif du gène *A*₂ codant pour une protéine de maturation (Nishihara, 2002).

5.2.1 ΦX174

Le microvirus ΦX174 infecte préférentiellement *E. coli*. Il possède une forme icosaédrique et mesure de 25 à 27 nm de diamètre (voir figure 29). Son génome circulaire d'ADN_{ss} de 5386 nucléotides (nt) fut le premier génome séquencé en entier par Sanger et collaborateurs en 1978 (Sanger *et al.*, 1978). Le génome de ΦX174 contient le gène *E* dont le produit ne possède aucune activité hydrolase bien qu'il entraîne la lyse bactérienne. Le produit du gène *E*, la protéine E, est hydrophobe et composé de 91 acides aminés (Witte *et al.*, 1997; Bernhardt *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000). Cette protéine comporte deux domaines : un domaine hydrophobe en N-terminal et un domaine chargé positivement en C-terminal

(Young *et al.*, 2000). La protéine se retrouve au niveau de la membrane interne de la bactérie (Bernhardt *et al.*, 2002).

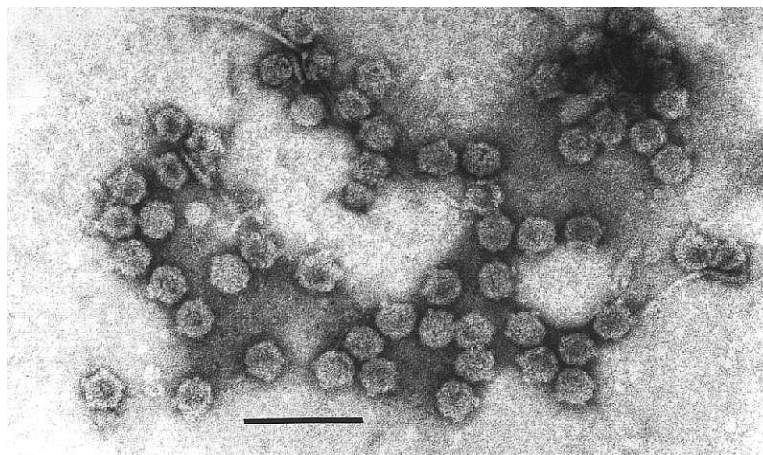


Figure 29. Micrographie électronique du *Microviridae* ΦX174. La barre représente 100 nm.

Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.042.0.01.001.htm> (Hans-Wolfgang Ackermann, Université Laval, Québec)

Le mécanisme de lyse de la protéine E a longtemps été controversé, plusieurs modèles ont été proposés. Cependant, Bernhardt et collaborateurs ont démontré, à l'aide de la génétique, que la protéine E inhibe la translocase *MraY* impliquée dans l'étape de formation du précurseur lipidique (lipide I) de la biosynthèse du PG (Bernhardt *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2001). Le mode d'inhibition n'est toujours pas caractérisé. Cependant, la protéine *SlyD* semble être un joueur important pour l'activité de la protéine E chez *E. coli*. *SlyD* est une protéine cytoplasmique abondante qui est composée de 196 acides aminés. Cette protéine est une peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase) de type FKBP. *In vitro*, les PPIases sont des enzymes qui catalysent l'isomérisation cis-trans de la liaison entre un acide aminé X et un résidu proline (Pro). La protéine E contient 5 résidus proline, dont un résidu essentiel à la lyse, le résidu Pro21 (Witte *et al.*, 1997). Il serait donc possible que *SlyD* soit nécessaire à l'isomérisation d'un ou plusieurs de ces résidus pour que la protéine E adopte la conformation requise pour engendrer une lyse bactérienne. Il est possible aussi que *SlyD* soit impliquée dans l'insertion de la protéine E dans la membrane interne ou dans son

interaction avec sa cible, MraY (voir figure 30) (Bernhardt *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2002).

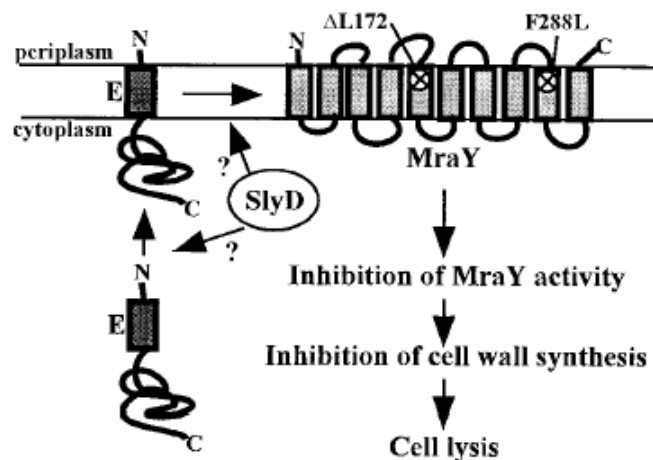


Figure 30. Modèle proposé pour le mécanisme de lyse cellulaire de la protéine E.

Source : (Bernhardt *et al.*, 2000)

5.2.2 Q β

Parmi les quatre groupes de coliphages à ARN, Q β est l'allolévivirus le plus étudié du groupe III de la famille des *Leviviridae*. Ce phage icosaédrique mesure 24 à 27 nm de diamètre et infecte *E. coli* (Karnik et Billeter, 1983; Klovins *et al.*, 2002; Nishihara *et al.*, 2004). Sa structure a été cristallographiée en 1996 par Golmohammadi et collaborateurs (voir figure 31) (Golmohammadi *et al.*, 1996).

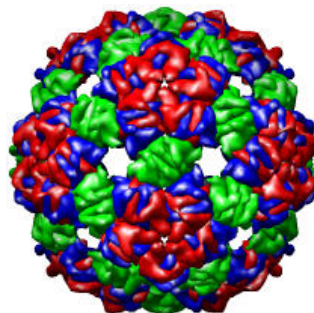


Figure 31. Structure tridimensionnelle de la capside icosaédrique du coliphage Q β .

Source : http://viperd.b.scripps.edu/info_page.php?VDB=1qbe

Son génome d'ARN_{ss} contient 4217 nucléotides et code pour quatre protéines : la protéine de maturation A₂, la protéine de capsid, la protéine A1 et la réplicase. La protéine de capsid est la protéine structurale majeure du virion tandis que A1 est un composant mineur. La réplicase est une ARN polymérase dépendante de l'ARN. Finalement, A₂ ou protéine de maturation est présente à une seule copie par virion. Elle est requise pour l'adsorption au pilus sexuel de l'hôte, pour la protection de l'ARN viral contre les ribonucléases et est aussi responsable de la lyse cellulaire. En réalité, la protéine de lyse se retrouve dans un cadre de lecture alternatif de la protéine de maturation. La protéine de lyse A₂ de 420 acides aminés est insoluble lorsqu'elle est surproduite. Elle inhibe la biosynthèse du PG. À l'aide d'approches génétique et biochimique, Bernhardt et collaborateurs ont pu caractériser davantage le mécanisme de lyse de la protéine A₂. Ils ont découvert que l'inhibition se situait au niveau de l'étape cytoplasmique de la biosynthèse du PG. L'obtention de bactéries résistantes au phage Q β leur a permis de déterminer la cible de A₂. Ces bactéries présentaient une mutation faux sens au niveau de l'enzyme MurA. L'analyse de séquence a révélé que la leucine 138 avait été remplacée pour un résidu glutamine (voir figure 13) (Bernhardt *et al.*, 2001). Cette mutation affecte probablement la liaison entre A₂ et MurA et empêche ainsi l'inhibition de MurA. Comme le PG était formé normalement, ces bactéries étaient résistantes au phage. En fait, elles ne permettaient pas la sortie des virions pour qu'ils puissent continuer à infecter d'autres bactéries pour assurer leur multiplication.

Pour l'instant, on ne connaît que deux phages inhibiteurs d'enzymes de la biosynthèse du PG. Cependant, il se pourrait très bien que d'autres petits phages à ADN_{ss} et à ARN_{ss} agissent de la même façon que Φ X174 et Q β .

Partie 6 Mise en situation du projet de recherche

6.1 Problématique

De nos jours, certains des problèmes majeurs reliés à la santé sont la recrudescence des maladies infectieuses et la résistance bactérienne aux antibiotiques engendrée par une mauvaise et une surutilisation de ces derniers. Afin de résoudre ces problèmes de santé publique, il est nécessaire de développer des antimicrobiens innovateurs. Une des voies à explorer est celle des protéines antibiotiques de phages. Cependant, le manque de connaissances à ce niveau représente un obstacle qu'il faudra surmonter.

6.2 Hypothèse et objectifs

Les phages représentent une source évoluée d'enzymes mortelles pour les bactéries. Ces enzymes lytiques semblent être des outils antimicrobiens innovateurs et prometteurs puisqu'elles ciblent un élément essentiel à la survie bactérienne, la paroi de PG. Il a été démontré que certaines protéines phagiques inhibent des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG, notamment A₂ et E des phages Qβ et ΦX174, respectivement. De plus, on sait que la protéine provenant du premier cadre de lecture ouvert du phage AP205 engendre la lyse bactérienne (Klovins *et al.*, 2002). L'hypothèse de travail propose que cette protéine, nommée protéine P1, cible une des enzymes impliquées dans la biosynthèse du PG et est, par le fait même, un outil antimicrobien prometteur. Les objectifs à atteindre étaient la construction *in vitro* et le clonage moléculaire du gène *pl*, la surexpression de la protéine chez la bactérie, la détermination de la cible de la protéine P1 à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo* pour finalement effectuer la caractérisation biochimique du mécanisme d'inhibition de cette protéine au niveau de la biosynthèse du PG.

6.3 Résumé de la méthodologie

Tout d'abord, le gène *pl* a été synthétisé par assemblage PCR, cloné dans le vecteur d'expression pET24b pour permettre la surexpression de la protéine chez *E. coli* BL21

(λ DE3)pLysS et vérifier l'activité lytique. L'analyse de l'inhibition de la biosynthèse du PG *in vivo* a été effectuée à l'aide d'un essai d'incorporation de radioactivité dans le PG et dans ses intermédiaires en utilisant du [3 H]-DAP. L'essai se fait chez *E. coli* ET505 (λ DE3) contenant le gène *pl* dans le vecteur pACYCDuet-1 à l'aide de la technique de chromatographie sur couche mince. Cette première analyse a permis de déterminer quelle étape de la biosynthèse était bloquée par la protéine P1. Ensuite, les gènes *mraY* et *murG* de *P. aeruginosa* ont été cloné dans le vecteur d'expression pET30c. Ces deux nouvelles constructions ainsi que celle contenant les gènes *MurA* à *MurF* de *P. aeruginosa*, effectuées précédemment par un étudiant du laboratoire, ont été cotransformées avec celle contenant le gène *pl* dans *E. coli* HMS174 (λ DE3). Par un effet de dosage de gène, l'expression de la protéine de lyse et de la protéine de la biosynthèse du PG dans la même bactérie a permis de déterminer plus spécifiquement quelle(s) enzyme(s) était(ent) inhibée(s). Étant donné sa faible taille (35 acides aminés), la protéine P1 a été synthétisée par le Service de Synthèse de Peptides de l'Est du Québec. À partir des derniers résultats obtenus, des essais enzymatiques *in vitro* au spectrophotomètre ont été mis au point avec les cibles potentielles afin de mieux caractériser l'inhibition et de calculer des CI_{50} (Concentration Inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique). La méthodologie employée est résumée à la figure 32.

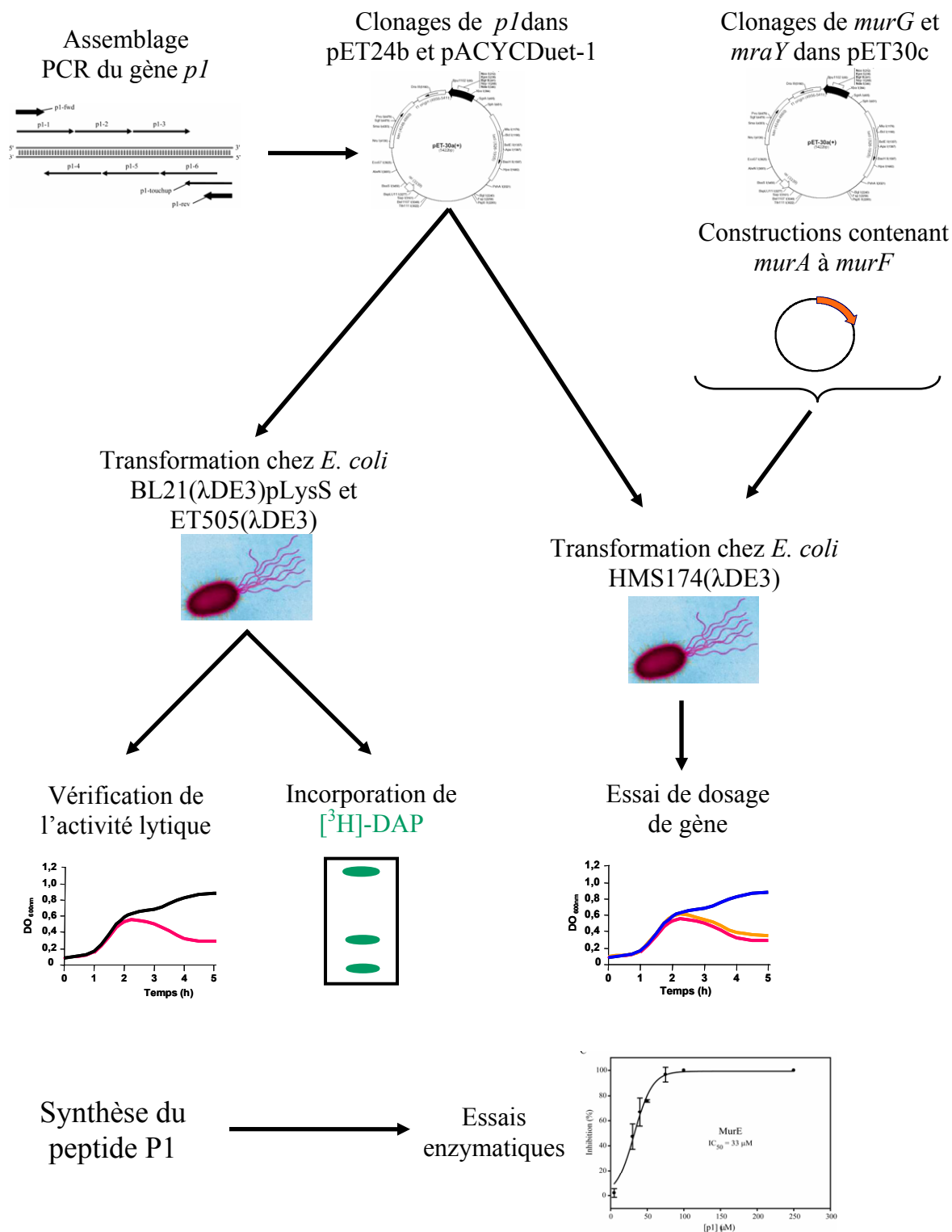


Figure 32. Résumé de la méthodologie utilisée.

Chapitre 2 RÉSULTATS

RÉSUMÉ

La protéine antibiotique P1 du phage AP205 est un inhibiteur de MurA, MurB et MurE dans la biosynthèse du peptidoglycane.

Les *Microviridae*, les *Leviviridae*, et les *Alloleviridae*, lesquels sont des phages lytiques avec de petits génomes d'acides nucléiques simple brin, ne possèdent qu'un gène requis pour la lyse et aucune activité muralytique. Nous reportons ici la caractérisation du mécanisme lytique de la protéine antibiotique P1 de 35 acides aminés de l'ORF1 du phage AP205 en utilisant des approches *in vitro* et *in vivo*. Le gène synthétique *pl* de 105 nucléotides encodant la protéine antibiotique du phage a été construit *in vitro* à l'aide d'un assemblage PCR utilisant des oligonucléotides chevauchants, et démontre une activité lytique chez *E. coli*. La surexpression de P1 à partir d'un plasmide à plusieurs copies inhibe l'incorporation d'acide [³H]-diaminopimélique dans la paroi cellulaire comme prévu lorsqu'il y a inhibition des enzymes MurA à MurE. La surexpression des cibles à partir de plasmides à haut nombre de copies dans les essais de dosage de gène a été faite avec les protéines P1, E du phage ΦX174 et A₂ de Qβ exprimées à partir de plasmides à nombre de copies intermédiaires et avec chacune des 8 enzymes connues impliquées dans la biosynthèse de la paroi. La protéine E inhibe *MraY*, A₂ inhibe *MurA*, *MurB* et *MurE*; alors que *MurA*, *MurB*, *MurE*, *MraY* et *MurG* sont inhibées par P1. Des essais enzymatiques avec *MurA*, *MurB* et *MurE* et l'inhibiteur P1 ont donné des valeurs de CI₅₀ de 30 μM, 210 μM et 33 μM, respectivement. P1 était un inhibiteur compétitif de *MurE* en regard du Mg²⁺ et serait en compétition pour la liaison au site de ce cofacteur. Ainsi, P1 est réellement un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi. L'inhibition résulte du blocage spécifique de *MurA*, *MurB*, *MurE*, en compétitionnant probablement avec la liaison de l'UDP-*N*-acetylglucosamine dans le site actif. La protéine P1 inhibe possiblement aussi *MraY* et *MurG*.

**The P1 Protein Antibiotic from Phage AP205 is an Inhibitor of MurA,
MurB and MurE Essential in Bacterial Cell wall Biosynthesis**

Running title: Phage AP205 P1 protein antibiotic

Carine Paquet-Bouchard¹, Adrian Lloyd², François Sanschagrin¹, Tom Clarke², Ann
Blewett², Timothy D.H. Bugg² and Roger C. Levesque^{1*}

*CREFSIP, Département de Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval,
Québec, Québec, Canada G1K 7P4¹ Department of Chemistry, University of Warwick,
Coventry CV4 7AL, United Kingdom²*

*Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie Moléculaire et
Génie des Protéines, Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Université Laval, Québec,
Québec, Canada, G1K 7P4. Tel: (418) 656-3070. Fax: (418) 656-7176. Email:
rclevesq@rsvs.ulaval.ca

ABSTRACT

The *Microviridae* and *Leviviridae* are lytic phages with small single-stranded nucleic acid genomes, have only a single gene required for lysis and do not produce a muralytic activity. We report here the characterization of the lytic mechanism of the 35 amino acid P1 protein antibiotic from ORF1 of phage AP205 using a combined *in vitro* and *in vivo* approach. The synthetic *p1* gene of 105 nucleotides encoding the phage AP205 protein antibiotic was constructed *in vitro* using overlapping oligonucleotides in a streamlined PCR gene assembly, and showed lytic activity in *E. coli*. Overexpression of P1 from a multicopy plasmid inhibited the incorporation of [³H]-diaminopimelic acid into cell wall consistent with MurA to MurE inhibition. Overexpression of selected targets on high copy number plasmids via gene dosage experiments and bacterial cell rescue were performed with P1, E from ΦX174 and A₂ from phage Qβ expressed on plasmids at intermediate copy numbers in tandem with each of the eight known enzymes implicated in cell wall biosynthesis. E inhibited MraY and A₂ inhibited MurA whereas P1 inhibited MurA, MurB, MurE, and also MraY and MurG. Enzymatic assays with MurA, MurB and MurE with the P1 inhibitor gave IC₅₀ values of 30 μM, 210 μM and 33 μM, respectively. P1 was a competitive inhibitor of MurE with respect to Mg²⁺ and the P1 antibiotic protein was found to compete for binding at this site. Thus, P1 is a bacterial cell wall inhibitor and this inhibition results from a block at MurA, MurB and MurE by competing with the binding of UDP-*N*-acetylglucosamine in the active site, and possibly MurG and MraY.

INTRODUCTION

To release their progeny, phages have to compromise the peptidoglycan of the bacterial host causing cell lysis. There are at least two different strategies to lyse bacteria. Double stranded DNA phages encode a holin-endolysin system. The holin permeabilizes the membrane and the endolysin, which has a muralytic activity, degrades the bacterial cell wall and the cell lyses because of higher internal osmotic pressure (Bernhardt, 2000 #7; Wang, 2006 #24; Young, 2000 #23). Phages with single stranded nucleic acid genomes have only a single gene required for lysis. To date, only three lysis proteins are known and have been partly characterized: the E protein from *Microvirus* ΦX174 (ssDNA, *Microviridae*), the L protein from *Levivirus* MS2 (ssRNA, *Leviviridae*) and the A₂ protein from *Allolevivirus* Qβ (ssRNA, *Leviviridae*) (Bernhardt, 2001 #8; Bernhardt, 2001 #6). In addition, E and A₂ are the only two proteins known to inhibit essential enzymes of bacterial cell wall biosynthesis.

Peptidoglycan biosynthesis is a two-stage pathway. The first stage occurs in the cytoplasm and leads to the formation of the monomeric building block *N*-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramyl pentapeptide. The first committed step is the transfer of an enolpyruvate residue from phosphoenolpyruvate (PEP) to position 3 of UDP-*N*-acetylglucosamine (GlcNAc); a reaction catalyzed by MurA. This is followed by a MurB-catalyzed reduction of the enolpyruvate moiety to D-lactate, yielding UDP-*N*-acetylmuramate (MurNAc). A series of ATP-dependent amino acid ligases MurC, MurD, MurE and MurF catalyze the stepwise addition of amino acids forming the pentapeptide side-chain on the newly reduced D-lactyl group, resulting in the formation of UDP-*N*-acetylmuramylpentapeptide (MurNAc-pentapeptide) (El Zoeiby, 2003 #25). The second stage is the transfer of the MurNAc-pentapeptide precursor across the membrane by a lipophilic carrier and its addition to the growing cell wall polymer by the enzymatic action of penicillin-binding proteins. The first step involves the transfer of the MurNAc-pentapeptide to a lipid carrier, undecaprenyl phosphate. The enzyme responsible for lipid I formation is the membrane protein MraY. The resulting lipid-linked intermediate (undecaprenylpyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptide or lipid I) is then the precursor of a

series of membrane-bound steps that lead to peptidoglycan formation (Lloyd *et al.*, 2004). MurG adds a GlcNAc moiety to lipid I giving lipid II, which can undergo different modifications. Lipid II is transferred by an unknown mechanism through the hydrophobic membrane to the periplasm (van Heijenoort, 2001). Lipid II is finally added to the growing cell wall polymer by the enzymatic action of penicillin-binding proteins (El Zoeiby *et al.*, 2001). E protein from phage Φ X174 inhibits the *MraY*-catalyzed step in the pathway (Bernhardt, 2001 #8). A_2 protein of phage Q β blocks cell wall biosynthesis by inhibiting the *MurA* step (Bernhardt, 2001 #6; Nishihara, 2002 #10).

There is a considerable uniformity between sequences of a large number of RNA coliphages and non-coliphages (Klovins *et al.*, 2002). Normally, the genomic organization is very similar between these phages. *Acinetobacter* phage 205 (AP205) is the first example of ssRNA phage found in *Acinetobacter* and the first with a different genetic map. There is no lysis gene in the usual position in its genome. Instead, there are two small open reading frames (ORFs) upstream of the maturation gene, whereas in other RNA phage genomes, there is no other gene. AP205 was first classified as a member of the *Leviviridae* family because it has the shape and the size of the ssRNA coliphages. The sequencing of its genome confirmed its classification. Actually, its genome is about the same size of RNA phages. The only important difference is the extra two ORFs at the 5' end.

ORF1 in AP205 was proposed to encode a lysis protein of 35 amino acids and shown that expression of this protein into *Escherichia coli* caused cell lysis (Klovins *et al.*, 2002). We report here the characterization of the lytic mechanism of P1 lysis protein encoded by ORF1 of phage AP205 by using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, media and chemicals. Bacterial strains, bacteriophage and plasmids used in this study are listed in Table 1. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, On, Canada) unless indicated otherwise. Bacterial cultures were grown in Luria-Bertani (LB) and Tryptic Soy Broth (TSB) media (Sambrook et Russell, 2001) (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 1% glucose or minimal M9 medium (Gibco Laboratories, Madison, WI) supplemented with 1% glucose, 0.5 g l⁻¹ NaCl, 1 mM MgSO₄•7 H₂O, 0.1 mM CaCl₂, 0.0005 % thiamine hydrochloride (BDH, Toronto, On, Canada) and L-amino acids as described previously (Bernhardt, 2001 #8). When indicated, media were supplemented with kanamycin (Km), chloramphenicol (Cm), and ampicillin (Am) at final concentrations of 50, 12.5, and 100 µg ml⁻¹, respectively. Bacterial cultures were induced with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 1 mM. [³H]Racemic-DAP ([³H]-DAP) (37 MBq ml⁻¹; 1.11 TBq mmol⁻¹) was purchased from American Radiolabeled Chemical Inc. (St. Louis, MO). The solvent system used for thin layer chromatography (TLC) was as follows: isobutyric acid : 1 M NH₄OH (5:3; v/v).

Construction of recombinant plasmids and the synthetic gene. Oligonucleotides used in this study are listed in Table 2. Restriction endonucleases and T4 ligase were obtained from New England BioLabs (Mississauga, On, Canada). Agarose gel electrophoresis and plasmid DNA preparations were performed according to published procedures (Sambrook et Russell, 2001). Hot Start TAQ polymerase (Qiagen, Mississauga, On, Canada) was used for PCR procedures. PCR products were analyzed in 1 % agarose gel and purified as recommended by the manufacturer with Amicon[®] Microcon[®]-PCR (Millipore Ltd, Nepean, On, Canada), unless indicated otherwise. The A₂ insert was amplified from pOP203A₂⁺ using 50 ng of purified plasmid DNA with primers A₂-fwd and A₂inpET24b-rev or A₂inpACYC-rev. PCR conditions for pET24b cloning were optimized as follows: 30 cycles, denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, primers at 0.2 µM each, dNTPs (GE Healthcare,

Baie d'Urfé, Québec, Canada) at 100 μ M each, MgCl₂ at 9 mM, 5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 2.5 U of Hot Start TAQ polymerase in a final volume of 50 μ l. PCR conditions for cloning into pACYCDuet-1 were as described above except that a touchdown PCR was used, with a temperature ramping range of 55°C to 45°C for 1 min, instead of annealing at 55°C for 1 min. PCR products were analyzed, purified and digested with *Nde*I and *Not*I or *Nde*I and *Kpn*I restriction enzymes. Digested PCR products were cloned into corresponding restriction sites of expression vectors pET24b and pACYCDuet-1, giving recombinant plasmids pMON2306 and pMON2317, respectively. The plasmid pMON2306 permits the production of the A₂ protein with A-A-A-L-E-His•tag at the C-terminal end and pMON2317 expresses the A₂ protein without the tag. The E insert was amplified from ϕ X174 using 5 \times 10⁷ plaque forming units (pfus) with primers E-fwd and E-rev. PCR conditions were as described above with the following modifications. Annealing was done at 51°C for 1 min, the PCR reaction contained MgCl₂ at 1.5 mM and no DMSO was added. PCR product was analyzed, purified and digested with *Nde*I and *Xho*I restriction enzymes and cloned into corresponding sites of the expression vector pACYCDuet-1, giving recombinant plasmid pMON2318. This construction was used for the production of E protein with a L-E-S•tag at the C-terminal end. *Pseudomonas aeruginosa murG* and *mraY* genes were amplified with primers murG-fwd and murG-rev, and mraY-fwd and mraY-rev, respectively. In both cases, 240 ng of PAO1 genomic DNA was used as template. Touchdown PCR conditions were optimized as follows: 30 cycles, denaturation at 95°C for 1 min, temperature ramping range of 55°C to 45°C for 1 min for *murG* and 60°C to 50°C for 1 min for *mraY*, and extension at 72°C for 1 min, primers at 0.2 μ M each, dNTPs (GE Healthcare) at 100 μ M each, 5% DMSO for *murG* only and 2.5 U of Hot Start TAQ polymerase in a final volume of 50 μ l. PCR products were analyzed, purified and digested with *Nde*I and *Xho*I for *murG* and *Nde*I and *Sal*I for *mraY*, and cloned into corresponding restriction sites of expression vector pET30c, giving recombinant plasmids pMON2319 and pMON2320, respectively. The plasmid pMON2319 was used for the production of MurG protein with a L-E-His•tag and pMON2320, the production of MraY protein with a V-D-K-L-A-A-A-L-E-His•tag at the C-terminus end.

The *pI* gene was obtained by synthetic gene construction (Dieffenbach, 2003 #15). PCR assembly reactions contained 0.5 pmole of each construction primer p1-1, p1-2, p1-3, p1-4, p1-5, p1-6 and p1-touchup, 0.2 μ M PCR primers p1-fwd and p1-rev, dNTPs (GE Healthcare) at 100 μ M each, 1.3 M betaine monohydrate (Fluka, Sigma Aldrich), 3.5 mM MgCl₂ and 2.5 U of Hot Start TAQ polymerase in a final volume of 100 μ l. PCR conditions were as follows: 25 cycles, denaturation at 93°C for 1 min and annealing and extension at 62°C for 20 min. PCR product was analyzed in 2 % agarose gel, purified and digested with *Nde*I and *Xho*I enzymes and cloned into the corresponding restriction sites of expression vectors pET24b and pACYCDuet-1. Recombinant plasmids were named pMON2301 and pMON2316, respectively, and permit production of the P1 protein with a His•tag at the C-terminal end.

Overexpression of P1, A₂ and E proteins. The pMON2301 and pMON2306 plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS cells by CaCl₂ transformation for expression of P1 and A₂. pMON2318 was transformed into *E. coli* HMS174 (λ DE3) cells by CaCl₂ transformation for expression of E. For P1 and A₂, 50 ml of TSB-Km and TSB-Cm were inoculated with an overnight culture of 5 ml of *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS carrying pMON2301 or pMON2306. For E, a 50 ml of TB-Cm was inoculated with 3 ml of an overnight culture of *E. coli* HMS174 (λ DE3) carrying pMON2318. Cells were incubated at 37°C with agitation at 250 rpm until an optical density (OD) of 0.4-0.6 at 600 nm was reached. Protein expression was induced with 0.1 mM IPTG for 4 h. Cells were centrifuged and the pellets and supernatants were stored at -80°C.

Membrane preparation and solubilization. This experiment was adapted from (Chandrakala *et al.*, 2001). All centrifugations were done at room temperature. Two liters of LB-Km were inoculated with an overnight culture of 200 ml of *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS carrying pMON2301. Cells were incubated at 37°C with agitation at 250 rpm until an OD₆₀₀ of 0.4-0.5 was reached. Protein expression was induced with IPTG for 4 h. Cells were harvested, washed, resuspended in 7 ml of Buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.1 mM MgCl₂) and lysed 4 times in a French press cell. Lysate volume was completed to 35 ml with Buffer A and centrifuged at 3,500 \times g for 45 min using a SA-600 rotor. The

supernatant was ultra centrifuged at $150,000\times g$ for 45 min using a Beckman L8-M ultracentrifuge, a NVT 65.2 rotor and Optiseal™ polyallomer tubes (Beckman, Palo Alto, CA). The pellet was gently resuspended in 35 ml of Buffer A and recentrifuged at $150,000\times g$ for 45 min. The pellet was resuspended in a final volume of 3.5 ml of Buffer A and stored in aliquots at -80°C . An aliquot of 500 μl was centrifuged 5 min at maximum velocity in a microcentrifuge. The supernatant was stored at -80°C and the pellet was solubilized in 500 μl of reagent 3 (5 M urea, 2 M thiourea, 2 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) SB 3-10, 40 mM Tris, and 0.2 % (w/v) Bio-Lyte 3/10 ampholyte) of the ReadyPrep™ Sequential Extraction Kit (Bio-Rad, Mississauga, On, Canada) supplied with 2 mM tributyl phosphine. The mixture was vortexed for 5 minutes and centrifuged 10 min in a microcentrifuge. The supernatant was recovered and a protein concentration of 6 mg ml^{-1} was determined with the PlusOne™ 2-D Quant kit (GE Healthcare) as recommended by the manufacturer.

Purification of inclusion bodies. The bacterial pellet of *E. coli* BL21 (λDE3) pLysS carrying pMON2306 was resuspended in wash buffer from the Protein Refolding Kit (Novagen, Madison, WI) and treated with lysozyme at 1 mg ml^{-1} and a cocktail of protease inhibitors was added as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Cells were lysed by sonication for 1 min ml^{-1} using a Virsonic Digital 475 ultrasonic disrupter (Virtis, Gardiner, NY). Inclusion bodies were purified as described previously (Paradis-Bleau *et al.*, 2005). The presence of the A_2 protein was visualized by SDS-PAGE (Sambrook et Russell, 2001) with PhastGel® Blue R staining as recommended by the manufacturer (GE Healthcare) and confirmed by Western blot analysis as described below.

SDS-PAGE of peptides. SDS-PAGE analyses for P1 and E proteins were done as described previously (Walker, 2002 #16). Peptides as small as 500 Da can be separated with this SDS-PAGE protocol. After assembly of the gel apparatus, two marks were made in front of the plate to identify the top of separating (3.5 cm from bottom of the plate) and spacer gels (2 cm above the separating gel mark), leaving 8 mm for the stacking gel. The reagents for the separating gel were combined as follows: 3.35 ml

water, 5 ml separating/spacer gel buffer (3 M Tris-HCl, 0.3 % sodium dodecyl sulfate; pH 8.9), 5 ml separating gel acrylamide (2X crosslinker) (48 g acrylamide, 3 g N,N'-methylenebis-acrylamide completed to 100 ml with water), 1.6 ml glycerol, 20 μ l TEMED and 100 μ l 10 % ammonium persulfate (APS). The reagents for the spacer gel were combined as follows: 3.45 ml water, 2.5 ml separating/spacer gel buffer, 5 ml spacer gel acrylamide (1X crosslinker) (48 g acrylamide, 1.5 g N,N'-methylenebis-acrylamide completed to 100 ml with water), 10 μ l TEMED and 50 μ l 10 % APS. The reagents for the stacking gel were combined as follows: 5.15 ml water, 0.95 ml stacking gel buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8), 5 ml stacking gel acrylamide (48 g acrylamide, 0.8 g N,N'-methylenebis-acrylamide completed to 100 ml with water), 75 μ l EDTA, 15 μ l TEMED and 150 μ l 10 % APS. Cathode running buffer was diluted to 1X from the 10X stock (1 M Tris-HCl, 1 M tricine, 1 % SDS; pH 8.25) and added to the top chamber of the gel apparatus. The bottom chamber was filled with the anode buffer diluted to 1X from the 10X stock (2 M Tris-HCl; pH adjusted to 8.9). After loading of 10 μ l of the samples, gel was run for 4 h at 95 V and stained with PhastGel[®] Blue R staining as recommended by the manufacturer (GE Healthcare). The protein marker used with these gels was the Kaleidoscope Polypeptide Standard (Bio-Rad).

SDS-PAGE and Western blot analysis. A₂ protein from the purified inclusion bodies (15 μ l) was resolved on 4-20 % Tris-Hepes-SDS Pre Cast Polyacrylamide Mini Gel (VWR International, Ville Mont-Royal, Québec, Canada). Proteins were transferred onto a 45 μ m Immun-Blot[™] PVDF membrane (Bio-Rad) during an hour at 100 V. The membrane was blocked overnight at 4°C with 30 ml of the ECL advance blocking agent from the ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare). After, the blocked membrane was incubated with mouse anti-His•Tag[®] monoclonal antibody (Novagen) diluted 1:1000 into the blocking solution followed by incubation with anti-mouse immunoglobulin G antibody conjugated to horseradish peroxidase (GE Healthcare) diluted 1:3000 in the same solution. The signal was developed using the ECL Advance Western Blotting detection kit as recommended by the manufacturer.

Determination of cell wall precursor synthesis. *E. coli* ET505 was obtained from the *E. coli* Genetics Stock Center. The *lysA* mutation in this strain was required to prevent the conversion of [³H]-DAP to lysine, so that [³H]-DAP is only incorporated into bacterial cell wall and its precursors. ET505 was lysogenized using the λDE3 Lysogenization Kit as recommended by the manufacturer (Novagen). The lysogenized strain, ET505 (λDE3), was used to express genes under the control of the T7 promoter. The pMON2316, pMON2317, pMON2318 and pACYCDuet-1 plasmids were transformed into *E. coli* ET505 (λDE3) cells by CaCl₂ transformation. Determination of cell wall precursor synthesis was done as described previously (Bernhardt, 2001 #8) with the following modifications. A 20 ml aliquot of minimal M9 medium containing Cm was inoculated with an overnight culture of 5 ml of transformed cells and incubated at 37°C with agitation at 250 rpm until an OD₆₀₀ of ~0.4 was reached. After IPTG induction, 2 ml of each culture were transferred into a tube containing 35 μl of prewarmed [³H]-DAP. After 2 or 20 min pulse-labeling periods at 37°C, cultures were centrifuged as described. Three samples of ~3.3 μl of the cell suspensions were spotted on Whatman 3 MM paper and developed as described. Cell wall, nucleotide, and lipid intermediates ran at R_F values of 0, 0.1 and 0.8, respectively (Bernhardt, 2001 #8). Radioactive labeling was determined by counting the strips in a RackBeta 1217 LKB-Wallac liquid scintillation counter using biodegradable CytoScint™ liquid scintillation fluid (MP Biomedicals, Irvine, CA).

Gene dosage and cell rescue experiments. The pMON2316, pMON2317 and pMON2318 plasmids were transformed into *E. coli* HMS174 (λDE3) cells by CaCl₂ transformation and tested for lytic activity by induction of P1, A₂ and E. Then, the pMON2319, pMON2320, pMON3004, pMON3005, pMON3006, pMON30009, pMON3013 and pMON3014 plasmids carrying *mur* genes were transformed into clones constructed previously and capable of lysis after induction, and into *E. coli* HMS174 (λDE3) cells. For each experiment expressing A₂ and E proteins, a bacterial culture of 100 ml of TB-Cm was inoculated with 4 ml of an overnight culture of HMS174 (λDE3) carrying the pMON2317 or pMON2318 plasmids. Cells were incubated at 37°C with agitation at 250 rpm until an OD₆₀₀ of 0.4-0.5 was reached. The 100 ml culture was split in two 50 ml aliquots and protein expression was induced from one aliquot with IPTG for

4 h. At the same time, two 50 ml aliquots of TB-Cm plus Km or Cm plus Am and TB-Km or Am media (see Table 1 for plasmid antibiotic resistance markers) were inoculated with 2 ml of an overnight culture of HMS174 (λ DE3) carrying two plasmids (first with a *mur* gene and second with the A_2 or E genes on compatible plasmid vector pET and pACYC-DUET) and another overnight culture of HMS174 (λ DE3) carrying one plasmid (*mur* gene only). Cells were incubated and protein expression was induced as described above. The same protocol was used for the experiment with P1, except that the incubation temperature was 28°C instead of 37°C and each culture of 100 ml was inoculated with 5 ml of an overnight culture and 50 ml culture, with 2.5 ml. Survival ratios were calculated with OD obtained after 4 h of induction as follows:

$$\text{Survival ratio (\%)} = \frac{(OD_{M+L} - OD_L)}{(OD_M - OD_L)} \times 100$$

Where OD_{M+L} is the OD of the culture expressing the *Mur* and *Lysis* genes

OD_L is the OD of the culture expressing the *Lysis* gene only

OD_M is the OD of the culture expressing the *Mur* gene only

Overexpression and purification of MurA. One liter of LB-Km medium supplemented with 1% NaCl was inoculated with 100 ml of an overnight culture of *E. coli* BL21 (λ DE3) carrying pMON3005 (El Zoeiby *et al.*, 2001). Cells were incubated at 37°C with agitation at 250 rpm until an OD_{600} of ~ 0.7 was reached. MurA expression was induced with IPTG for 3 h. Cells were centrifuged and the pellet was stored at -80°C. Sonication was done as described above in the section on Purification of inclusion bodies. The sonicate was centrifuged two times at 11,000 $\times g$ for 30 minutes in a SA-600 rotor and the supernatant was filtered through 0.45 μ m before purification by FPLC with a HisTrap HP 5 ml column (GE Healthcare). The supernatant was loaded at a flow rate of 1 ml min⁻¹ onto the column pre-equilibrated with the binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 5 mM imidazole, pH 7.4). The column was washed with the same buffer and the MurA protein was eluted with a gradient of the elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole, pH 7.4). The gradient was increased from 0 to 100 % over 5 column volumes and the MurA protein was eluted when the gradient

was about 43 % and until it reached 65 %. Eluted fractions (5 ml total) were analyzed by SDS-PAGE and diluted 5 times in MurA buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 30 mM imidazole and 5 mM DTT). A protein concentration of 3.6 g l⁻¹ was obtained as determined with the Bio-Rad protein assay (Bradford, 1976) (Bio-Rad).

Synthesis of P1. ORF1 of phage AP205 encoding the amino acid sequence MKKRTKALLPYAVFIILSFQLTLLTALFMYHYHYTF was synthesized as peptide P1. Peptide synthesis was performed on an ABI 433A Peptide Synthesizer using FastMoc chemistry (El Zoeiby, 2003 #5). The peptide was purified on a Vydak 22 mm X 250 mm C18 reverse-phase HPLC column using 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile gradient at 10 ml min⁻¹. Peptide purity was analyzed by HPLC (>90%) and molecular mass confirmed (4242.16 Da) by MALDI-TOF. The 17 first residues of the peptide sequence were confirmed by Edman degradation. The peptide was solubilized in DMSO (Fluka, Sigma Aldrich) and the pH was adjusted to 7.

Synthesis of uridine 5'-diphosphoryl N-acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamate. Synthesis of UDP-MurNAc-Ala-Glu was performed essentially as described (Reddy *et al.*, 2001) except that the steps involved in the synthesis of UDP-MurNAc-Ala-Glu from UDP-GlcNAc were carried out in a single reaction using the combined activities of *P. aeruginosa* MurA, MurB, MurC and MurD enzymes. The UDP-MurNAc-Ala-Glu product from this incubation was purified from the reaction mixture by firstly removing of the Mur enzymes by ultracentrifugation. UDP-MurNAc-Ala-Glu was then purified from the ultrafiltrate by anion exchange chromatography at room temperature on DEAE Sephacel, pre-equilibrated in 10 mM ammonium acetate, pH 7.5, where UDP-MurNAc-Ala-Glu was eluted on a 10-800 mM ammonium acetate (pH 7.5) gradient. UDP-MurNAc-Ala-Glu was identified enzymatically, using a pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupled assay for MurE and *meso*-DAP-dependent ADP generation. Fractions thus identified to contain UDP-MurNAc-Ala-Glu were freeze dried from water three times to remove the ammonium acetate. Purity of the UDP-MurNAc-Ala-Glu was assessed by analytical anion exchange by FPLC on MonoQ[™] using 0-60 M gradient of ammonium acetate which indicated that the product was 99% pure. Negative ion

electrospray mass spectrometric characterization gave an observed m/z of 878.20 Da identical to the expected m/z value for UDP-MurNAc-Ala-Glu. The synthesized product was stored frozen in water at 3.4 mM.

Assay for MurA inhibition. Inhibition of MurA activity was tested with P1 using the EnzChek[®] Phosphate Assay Kit as recommended by the manufacturer (Invitrogen, Burlington, On, Canada) with the following modifications. The purine nucleoside phosphorylase (PNP) enzyme was added with the substrate 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside (MESG) along with 15 μM (0.5 mg ml^{-1}) of purified MurA, 0.67 mM GlcNAc and different concentrations of P1 (0.1, 10, 33.3, 60, 100 and 150 μM with 13.3 % DMSO) in a final volume of 150 μl . Then, the mixture was preincubated for 10 min at room temperature. To determine if peptide P1 is a slow binding inhibitor, a preincubation time of 30 min was also tested. The reaction was started by addition of 0.67 mM PEP. The optical density was continuously monitored at 360 nm for a period of 7 min at room temperature with a Cary 1 spectrophotometer (Varian, Saint-Laurent, Québec, Canada). Preincubation of each substrate with MurA was tested. Competitive assays with 3.3 mM of GlcNAc and PEP were performed with P1 at the IC_{50} value for MurA. The MurA enzymatic velocity was determined from the linear curve portion using the least-squares calculation. An extinction coefficient of 11000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ for MESG was used to calculate MurA specific activity (Webb, 1992). The IC_{50} was determined from the curve obtained with the linear regression. The standard deviation was calculated with the following equation:

$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2}$$

Assay for MurB inhibition. Inhibition capacities of P1 on MurB activity were measured by monitoring the decrease of NADPH absorbance at 340 nm using the same spectrophotometer as for the MurA assay. MurB enzyme and GlcNAc-EP were purified as previously described (El Zoeiby, 2001 #4; El Zoeiby, 2003 #17). The reaction was done in a volume of 100 μl . MurB (20 μM , 0.8 mg ml^{-1}) was preincubated with 50 mM KCl, 5 mM DTT and different concentrations of P1 (25, 125, 250 and 500 μM with 20 %

DMSO) in 50 mM Bis-Tris propane buffer, pH 8 for 10 min at 37°C. Preincubation of 30 min in the presence of the peptide P1 was tested as for MurA. The reaction was started by addition of 250 μ M GlcNAc-EP and 150 μ M NADPH. The optical density was continuously monitored at 340 nm in the visible spectrum for a period of 2 min at room temperature. Preincubation of each substrate with MurB was tested. Competitive assays with 1.1 mM GlcNAc-EP, 315 μ M NADPH and 250 mM K⁺ were performed with P1 at the IC₅₀ value for MurB. Enzymatic velocity for MurB was determined as for MurA. To determine MurB specific activity, an extinction coefficient of 6220 M⁻¹ cm⁻¹ was used for NADPH at 340 nm (Nishida *et al.*, 2006). IC₅₀ and standard deviation were calculated as in the assay for MurA inhibition.

Assay for MurE inhibition. Inhibition of MurE was measured using the inorganic phosphate release assay developed by Lanzetta *et al.* (Lanzetta *et al.*, 1979) with the following modifications. The assay was done in a final volume of 100 μ l. MurE (40 nM, 1.7 mg l⁻¹) was preincubated with 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, and different concentrations of P1 (5, 25, 30, 40, 50, 75, 100 and 250 μ M with 20 % DMSO) in 50 mM Bis-Tris propane pH 8 for 10 min at room temperature. Preincubation of 30 min was also tested. The reaction was started by the addition of 1 mM ATP, 10 mM *meso*-DAP, 200 μ M MurNAc-Ala-Glu. The reaction was incubated for 15 min at room temperature. The Lanzetta reagent (800 μ l) was added to stop the reaction. Sterox was excluded from the Lanzetta reagent. Color development was stopped after 5 min at room temperature by the addition of 34% (w/v) sodium citrate (100 μ l). The OD at 600 nm was measured and the amount of inorganic phosphate was determined by comparisons with a standard phosphate curve. Preincubation of 30 min with P1 was tested as for MurA and MurB. Preincubation of each MurE substrate with the enzyme was tested to determine MurE enzymatic velocity. Competitive assays with higher concentrations of substrates were performed. Assays were done with P1 at the IC₅₀ value for MurE and 5 mM ATP, 50 mM DAP, 0.4 mM MurNAc-Ala-Glu and the cofactor Mg²⁺ at 25 and 500 mM. The IC₅₀ and standard deviation were calculated as in the assay for MurA inhibition.

RESULTS

Synthetic construction of the *pI* gene. The oligonucleotides were designed as listed in Table 2 to synthesize the ORF1 (nt 134-238) from the published sequence of the ssRNA phage AP205 (Klovins *et al.*, 2002). In designing the oligonucleotides, we developed a strategy where *NdeI* and *XhoI* sites were incorporated for cloning into pET24B (pMON2301 in Table 1) and into pACYCDuet-1 (pMON2316 in Table 1) for expression into *E. coli*. The synthetic *pI* gene construction encoding a 35 amino acid peptide contained a His-tag at the C-terminus and was successfully achieved by a PCR-based approach (Dieffenbach, 2003 #15) as depicted in Fig. 1. The size of ORF1 that we now refer to as the *pI* gene was confirmed by agarose gel electrophoresis and sequencing. The amplified DNA sequenced was as exactly reported (GenBank no.AF334111, data not shown). Both recombinant plasmids constructed and permitting controlled expression of P1 were transformed into appropriate *E. coli* strains as listed in Table 1.

Expression of P1, A₂ and E protein antibiotics into *E. coli*. Since it has been previously demonstrated that E from phage ΦX174 is a specific inhibitor of *MraY* and A₂ from phage Qβ inhibits *MurA* (Bernhardt, 2000 #7; Bernhardt, 2001 #6), we decided to clone and overexpress both E and A₂ proteins into *E. coli*. When the *pI* gene was cloned behind the strong inducible T7 promoter (pMON2301), induction in *E. coli* halted cell growth (Fig. 2). Growth at various cell densities followed by induction gave similar arrest in growth (data not shown). As shown in Fig. 2, a similar arrest in growth was obtained with the *E. coli* recombinant clone (pMON2306) expressing the A₂ protein. In contrast, the culture of *E. coli* cells expressing E (pMON2318) showed a decrease in OD immediately after induction and rapid cell lysis was observed. A less dramatic cell lysis was observed with *E. coli* cells carrying plasmids pMON2301 and pMON2306 and expressing P1 and A₂; the decrease in OD was observed an hour after induction. *E. coli* cells containing either pACYCDuet-1 or pET24b vectors without insert showed optimal growth (Fig. 2).

A₂ protein visualization. Overexpression of A₂ protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis. A₂ protein was recovered in inclusion bodies and visualized as a 51.7 kDa protein on 4-20% SDS-PAGE (data not shown).

Incorporation of [³H]-DAP into cell wall precursors. A convenient assay to measure cell wall synthesis is to measure the incorporation of [³H]-DAP into insoluble material. After induction of protein expression, aliquots of bacterial cultures can be pulse-labeled with [³H]-DAP from 2 to 20 min and precursors separated by paper chromatography into cell wall, nucleotide intermediates (MurNAc-tripeptide and -pentapeptide), and lipid intermediates (lipid I and II) (Bernhardt, 2001 #8). To determine which step (nucleotide intermediates or lipids) of the cell wall biosynthesis is blocked by P1, we measured the synthesis of cell wall precursors during *p1* expression from pMON2316 into *E. coli*. Since A₂ inhibits MurA and E MraY, we also tested *E. coli* strains expressing these small peptides as controls. As shown in Fig. 3A and Table 3 after 2 min of pulse-labeling, less [³H]-DAP accumulated into the cell wall of E-expressing cells as compared with the wild type (wt) cells. There was also a decrease in [³H]-DAP accumulation into the lipid intermediates of E- and A₂-expressing cells (Fig. 3E). After 20 min of pulse-labeling, less [³H]-DAP was incorporated into the cell wall and the nucleotide intermediates of the three lysis protein expressing cells; this is consistent with incorporation into wt cells (Fig. 3B and D). Finally, accumulation of [³H]-DAP was noted into the lipid intermediates of P1 expressing cells compared to the control cells or the A₂ and E expressing cells. Hence, this suggested that the P1 peptide was an inhibitor of nucleotide intermediates as well as lipid intermediates.

Gene dosage and cell rescue experiments. To precisely identify the target of P1, each MurA to MurF as well as MraY and MurG genes were cloned from *P. aeruginosa* into a high copy plasmid vector pET24. The general strategy is presented as schematics in Fig. 4 A and B and plasmids expressing MurA to MurF, MraY and MurG are described in Table 1. As depicted in Fig. 4C, we reasoned that co-expression of a protein antibiotic on an intermediate copy number plasmid compatible with a Mur enzyme on a high copy

number plasmid in the same bacterial host could not only rescue *E. coli* cells from lysis but identify the host target.

E and A₂ protein antibiotics were used to validate this concept because their host cell targets are known. As shown in Fig. 5A coexpression of A₂ and MurA proteins in the same cell rescued *E. coli* from lysis. When compared with *E. coli* expressing E only and where rapid cell lysis is observed, coexpression of both E and MraY proteins shown in Fig. 5B partly prevented cell lysis. To assess the gene dosage effect protecting against cell lysis, all MurA to MurF, MurG and MraY proteins were systematically co-expressed with each A₂, E and P1 antibiotic protein and results are summarized in Fig. 5D, 5E and 5F, respectively. We estimated the rescue of bacterial cells from lysis as a survival ratio. As shown in Fig. 5D, overexpression of MurA, MurB and MurE along with A₂ prevents cell lysis. This indicates that A₂ presumably interacts with these 3 proteins as targets. As shown in Fig. 5B, the ratio of cell survival when co-expressing E and MraY clearly identify this protein as the sole target. For the antibiotic protein P1, survival of bacterial cells was observed when P1 was coexpressed with MurA, MurB, MurE, MraY and MurG (Fig. 5F) and an example of growth curves obtained is shown with MurB in Fig. 5C.

Inhibition of MurA, MurB and MurE. To confirm the specificity of P1 interaction with MurA, MurB and MurE, specific inhibition assays were performed using purified enzymes and a synthetic P1 peptide. As shown in Fig. 6, different concentrations of P1 were used to calculate the IC₅₀ values for each of the 3 enzymes. As shown in Table 4, the purified MurA, MurB and MurE enzymes had specific activities of 0.033, 2.0 and 4.2 M g⁻¹ min⁻¹, respectively. We noted that P1 had an IC₅₀ value of 30 μM for MurA, 210 μM for MurB and 33 μM for MurE, respectively (Fig. 6). As shown in Table 4, the P1 peptide is a more potent inhibitor of enzymatic activity of MurA than MurB or MurE because of the low enzyme to P1 peptide ratio of 1 enzyme for 2 P1 peptide molecules.

An incubation time of up to 30 min of P1 with each enzyme for each reaction did not change enzymatic activity or inhibition. Incubation of MurA with the P1 inhibitor peptide prior to assaying did not result in time-dependent inhibition suggesting that P1 is a purely reversible inhibitor of the forward reaction of MurA. Thus, an incubation time of 10 min was used for subsequent assays. Preincubation of MurA with GlcNAc gave optimal

specific activity ($0,03 \text{ M g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) for the enzyme and also a better inhibition (around 50% instead of 7% of inhibition) by P1. Preincubation with the PEP MurA substrate did not exert any effect on the MurA.P1 peptide complex. Preincubation with GlcNAc-EP gave a higher specific activity (approximately 30% greater) with MurB but was competitive for inhibition (15% instead of 57%) with P1. Preincubation with NADPH partially inhibited MurB enzymatic activity (without peptide). The addition or absence of MurNAc-Ala-Glu MurE substrate during preincubation gave an identical enzymatic velocity for MurE. The MurE specific activity was reduced when ATP or DAP was added during the preincubation period.

Competitive assays with GlcNAc and PEP in the MurA assay gave identical IC_{50} values for P1. As for MurA, identical IC_{50} values were obtained with MurB incubated with NADPH, GlcNAc-EP and K^+ in the competitive assays. Higher concentrations of PEP and NADPH gave a barely detectable inhibition of MurA and MurB activities. The P1 IC_{50} value for MurE was identical ($33 \mu\text{M}$) with higher concentrations of ATP, DAP and MurNAc-Ala-Glu. However, the addition of 500 mM of Mg^{2+} diminished MurE P1 inhibition (13% of inhibition instead of around 50%). In addition, this cofactor increased the specific activity of MurE when used at 25 and 500 mM compared with 5 mM (data not shown).

DISCUSSION

AP205 nt 134-238 represent the phage ORF1 (Klovins *et al.*, 2002). This ORF, or gene *pI*, was successfully synthesized using a PCR assembly method already proven to be efficient for synthesis of small and long DNA sequences (Sanger *et al.*, 1978; Stemmer *et al.*, 1995).

Even though the *pI* gene is not located at the usual position of the *Leviviridae* phage lysis gene in the AP205 genome, the *pI* gene product is clearly lytic for *E. coli*. Induction of P1 protein expression in *E. coli* halted cell growth (Klovins *et al.*, 2002). As previously demonstrated, expression of E and A₂ proteins into *E. coli* also interrupted cell growth and caused cell lysis (Winter et Gold, 1983; Bernhardt *et al.*, 2000).

Partially purified A₂ protein from inclusion bodies visualized as a 51.7 kDa protein was confirmed by Western blot analysis (data not shown). This apparent molecular mass (MM) was consistent with the theoretical MM of 49.8 kDa calculated from the recombinant A₂ protein sequence. A 47 kDa [¹⁴C]-labeled Qβ phage A₂ protein has already been observed by SDS-PAGE analysis (Winter et Gold, 1983).

Labeling of bacterial cell wall and its precursors using [³H]-DAP is a well known technique (Wientjes *et al.*, 1985; Blasco *et al.*, 1988) which has already been used to investigate the lytic mechanisms of E and A₂ proteins (Bernhardt, 2001 #8; Bernhardt, 2001 #6). As in the study performed with E protein, an accumulation of radioactivity into nucleotide intermediates was observed for E-expressing cells after a 2 min of pulse-labeling period (Bernhardt, 2001 #8). In the same study, an inhibition of [³H]-DAP incorporation into these intermediates was seen after only 5 min of E expression. Therefore, it is normal to see no accumulation into nucleotide intermediates after 20 min of pulse-labeling (Table 3). Indeed, E seems to inhibit its target MraY very quickly. Bbacterial lysis was observed immediately after induction (Fig. 2).

When the same expression vector was used for expression in *E. coli*, A₂ protein led to cell lysis a little slower than E (data not shown). Then, 2 min of pulse-labeling was not enough to observe anything conclusive. However, as demonstrated previously (Bernhardt, 2001 #6), an inhibition of [³H]-DAP accumulation into cell wall and

nucleotide intermediates demonstrate that A₂ protein must block the DAP incorporation step or one of the steps before. Effectively, by inhibiting MurA, A₂ prevent all subsequent steps from occurring.

Results obtained for P1 protein resemble those obtained for A₂. Radioactivity incorporated into cell wall and nucleotide intermediates was a little higher than with A₂, but still under values obtained with control cells. This correlates with the fact that, when expressed from the same expression vector, P1 protein causes cell lysis more slowly than A₂ (Fig. 2) (Klovins *et al.*, 2002). Thus, P1 target must be MurA, MurB, MurC, MurD or MurE proteins.

The gene dosage and cell rescue experiments allowed a more precise identification of which Mur enzyme overexpression permitted cell survival and bypassed P1 lytic activity. We hypothesized that increasing the concentration of the cellular target would delay or inhibit cell lysis by titrating out P1. The idea was that P1 titrates out the activity of MurA, MurB and MurE proteins by binding as an inhibitor, leading to the prediction that increasing the Mur concentrations would delay or even inhibit lysis. The protein antibiotics E and A₂ were used to validate the method. A model for the mechanism of E-mediated lysis was tested by expressing *mraY* from a medium copy plasmid under control of the *araBAD* promoter. Expression of *mraY* from this plasmid in conjunction with E from the *tac* promoter on a compatible plasmid severely delayed lysis (Bernhardt *et al.*, 2000). The E mediated bacterial cell lysis system was used as a control and was delayed when MraY concentration was increased (Fig. 5B). Here, we also demonstrate for the first time that gene dosage and cell rescue experiments can also be done with the A₂ protein antibiotic from phage Q β . Genetic and biochemical approaches have shown that A₂ inhibits MurA (Bernhardt, 2001 #6). Due to this result we expected that A₂ mediated cell lysis would be delayed with MurA overexpression. As anticipated, a survival ratio of about 60% was obtained (Fig. 5A and D). Interestingly, significant survival ratios were also obtained when A₂ expression was combined with those of MurB and MurE (Fig. 5D). This can be explained by the fact that MurA and MurB recognize almost the same substrate. The enolpyruvate moiety is the only difference between both substrates for these two enzymes. Furthermore, the MurB substrate, MurNAc, has been shown to provide feedback inhibition of MurA. MurNAc likely binds to MurA in the same position

and orientation as GlcNAc and GlcNAc-EP (Mizyed *et al.*, 2005). Likewise, the MurA substrate, GlcNAc, was shown to be a weak competitive inhibitor of the MurB substrate, GlcNAc-EP. Another type of MurA feedback inhibition was observed with the MurNAc-pentapeptide (Lugtenberg *et al.*, 1972). This compound also inhibits MurE as well as the MurE reaction product, MurNAc-tripeptide (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1982). As the MurNAc-pentapeptide inhibits MurA and MurE, these two enzymes must have structural similarities recognizable by the A₂ protein antibiotic which explains why this lysis protein can potentially inhibit MurE. Multiple host cell targets were identified for P1 and A₂ by the gene dosage experiments leading to delayed cell lysis. As for A₂, significant survival ratios were obtained when P1 and MurA, MurB or MurE were overexpressed in the same bacterial cell.

Enzyme kinetics analysis using purified MurA necessitated a preincubation with GlcNAc to have optimal specific activity and inhibition when P1 was present. The GlcNAc induces a conformational change in MurA and permits a better interaction with PEP and presumably the P1 inhibitor. In contrast, preincubation with PEP did not change MurA activity. This indicated that the conformational change induced by PEP is less pronounced (Schonbrunn *et al.*, 1998; Krekel *et al.*, 1999; Eschenburg *et al.*, 2003).

No competition was noted with respect to GlcNAc or PEP (data not shown). In the MurB enzyme assays, no differences in activity were detected when competitive assays were done. Since no competition was observed with any substrates in MurA and MurB assays, P1 would inhibit these two enzymes by binding their active sites. In contrast, P1 was a competitive inhibitor of MurE with respect to Mg²⁺ at high concentrations (data not shown). This cofactor is essential for MurE activity. However, a preincubation step of P1 with each enzyme tested did not change inhibition and IC₅₀ values. Therefore, P1 is not a time-dependent inhibitor because equilibrium was probably reached rapidly. We noted that P1 is a more potent inhibitor of MurA than MurB or MurE because it took less peptide to inhibit the enzyme (see ratios of enzyme to peptide in Table 4). Moreover, cell survival occurred when P1 was overexpressed in combination with MraY or MurG. MraY and MurG cofactor is also Mg²⁺ (Auger, 2003 #40; Bouhss, 2004 #39). As for MurE, it is possible that P1 is a competitive inhibitor of these enzymes by binding to their Mg²⁺ binding site.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Le Service de Séquence de Peptides de l'Est du Québec and Le Service d'Analyse et de Synthèse d'Acides Nucléiques de l'Université Laval for their assistance. R. C. Levesque is a scholar of exceptional merit from Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec and C. Paquet-Bouchard was awarded a studentship from the FRSQ.

REFERENCES

1. **Auger, G., J. van Heijenoort, D. Mengin-Lecreulx, and D. Blanot.** 2003. A MurG assay which utilises a synthetic analogue of lipid I. *FEMS Microbiol Lett* **219**:115-9.
2. **Bernhardt, T. G., W. D. Roof, and R. Young.** 2000. Genetic evidence that the bacteriophage phi X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4297-302.
3. **Bernhardt, T. G., D. K. Struck, and R. Young.** 2001. The lysis protein E of phi X174 is a specific inhibitor of the *MraY*-catalyzed step in peptidoglycan synthesis. *J Biol Chem* **276**:6093-7.
4. **Bernhardt, T. G., I. N. Wang, D. K. Struck, and R. Young.** 2001. A protein antibiotic in the phage Qbeta virion: diversity in lysis targets. *Science* **292**:2326-9.
5. **Blasco, B., A. G. Pisabarro, and M. A. de Pedro.** 1988. Peptidoglycan biosynthesis in stationary-phase cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**:5224-8.
6. **Bouhss, A., M. Crouvoisier, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx.** 2004. Purification and characterization of the bacterial *MraY* translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J Biol Chem* **279**:29974-80.
7. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
8. **Calendar, R.** 1988. *The Bacteriophages*. Plenum Press, New York.
9. **Chandrakala, B., B. C. Elias, U. Mehra, N. S. Umapathy, P. Dwarakanath, T. S. Balganesh, and S. M. deSousa.** 2001. Novel scintillation proximity assay for measuring membrane-associated steps of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:768-75.
10. **Dieffenbach, C. W., and G. S. Dveksler.** 2003. *PCR primer : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
11. **El Zoeiby, A., F. Sanschagrín, A. Darveau, J. R. Brisson, and R. C. Levesque.** 2003. Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme

- derived from phage-displayed peptide libraries. *J Antimicrob Chemother* **51**:531-43.
12. **El Zoeiby, A., F. Sanschagrín, P. C. Havugimana, A. Garnier, and R. C. Levesque.** 2001. In vitro reconstruction of the biosynthetic pathway of peptidoglycan cytoplasmic precursor in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **201**:229-35.
 13. **El Zoeiby, A., F. Sanschagrín, and R. C. Levesque.** 2003. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* **47**:1-12.
 14. **El Zoeiby, A. E., M. Beaumont, E. Dubuc, F. Sanschagrín, N. Voyer, and R. C. Levesque.** 2003. Combinatorial enzymatic assay for the screening of a new class of bacterial cell wall inhibitors. *Bioorg Med Chem* **11**:1583-92.
 15. **Eschenburg, S., W. Kabsch, M. L. Healy, and E. Schonbrunn.** 2003. A new view of the mechanisms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (AroA) derived from X-ray structures of their tetrahedral reaction intermediate states. *J Biol Chem* **278**:49215-22.
 16. **Holloway, B. W., V. Krishnapillai, and A. F. Morgan.** 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**:73-102.
 17. **Klovins, J., G. P. Overbeek, S. H. van den Worm, H. W. Ackermann, and J. van Duin.** 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *J Gen Virol* **83**:1523-33.
 18. **Krekel, F., C. Oecking, N. Amrhein, and P. Macheroux.** 1999. Substrate and inhibitor-induced conformational changes in the structurally related enzymes UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS). *Biochemistry* **38**:8864-78.
 19. **Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, P. S. Reinach, and O. A. Candia.** 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* **100**:95-7.

20. **Lloyd, A. J., P. E. Brandish, A. M. Gilbey, and T. D. Bugg.** 2004. Phospho-N-acetyl-muramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*: catalytic role of conserved aspartic acid residues. *J Bacteriol* **186**:1747-57.
21. **Lugtenberg, E. J., L. De Haas-Menger, and W. H. Ruyters.** 1972. Murein synthesis and identification of cell wall precursors of temperature-sensitive lysis mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **109**:326-35.
22. **Mengin-Lecreulx, D., B. Flouret, and J. van Heijenoort.** 1982. Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **151**:1109-17.
23. **Mizyed, S., A. Oddone, B. Byczynski, D. W. Hughes, and P. J. Berti.** 2005. UDP-N-acetylmuramic acid (UDP-MurNAc) is a potent inhibitor of MurA (enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase). *Biochemistry* **44**:4011-7.
24. **Nishida, S., K. Kurokawa, M. Matsuo, K. Sakamoto, K. Ueno, K. Kita, and K. Sekimizu.** 2006. Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **281**:1714-24.
25. **Nishihara, T.** 2002. Various morphological aspects of *Escherichia coli* lysis by two distinct RNA bacteriophages. *J Gen Virol* **83**:2601-6.
26. **Paradis-Bleau, C., F. Sanschagrín, and R. C. Levesque.** 2005. Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng Des Sel* **18**:85-91.
27. **Reddy, S. G., S. T. Waddell, D. W. Kuo, K. K. Wong, and P. D.L.** 1999. Preparative enzymatic synthesis and characterization of the cytoplasmic intermediates of murein biosynthesis. *J Am Chem Soc* **121**:1175-8.
28. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
29. **Schonbrunn, E., D. I. Svergun, N. Amrhein, and M. H. Koch.** 1998. Studies on the conformational changes in the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA). *Eur J Biochem* **253**:406-12.
30. **Smith, H. O., C. A. Hutchison, 3rd, C. Pfannkoch, and J. C. Venter.** 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174

- bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15440-5.
31. **Stemmer, W. P., A. Cramer, K. D. Ha, T. M. Brennan, and H. L. Heyneker.** 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **164**:49-53.
 32. **van Heijenoort, J.** 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**:25R-36R.
 33. **Walker, J. M.** 2002. *The protein protocols handbook*, 2nd ed. Humana Press, Totowa, N.J.
 34. **Wang, I. N.** 2006. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* **172**:17-26.
 35. **Webb, M. R.** 1992. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4884-7.
 36. **Wientjes, F. B., E. Pas, P. E. Taschner, and C. L. Woldringh.** 1985. Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **164**:331-7.
 37. **Winter, R. B., and L. Gold.** 1983. Overproduction of bacteriophage Q beta maturation (A2) protein leads to cell lysis. *Cell* **33**:877-85.
 38. **Young, I., I. Wang, and W. D. Roof.** 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* **8**:120-8.

TABLES

Table 1. Bacterial strains, bacteriophage and plasmids used in this study.

Bacterial strain, bacteriophage or plasmid	Genotype or description	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i>		
ElectroMaxDH10B	Electrocompetent cells	Invitrogen
D1204	F ⁻ <i>lacI</i> ^q proA ⁺ B ⁺	(Winter et Gold, 1983)
BL21 (λDE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^r)	Novagen
HMS174 (λDE3)	F ⁻ <i>recA hsdR</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) Rif ^r (DE3)	Novagen
ET505	W3110 <i>lysA::Tn10</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
ET505 (λDE3)	W3110 <i>lysA::Tn10</i> (DE3) (Tc ^r)	This study
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type prototrophic laboratory strain	(Holloway <i>et al.</i> , 1979)
Bacteriophage		
φX174	Wild-type; Félix d'Hérelle reference center for bacterial viruses	(Calendar, 1988)
Plasmids		
pOP203A ₂ ⁺	<i>A₂</i> gene in pOP203-3 vector; Tc ^r	(Winter et Gold, 1983)
pET24a-b	Cloning vectors; <i>ColE1</i> replicon; Km ^r	Novagen
pMON2301	<i>pI</i> gene in pET24b vector with C-terminal His•tag ; Km ^r	This study
pMON2306	<i>A₂</i> gene in pET24b vector with C-terminal His•tag ; Km ^r	This study
pACYCDuet-1	Cloning vector; <i>p15A</i> replicon; Cm ^r	Novagen
pMON2316	<i>pI</i> gene in pACYCDuet-1 vector with C-terminal His•tag; Cm ^r	This study

pMON2317	<i>A₂</i> gene in pACYCDuet-1 vector; Cm ^r	This study
pMON2318	<i>E</i> gene in pACYCDuet-1 vector with C-terminal S•tag; Cm ^r	This study
pMON3005	<i>murA</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> strain PAO1 in pET30b vector with C-terminal His•tag; <i>ColE1</i> replicon; Km ^r	(El Zoeiby <i>et al.</i> , 2001)
pMON3006	<i>murB</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> strain PAO1 in pET30b vector with C-terminal His•tag; <i>ColE1</i> replicon; Km ^r	(El Zoeiby <i>et al.</i> , 2001)
pMON3004	<i>murC</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> strain PAO1 in pET30b vector with C-terminal His•tag; <i>ColE1</i> replicon; Km ^r	(El Zoeiby <i>et al.</i> , 2003)
pMON3013	<i>murD</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> strain PAO1 in pET21a vector with C-terminal His•tag; <i>ColE1</i> replicon; Am ^r	(El Zoeiby <i>et al.</i> , 2001)
pMON3014	<i>murE</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> strain PAO1 in pET21a vector with C-terminal His•tag; <i>ColE1</i> replicon; Am ^r	(El Zoeiby <i>et al.</i> , 2001)
pMON3009	<i>murF</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> strain PAO1 in pET30b vector with C-terminal His•tag; <i>ColE1</i> replicon; Km ^r	(El Zoeiby <i>et al.</i> , 2001)
pET30c	Cloning vector; <i>ColE1</i> replicon; Km ^r	Novagen
pMON2319	<i>murG</i> gene from <i>P. aeruginosa</i> in pET30c vector; Km ^r	This study

Table 3. Cell wall and precursor labelling *in vivo*.

Strain	kcpm ^a								
	2 minutes ^b				20 minutes ^b				
	Cell wall	Nucleotide	Lipid	Cell wall	Nucleotide	Lipid	Cell wall	Nucleotide	Lipid
ET505 (λ DE3) pACYCDuet-1	2.4 \pm 1.6	1.9 \pm 0.3	0.10 \pm 0.01	224 \pm 15	17.0 \pm 0.7	0.4 \pm 0.2			
ET505 (λ DE3) pMON2316	7.0 \pm 5.5	2.3 \pm 1.3	0.2 \pm 0.1	97 \pm 17	7.4 \pm 3.3	3.5 \pm 1.3			
ET505 (λ DE3) pMON2317	2.8 \pm 2.9	1.6 \pm 0.9	0.04 \pm 0.05	29.0 \pm 1.8	1.2 \pm 0.2	0.30 \pm 0.07			
ET505 (λ DE3) pMON2318	0.3 \pm 0.3	1.4 \pm 0.7	0.04 \pm 0.02	2.8 \pm 1.2	3.9 \pm 1.4	0.2 \pm 0.1			

^a Values are means \pm SD of triplicate.

^b Measurements were done after a 2 or 20 minutes pulse-labelling period with ³H-DAP at 37°C.

Table 4. Specific activity of MurA, MurB and MurE. IC₅₀ and ratios values obtained for P1-mediated inhibition of MurA, MurB and MurE.

Enzyme	Specific activity (M g ⁻¹ min ⁻¹)	IC ₅₀ ^a (μM)	Ratio (enzyme : P1)
MurA	0,03	30 ± 10	1 : 2
MurB	2	210 ± 40	1 : 10,5
MurE	4	33 ± 5	1 : 825

^a Values are means ± SD of triplicate.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the synthetic gene construction of *pI*.

Figure 2. Bacterial growth curves of induced *E. coli* BL21 (λ DE3)pLysS carrying pET24b (●), pMON2306 (A_2 ; ▽) or pMON2301 (P1; ■), *E. coli* HMS174 (λ DE3) carrying pACYCDuet-1 (◇) or pMON2318 (E; ▲) cultures and expression of Q β A_2 , AP205 P1 and ϕ X174 E antibiotic proteins giving lytic activities.

Figure 3. Radioactivity incorporated into cell wall (A and B), nucleotides (C and D) and lipids intermediates (E and F) of *E. coli* ET505 (λ DE3) control or expressing A_2 , E or P1 proteins after pulse-labelling with [3 H]-DAP for 2 or 20 minutes.

Figure 4. Schematic representation of the gene dosage using *murA* to *murF* and *mraY* and *murG* genes cloned into pET24b (A) and the *E*, A_2 and *pI* lysis genes into pACYCDuet-1 (B) transformed into *E. coli* HMS174 (λ DE3) (C).

Figure 5. (A, B and C) Bacterial growth curves of *E. coli* HMS174 (λ DE3) cultures expressing one of the PG biosynthesis enzyme (●), a lysis protein (■) and both in the same host cell (▼). Survival ratios of *E. coli* HMS174 (λ DE3) expressing one of the PG biosynthesis enzyme and A_2 (D), E (E) or P1 (F) proteins.

Figure 6. IC₅₀ determinations for the P1 protein with MurA (A), MurB (B) and MurE (C) enzymes.

FIGURES

Figure1

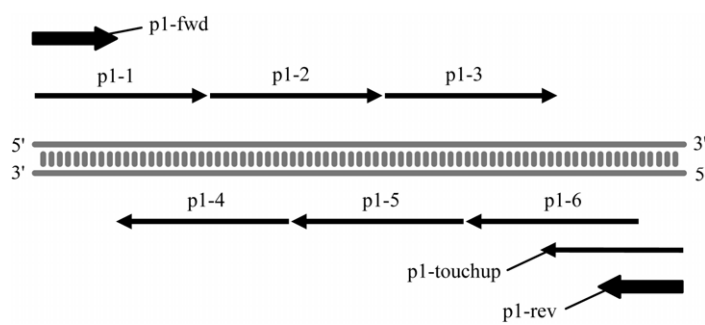


Figure2

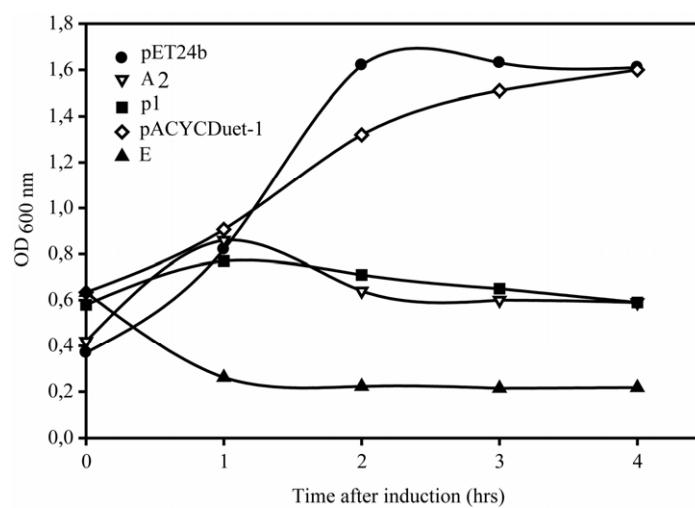


Figure3

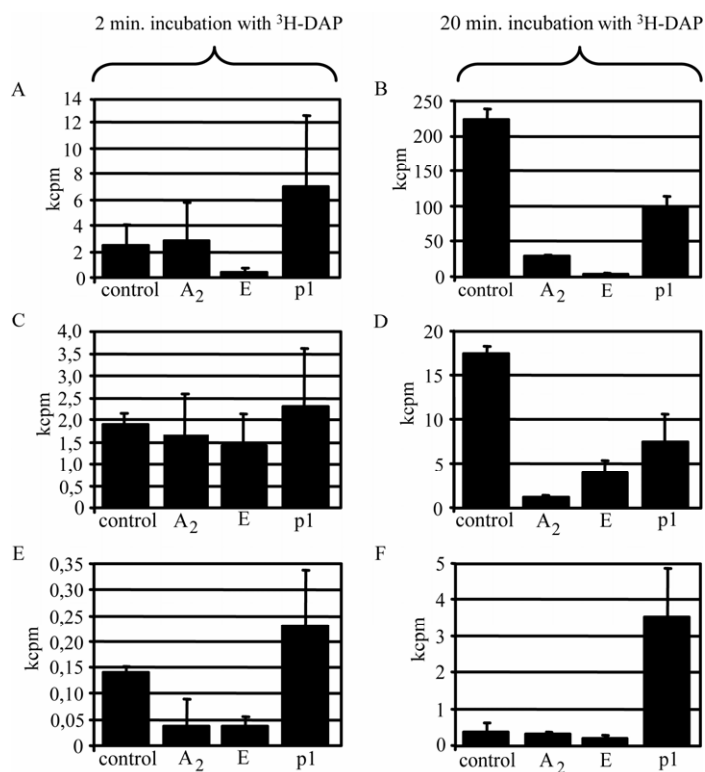


Figure4

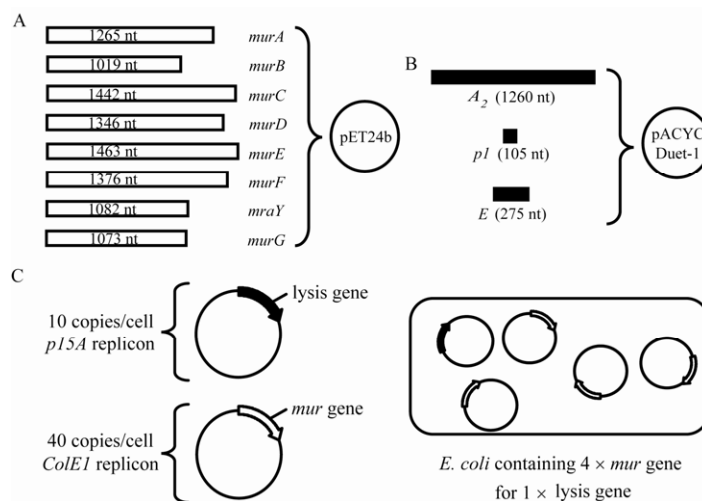


Figure 5

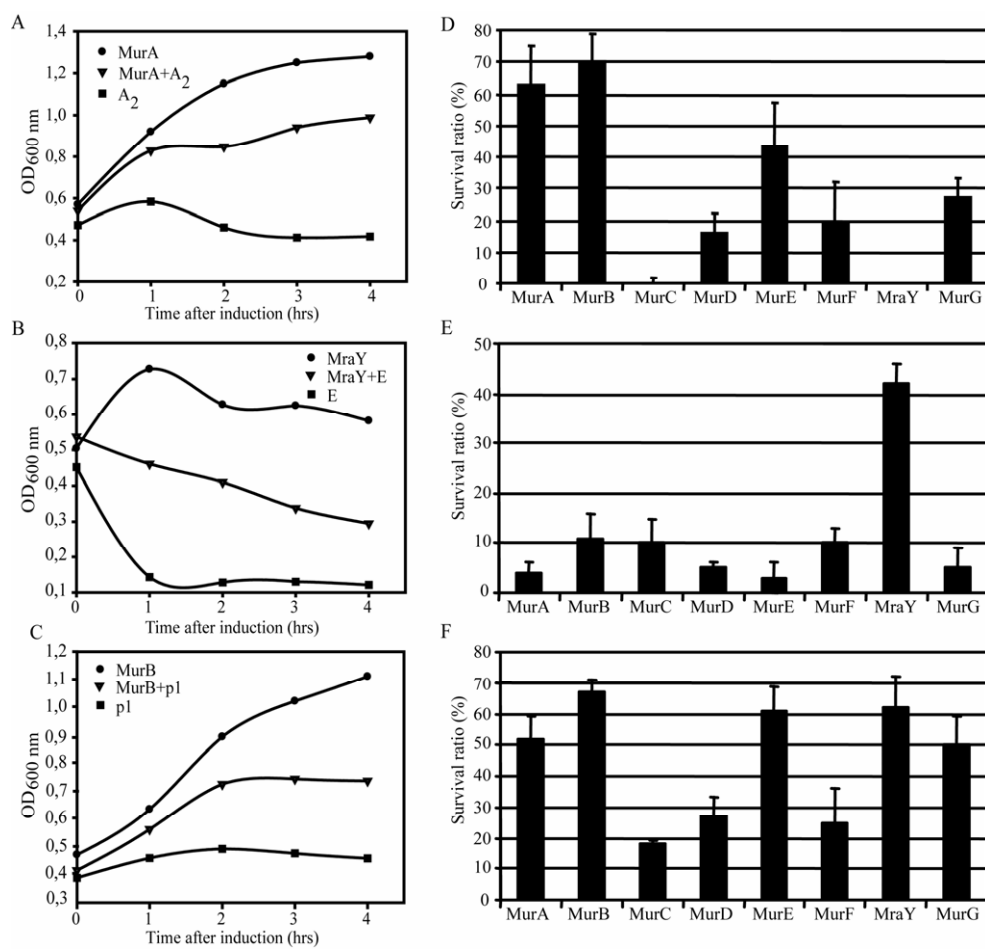
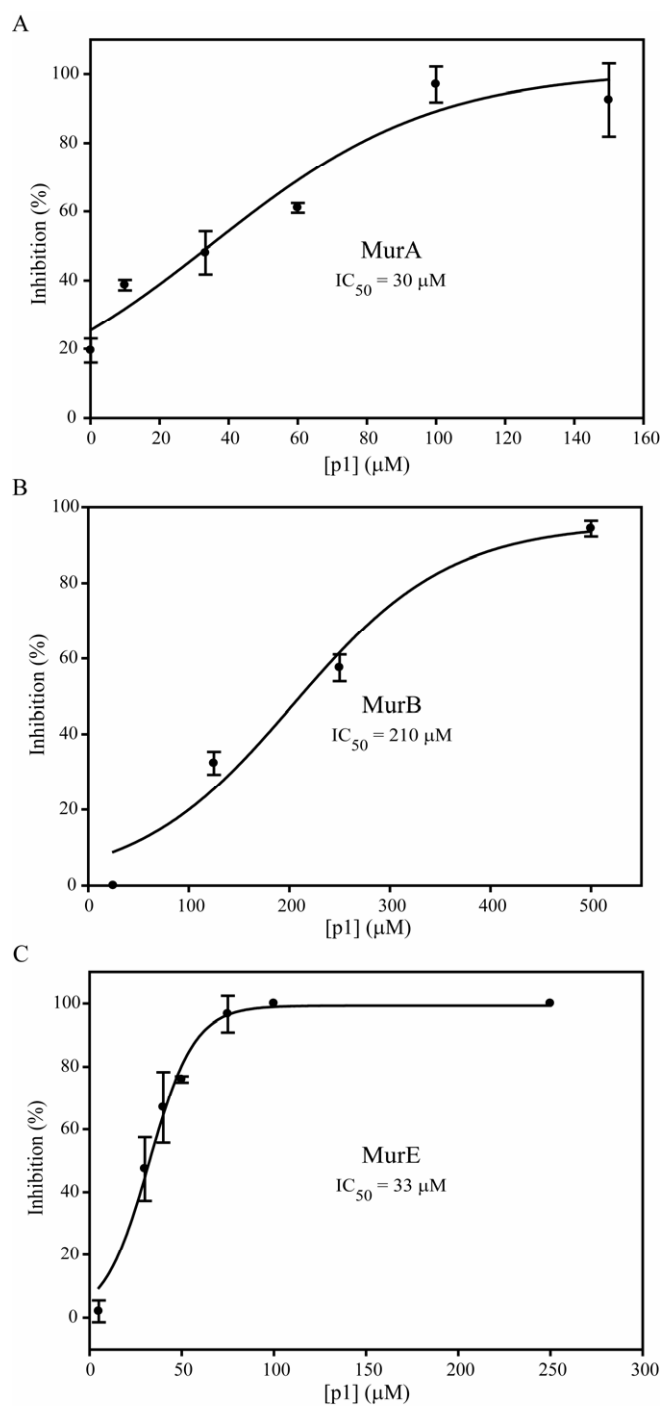


Figure 6



Chapitre 3 CONCLUSION

Afin de combler le manque de connaissances au sujet des mécanismes de lyse des bactériophages, nous avons fait la caractérisation moléculaire du mode d'action de la protéine de lyse P1 du phage AP205. Nous avons démontré que cette protéine inhibe la biosynthèse de la paroi bactérienne à plusieurs niveaux et qu'elle est un outil antimicrobien très prometteur.

Le gène *pl* a été synthétisé avec succès grâce à la méthode d'assemblage par PCR pour ensuite être cloné dans différents vecteurs d'expression. La surexpression de la protéine P1 chez *E. coli* entraîne la lyse bactérienne comme démontré précédemment (Klovins *et al.*, 2002). Les cibles potentielles de P1 ont été déterminées avec un essai *in vivo* de dosage de gène chez *E. coli*. La principale conclusion tirée de cet essai est que la protéine P1 cible plusieurs protéines impliquées dans la biosynthèse du PG. Effectivement, la protéine P1 cible les enzymes MurA, MurB, MurE, MraY et MurG. La caractérisation biochimique de l'inhibition des enzymes MurA, MurB et MurE a été faite au laboratoire à l'aide d'essais spectrophotométriques. L'inhibition des trois enzymes Mur n'est pas similaire en tous points. Tout d'abord, la protéine P1 n'inhibe pas les trois enzymes avec la même force. Il faut beaucoup plus de protéines P1 pour inhiber MurE que les deux autres enzymes. La meilleure inhibition a été observée avec MurA, suivi de près par MurB. Nous avons aussi constaté que P1 est un inhibiteur compétitif de MurE. La protéine compétitionne pour le site de liaison du Mg^{2+} , le cofacteur de l'enzyme. Cependant, aucune compétition n'a été notée avec MurA et MurB. L'inhibition de ces trois enzymes par la seule et même protéine peut sembler étrange à première vue. Par contre, ce n'est pas le premier cas d'inhibiteur ayant de multiples cibles dans la voie de biosynthèse du PG. En effet, quelques exemples ont été notés dans la littérature. Par exemple, différents inhibiteurs ont démontré de bonnes CI_{50} à la fois pour MurB, MurC et MurD (Li *et al.*, 2003). De plus, certaines similitudes relient les trois enzymes inhibées par la protéine P1. MurA et MurB reconnaissent pratiquement le même substrat. En fait, le groupement énoypyruvate est la seule différence entre les substrats de ces deux enzymes. De plus, il a été démontré que le substrat de MurB, le MurNAc, inhibe MurA (Mizyed *et al.*, 2005). Selon Mizyed *et al.*, le MurNAc est susceptible de se lier à MurA dans la même position et orientation que le GlcNAc et le GlcNAc-EP. En définitive, MurA et MurB doivent avoir des sites actifs très similaires qui

permettraient à P1 de reconnaître ces enzymes et de se lier aux environs des sites actifs. La préincubation de P1 avec chacune des enzymes pendant 30 min au lieu de 10 min n'a pas affecté l'inhibition. Nous en concluons donc que P1 n'est pas un inhibiteur dépendant du temps puisque l'équilibre des réactions est atteint rapidement. Pour ce qui est de l'inhibition de MraY et MurG par P1, les essais sont présentement en cours. Nous pouvons supposer que la protéine compétitionnera avec le Mg^{2+} pour son site de liaison comme dans le cas de MurE puisque ces enzymes nécessitent aussi ce cofacteur (Auger *et al.*, 2003; Bouhss *et al.*, 2004).

En conclusion, nous avons réussi à faire la caractérisation moléculaire du mécanisme d'action de la protéine antibiotique P1 du phage AP205 à la fois à l'aide d'une approche *in vitro* et *in vivo*. La protéine P1 est la première protéine de lyse phagique inhibitrice de plusieurs enzymes impliquées dans différentes étapes de la biosynthèse du PG. Par ces travaux, nous avons contribué à l'amélioration des connaissances au sujet des mécanismes de lyse des petits bactériophages et peut-être éventuellement au développement de nouveaux antimicrobiens.

En perspectives, il serait important de déterminer les constantes d'inhibition de P1 pour chaque enzyme, spécialement pour MurA et MurB afin de déterminer le type d'inhibition que P1 exerce sur ces enzymes. De plus, des études structure-fonction pourraient nous renseigner sur le mode de fonctionnement de P1. Par exemple, l'utilisation de la mutagenèse dirigée, de protéines P1 tronquées et de la cristallographie pourraient nous indiquer quelle est la séquence et les acides aminés essentiels à l'activité lytique de P1 en plus d'en apprendre sur sa structure tridimensionnelle. La cocrystallographie de la protéine P1 avec chacune des enzymes Mur inhibées pourrait aussi nous donner d'importants renseignements. Étant donné la charge nette positive de P1, il serait intéressant de vérifier s'il y a une quelconque interaction entre la protéine et les membranes lipidiques qui sont chargées négativement. Des essais avec des vésicules lipidiques pourraient nous en informer. En plus, de déterminer le spectre d'action cette protéine, il serait intéressant de vérifier son effet de l'extérieur de la bactérie. À plus long terme, j'espère que l'étude de

cette protéine pourra contribuer au développement d'une nouvelle classe d'antimicrobiens innovateurs.

Bibliographie

- Allen, N. E. and T. I. Nicas (2003). "Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics." FEMS Microbiol Rev **26**(5): 511-32.
- Arnold, H. P., U. Ziese, et al. (2000). "SNDV, a novel virus of the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus*." Virology **272**(2): 409-16.
- Auger, G., J. van Heijenoort, et al. (2003). "A MurG assay which utilises a synthetic analogue of lipid I." FEMS Microbiol Lett **219**(1): 115-9.
- Bentley, R. (2005). "The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic." Perspect Biol Med **48**(3): 444-52.
- Bernhardt, T. G., W. D. Roof, et al. (2000). "Genetic evidence that the bacteriophage phi X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4297-302.
- Bernhardt, T. G., W. D. Roof, et al. (2002). "The *Escherichia coli* FKBP-type PPIase SlyD is required for the stabilization of the E lysis protein of bacteriophage phi X174." Mol Microbiol **45**(1): 99-108.
- Bernhardt, T. G., D. K. Struck, et al. (2001). "The lysis protein E of phi X174 is a specific inhibitor of the *MraY*-catalyzed step in peptidoglycan synthesis." J Biol Chem **276**(9): 6093-7.
- Bernhardt, T. G., I. N. Wang, et al. (2001). "A protein antibiotic in the phage Qbeta virion: diversity in lysis targets." Science **292**(5525): 2326-9.
- Blasco, B., A. G. Pisabarro, et al. (1988). "Peptidoglycan biosynthesis in stationary-phase cells of *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(11): 5224-8.
- Boger, D. L. (2001). "Vancomycin, teicoplanin, and ramoplanin: synthetic and mechanistic studies." Med Res Rev **21**(5): 356-81.
- Bouhss, A., M. Crouvoisier, et al. (2004). "Purification and characterization of the bacterial *MraY* translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis." J Biol Chem **279**(29): 29974-80.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brandish, P. E., M. K. Burnham, et al. (1996). "Slow binding inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide-translocase (*Escherichia coli*) by mureidomycin A." J Biol Chem **271**(13): 7609-14.
- Brandish, P. E., K. I. Kimura, et al. (1996). "Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **40**(7): 1640-4.
- Breukink, E. and B. de Kruijff (2006). "Lipid II as a target for antibiotics." Nat Rev Drug Discov **5**(4): 321-32.
- Calendar, R. (1988). The Bacteriophages. New York, Plenum Press.
- Cavalleri, B., H. Pagani, et al. (1984). "A-16686, a new antibiotic from *Actinoplanes*. I. Fermentation, isolation and preliminary physico-chemical characteristics." J Antibiot (Tokyo) **37**(4): 309-17.

- Chandrakala, B., B. C. Elias, et al. (2001). "Novel scintillation proximity assay for measuring membrane-associated steps of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **45**(3): 768-75.
- Christensen, B. G., W. J. Leanza, et al. (1969). "Phosphonomycin: structure and synthesis." Science **166**(901): 123-5.
- Cohen, M. L. (2000). "Changing patterns of infectious disease." Nature **406**(6797): 762-7.
- Dieffenbach, C. W. and G. S. Dveksler (2003). PCR primer : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- El Ghachi, M., A. Bouhss, et al. (2004). "The bacA gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity." J Biol Chem **279**(29): 30106-13.
- El Zoeiby, A., F. Sanschagrín, et al. (2003). "Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries." J Antimicrob Chemother **51**(3): 531-43.
- El Zoeiby, A., F. Sanschagrín, et al. (2001). "In vitro reconstruction of the biosynthetic pathway of peptidoglycan cytoplasmic precursor in *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Lett **201**(2): 229-35.
- El Zoeiby, A., F. Sanschagrín, et al. (2003). "Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors." Mol Microbiol **47**(1): 1-12.
- El Zoeiby, A., M. Beaumont, et al. (2003). "Combinatorial enzymatic assay for the screening of a new class of bacterial cell wall inhibitors." Bioorg Med Chem **11**(7): 1583-92.
- Eschenburg, S., W. Kabsch, et al. (2003). "A new view of the mechanisms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (AroA) derived from X-ray structures of their tetrahedral reaction intermediate states." J Biol Chem **278**(49): 49215-22.
- Fauci, A. S. (2001). "Infectious diseases: considerations for the 21st century." Clin Infect Dis **32**(5): 675-85.
- Fischetti, V. A. (2005). "Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives." Trends Microbiol **13**(10): 491-6.
- Fujita, E., Y. Kourouku, et al. (2002). "Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells." Cell Death Differ **9**(10): 1108-14.
- Golmohammadi, R., K. Fridborg, et al. (1996). "The crystal structure of bacteriophage Q beta at 3.5 Å resolution." Structure **4**(5): 543-54.
- Grundling, A., M. D. Manson, et al. (2001). "Holins kill without warning." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9348-52.
- Heifetz, A., R. W. Keenan, et al. (1979). "Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase." Biochemistry **18**(11): 2186-92.
- Hendlin, D., E. O. Stapley, et al. (1969). "Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*." Science **166**(901): 122-3.
- Higgins, L. J., F. Yan, et al. (2005). "Structural insight into antibiotic fosfomycin biosynthesis by a mononuclear iron enzyme." Nature **437**(7060): 838-44.
- Holloway, B. W., V. Krishnapillai, et al. (1979). "Chromosomal genetics of *Pseudomonas*." Microbiol Rev **43**(1): 73-102.

- Inukai, M., F. Isono, et al. (1993). "Selective inhibition of the bacterial translocase reaction in peptidoglycan synthesis by mureidomycins." Antimicrob Agents Chemother **37**(5): 980-3.
- Johnson, B. A., H. Anker, F. L. Meleney (1945). "Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group." Science **102**(2650): 376-7.
- Karnik, S. and M. Billeter (1983). "The lysis function of RNA bacteriophage Qbeta is mediated by the maturation (A2) protein." EMBO J **2**(9): 1521-6.
- Klovins, J., G. P. Overbeek, et al. (2002). "Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages." J Gen Virol **83**(Pt 6): 1523-33.
- Krekel, F., C. Oecking, et al. (1999). "Substrate and inhibitor-induced conformational changes in the structurally related enzymes UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS)." Biochemistry **38**(28): 8864-78.
- Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, et al. (1979). "An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate." Anal Biochem **100**(1): 95-7.
- Lashley, F. R. (2003). "Factors contributing to the occurrence of emerging infectious diseases." Biol Res Nurs **4**(4): 258-67.
- Lazar, K. and S. Walker (2002). "Substrate analogues to study cell-wall biosynthesis and its inhibition." Curr Opin Chem Biol **6**(6): 786-93.
- Li, Z., G. D. Francisco, et al. (2003). "2-Phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis." Bioorg Med Chem Lett **13**(15): 2591-4.
- Lim, D., F. Sanschagrín, et al. (2001). "Insights into the molecular basis for the carbenicillinase activity of PSE-4 beta-lactamase from crystallographic and kinetic studies." Biochemistry **40**(2): 395-402.
- Liu, H., T. K. Ritter, et al. (2003). "Acceptor specificity and inhibition of the bacterial cell-wall glycosyltransferase MurG." Chembiochem **4**(7): 603-9.
- Lloyd, A. J., P. E. Brandish, et al. (2004). "Phospho-N-acetyl-muramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*: catalytic role of conserved aspartic acid residues." J Bacteriol **186**(6): 1747-57.
- Lugtenberg, E. J., L. De Haas-Menger, et al. (1972). "Murein synthesis and identification of cell wall precursors of temperature-sensitive lysis mutants of *Escherichia coli*." J Bacteriol **109**(1): 326-35.
- Marquardt, J. L., E. D. Brown, et al. (1994). "Kinetics, stoichiometry, and identification of the reactive thiolate in the inactivation of UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase by the antibiotic fosfomycin." Biochemistry **33**(35): 10646-51.
- Matsubishi, M., M. Wachi, et al. (1990). "Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins." Res Microbiol **141**(1): 89-103.
- Matsuzaki, S., M. Rashel, et al. (2005). "Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases." J Infect Chemother **11**(5): 211-9.
- Meleney, F. L. and B. A. Johnson (1949). "Bacitracin." Am J Med **7**(6): 794-806.
- Mengin-Lecreulx, D., B. Flouret, et al. (1982). "Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*." J Bacteriol **151**(3): 1109-17.
- Meroueh, S. O., K. Z. Bencze, et al. (2006). "Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4404-9.
- Ming, L. J. (2003). "Structure and function of "metalloantibiotics"." Med Res Rev **23**(6): 697-762.

- Ming, L. J. and J. D. Epperson (2002). "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." J Inorg Biochem **91**(1): 46-58.
- Mizyed, S., A. Oddone, et al. (2005). "UDP-N-acetylmuramic acid (UDP-MurNAc) is a potent inhibitor of MurA (enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase)." Biochemistry **44**(10): 4011-7.
- Navarre, W. W., H. Ton-That, et al. (1999). "Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity." J Biol Chem **274**(22): 15847-56.
- Nishida, S., K. Kurokawa, et al. (2006). "Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*." J Biol Chem **281**(3): 1714-24.
- Nishihara, T. (2002). "Various morphological aspects of Escherichia coli lysis by two distinct RNA bacteriophages." J Gen Virol **83**(Pt 10): 2601-6.
- Nishihara, T., H. Morisawa, et al. (2004). "A cryptic lysis gene near the start of the Qbeta replicase gene in the +1 frame." Genes Cells **9**(10): 877-89.
- Noda, Y., K. Yoda, et al. (1992). "TmrB protein, responsible for tunicamycin resistance of *Bacillus subtilis*, is a novel ATP-binding membrane protein." J Bacteriol **174**(13): 4302-7.
- Normark, B. H. and S. Normark (2002). "Evolution and spread of antibiotic resistance." J Intern Med **252**(2): 91-106.
- Ohki, R., K. Tateno, et al. (2003). "A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter." J Bacteriol **185**(1): 51-9.
- Paradis-Bleau, C., F. Sanschagrin, et al. (2005). "Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA." Protein Eng Des Sel **18**(2): 85-91.
- Prescott, L. M., D. A. Klein et J. P. Harley (1995). Microbiologie. Bruxelles.
- Reddy, V. S., P. Natarajan, et al. (2001). "Virus Particle Explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses." J Virol **75**(24): 11943-7.
- Rigsby, R. E., K. L. Fillgrove, et al. (2005). "Fosfomycin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily." Methods Enzymol **401**: 367-79.
- Roof, W. D. and R. Young (1995). "Phi X174 lysis requires slyD, a host gene which is related to the FKBP family of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases." FEMS Microbiol Rev **17**(1-2): 213-8.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., A. R. Coulson, et al. (1978). "The nucleotide sequence of bacteriophage phiX174." J Mol Biol **125**(2): 225-46.
- Scheffers, D. J. and M. G. Pinho (2005). "Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies." Microbiol Mol Biol Rev **69**(4): 585-607.
- Schonbrunn, E., D. I. Svergun, et al. (1998). "Studies on the conformational changes in the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA)." Eur J Biochem **253**(2): 406-12.
- Somner, E. A. and P. E. Reynolds (1990). "Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin." Antimicrob Agents Chemother **34**(3): 413-9.
- Stemmer, W. P., A. Cramer, et al. (1995). "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides." Gene **164**(1): 49-53.

- Tsuda, H., Y. Yamashita, et al. (2002). "Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*." Antimicrob Agents Chemother **46**(12): 3756-64.
- Tsvetanova, B. C., D. J. Kiemle, et al. (2002). "Biosynthesis of tunicamycin and metabolic origin of the 11-carbon dialdose sugar, tunicamine." J Biol Chem **277**(38): 35289-96.
- Tsvetanova, B. C. and N. P. Price (2001). "Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of tunicamycin-type antibiotics." Anal Biochem **289**(2): 147-56.
- van Heijenoort, J. (2001). "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." Glycobiology **11**(3): 25R-36R.
- Walker, J. M. (2002). The protein protocols handbook. Totowa, N.J., Humana Press.
- Walker, S., L. Chen, et al. (2005). "Chemistry and biology of ramoplanin: a lipoglycopeptide with potent antibiotic activity." Chem Rev **105**(2): 449-76.
- Walsh, C. (2000). "Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance." Nature **406**(6797): 775-81.
- Walsh, C. (2003). Antibiotics : actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.
- Walsh, C. (2003). "Where will new antibiotics come from?" Nat Rev Microbiol **1**(1): 65-70.
- Wang, I. N. (2006). "Lysis timing and bacteriophage fitness." Genetics **172**(1): 17-26.
- Webb, M. R. (1992). "A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4884-7.
- Weinbauer, M. G. (2004). "Ecology of prokaryotic viruses." FEMS Microbiol Rev **28**(2): 127-81.
- Wientjes, F. B., E. Pas, et al. (1985). "Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different *Escherichia coli* strains." J Bacteriol **164**(1): 331-7.
- Winter, R. B. and L. Gold (1983). "Overproduction of bacteriophage Q beta maturation (A2) protein leads to cell lysis." Cell **33**(3): 877-85.
- Witte, A., G. Schrot, et al. (1997). "Proline 21, a residue within the alpha-helical domain of phiX174 lysis protein E, is required for its function in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **26**(2): 337-46.
- Young, I., I. Wang, et al. (2000). "Phages will out: strategies of host cell lysis." Trends Microbiol **8**(3): 120-8.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-95.

ANNEXE A

Présentation sous forme d'affiche au 15th Annual Meeting of the Canadian Bacterial Diseases Network (CBDN) of excellence, Banff, Alberta, Canada, 2005.

Functional Genomics of Small Phage QBeta and AP205 Lysis Proteins for Development of Antibiotics and Inhibitors of Bacterial Cell Wall Biosynthesis. Carine Paquet-Bouchard, Catherine Paradis-Bleau, François Sanschagrin and Roger C. Levesque. Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Département Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada, G1K 7P4.

The *Microviridae*, *Leviviridae*, and *Alloleviridae*, which are lytic phage with small, single-stranded nucleic acid genomes, have only a single gene required for lysis and do not produce a muralytic activity. Hence, bacteriophages with small genomes can only afford to encode a single lysis protein. Two unrelated single protein lysis systems are known: the E protein from ϕ X174 inhibiting MraY and the A₂ from phage Q β inhibiting MurA. As a spin-off of our CBDN funded project studying cell wall biosynthesis *in vitro* and development of novel inhibitors, we have selected and acquired a collection of 31 small phages, initiated their growth and amplification on their respective bacterial hosts and selected 22 phages for the project. Bioinformatics analysis of the sequence of 13 phages has revealed their genomic organization including the presence of genes encoding lysis proteins. A search of databases indicated that 6 more partial phage genomic sequences were available, giving a total of 19 known genes encoding lysis proteins. Taking into consideration what is known about the biology of each phage, we aligned the 19 amino acid sequences according to their families and noted similarities and differences. These observations were further corroborated with a matrix identity and a pair wise comparison giving insight into their evolution via dendrogram analysis. Here, we focus on the phages QBeta and AP205. The gene encoding the A₂ 42 kDa lysis protein from phage QBeta was subcloned from pOP203A₂⁺ into *E. coli* BL21 (λ DE3, pLysS) using the pET24b plasmid vector system. A synthetic gene of 105 nucleotides encoding the 5 kDa AP205 phage lysis

protein was constructed *in vitro* using overlapping oligonucleotides in a streamlined gene assembly by PCR, and cloned into pET24b. A biological assay for testing the expression of these small lysis proteins was done by growing *E. coli* cells for 4 h and inducing protein expression with IPTG. Cell lysis was apparent after approximately 30 min and cells shown a rapid decrease in optical density. Analysis of the supernatant and remaining cells by gradient and triple stacking SDS-PAGE revealed both proteins. The availability of large amounts of pure biologically active AP and A2 will permit the development of HTS assay for MurA, MurB to MurF, MraY and MurG. Within CBDN, we entertain the possibility that analysis of several small phage genomes and bacterial *in vitro* cell wall synthesis coupled to functional genomics, via the study of lysis proteins from small phages, will assist in elucidating bacterial cell wall synthesis, identification of novel components implicated in its genetic regulation, and the development of new inhibitors and antibiotics.

ANNEXE B

Présentation sous forme d'affiche à la 7^{ième} Journée Annuelle de la Recherche de la Faculté de Médecine de l'Université Laval, Québec, Québec, Canada, 2005.

GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE DE PROTÉINES ANTIBIOTIQUES DE PETITS PHAGES INHIBITEURS DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA PAROI BACTÉRIENNE. PAQUET-BOUCHARD CARINE, Paradis-Bleau Catherine, Sanschagrin François, Levesque Roger C. Département de Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Qc, Canada. CREFSIP.

OBJECTIF : L'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques nécessite le développement de d'autres stratégies antimicrobiennes complémentaires aux antibiotiques. Il y a, entre autres, la stratégie qu'emploient les bactériophages ayant une activité bactéricide élevée. Les petits phages lytiques, tels que Q β et AP205, ayant pour génome un acide nucléique simple brin possèdent un seul gène nécessaire à la lyse bactérienne.

MÉTHODES : Nous avons aligné 19 séquences de protéines de lyse selon les familles et noté des similarités et des différences. Ces observations ont été corroborées avec une matrice d'identité, un alignement de séquences deux à deux et un dendrogramme a permis d'obtenir un aperçu de leur évolution phylogénétique. Le gène codant la protéine A2 (Q β) de 42 kDa a été souscloné dans pET24b et transformé dans *E. coli*. Un gène synthétique de 105 nucléotides, encodant la protéine AP (AP205) de 5 kDa, a été construit *in vitro* en utilisant des oligonucléotides chevauchants dans un assemblage PCR.

RÉSULTATS : L'expression des protéines recombinantes lytiques démontre, environ 30 minutes après induction, une lyse cellulaire suivie d'une baisse rapide de la densité optique. L'analyse des surnageants et des cellules par gels SDS-PAGE en gradient a révélé la présence des protéines A2 et AP.

CONCLUSION : La baisse rapide de densité optique traduit l'activité lytique bactéricide des protéines de lyse et leur disponibilité sous forme active permettra le développement d'un essai de criblage à haut débit pour les protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi bactérienne.

ANNEXE C

Présentation sous forme d'affiche au 5^{ième} symposium annuel du CREFSIP, Québec, Québec, Canada, 2005.

Inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne par des peptides antibiotiques d'origine phagique. Carine Paquet-Bouchard, Catherine Paradis-Bleau, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Département de Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Qc, Canada. CREFSIP.

L'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques nécessite le développement de d'autres stratégies antimicrobiennes complémentaires aux antibiotiques. Il y a, entre autres, la stratégie qu'emploient les bactériophages ayant une activité bactéricide élevée. Les petits phages lytiques possédant pour génome un acide nucléique simple brin, tels que Q β et AP205 ne possèdent qu'un seul gène nécessaire à la lyse bactérienne. Dans le cas de Q β , certaines évidences précises qu'il est inhibiteur de la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne. En effet, sa cible est MurA, la première protéine de la biosynthèse. Nous avons aligné 19 séquences de protéines de lyse selon les familles et noté des similarités et des différences. Ces observations ont été corroborées avec une matrice d'identité, un alignement de séquences deux à deux et un dendrogramme a permis d'obtenir une phylogénie de leur relation évolutive. Le gène codant la protéine A2 (Q β) de 42 kDa a été souscloné dans pET24b et transformé dans *E. coli*. Un gène synthétique de 105 nucléotides, encodant la protéine AP (AP205) de 5 kDa, a été construit *in vitro* en utilisant des oligonucléotides chevauchants dans un assemblage PCR. L'expression des protéines recombinantes lytiques démontre, environ 30 minutes après l'induction, une lyse cellulaire suivie d'une baisse rapide de la densité optique. L'analyse des surnageants et des cellules par gels SDS-PAGE en gradient a révélé la présence des protéines A2 et AP. La baisse rapide de densité optique traduit l'activité lytique bactéricide des protéines de lyse. Leur disponibilité sous forme active permettra le développement d'un essai de criblage à haut

débit pour les protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi bactérienne. L'étude des protéines de lyse des petits phages permettra le développement de nouveaux inhibiteurs et de nouveaux antibiotiques peptidiques.

ANNEXE D

Présentation sous forme d'affiche au 10th International *Pseudomonas* Meeting, Marseille, France, 2005.

Functional genomics of the *Pseudomonas aeruginosa* ϕ KZ and PP7 phage lysis proteins: development of phage therapy and cell wall inhibitors. Paradis-Bleau C, Paquet-Bouchard C, Cloutier I, Trépanier J, Sanschagrin F, Lemieux L, Garnier A, Auger M and Levesque RC*. CREFSIP, Pavillon C.E. Marchand, Faculté de Médecine, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4.

In the perspective to identify new antimicrobial agents targeting the integrity or biosynthesis of the peptidoglycan (PG) layer, we are studying lysis proteins of *P. aeruginosa* phages ϕ KZ and PP7. To promote host cell disruption, dsDNA phages normally use a holin to destabilise the internal membrane along with a PG degrading endolysin. Phages with SS nucleic acid genomes inhibit PG biosynthesis via a single lysis protein. The dsDNA ϕ KZ phage genome encodes an endolysin that was cloned, overexpressed and purified by FPLC, demonstrating oligomeric forms. PG hydrolysis from both Gram-negative and Gram-positive bacteria was measured by spectrophotometry. LCMS analysis with purified PG identified a lytic transglycosidase. Circular dichroism and calcein vesicles showed that the endolysin destabilised anionic lipid formed membranes. Thus, we propose that the ϕ KZ endolysin has bifunctional holin and PG hydrolytic activities. The ssRNA PP7 phage lysis protein of 6,3 kDa was obtained using RT-PCR. Cloning, expression and growth studies confirmed rapid cell lysis. We hypothesize, as for ϕ X174 and Q β inhibiting MurA and MraY, that PP7 lysis protein inhibits an essential enzyme in the PG biosynthesis pathway. Using an *in vitro* model of PG precursor biosynthesis with purified MurA to MurF enzymes, the PP7 phage lysis protein will be used to identify its target. The A2 lysis protein from ssRNA coliphage Q β inhibiting MurA and the E protein of ϕ X174 inhibiting MraY will be used in a complementation assay for gene dosage of MurA and MraY. To

find other potential targets, we are studying the ssRNA AP205 *Acinetobacter* phage lysis protein. A synthetic gene encoding the 5 kDa protein was constructed *in vitro* using overlapping oligonucleotides in a streamlined gene assembly by PCR. Cell lysis, similar to the PP7 lysis protein, was apparent after approximately 30 min. Analysis of phage lysis proteins will contribute to the phage therapy and to the development of new antibiotics against *P. aeruginosa* infections.

ANNEXE E

Présentation sous forme d'affiche à la 3^{ième} édition du concours de vulgarisation scientifique Lab-oratoire public, Québec, Québec, Canada, 2005.

La thérapie par les bactériophages, la solution aux infections bactériennes? Carine Paquet-Bouchard, Catherine Paradis-Bleau, François Sanschagrín et Roger C. Levesque. CREFSIP, Pavillon C.E. Marchand, Faculté de Médecine, Université Laval

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques et des infections bactériennes représente une problématique préoccupante en santé publique. Afin de développer une thérapie antibactérienne alternative aux antibiotiques, notre recherche s'intéresse aux bactériophages: de petits virus s'attaquant seulement aux bactéries. L'objectif de ce projet est de comprendre le mode d'action des armes antibactériennes produites par les bactériophages nommés ϕ KZ, PP7 et AP205. Ces armes détruisent la paroi bactérienne qui est essentielle à la survie de la bactérie. Cette paroi est comparable à un mur entourant et protégeant les bactéries. En effet, les bactéries meurent si leur paroi est détruite ou défectueuse. Les résultats démontrent que les bactériophages étudiés utilisent des stratégies différentes pour tuer les bactéries en attaquant leur paroi. En conclusion, les armes antibactériennes des bactériophages ϕ KZ, PP7 et AP205 permettront de combattre des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* qui causent de multiples infections intraitables et mortelles.

ANNEXE F

Présentation sous forme d'affiche au 6^{ième} symposium annuel du CREFSIP, Québec, Québec, Canada, 2006.

Inhibition des enzymes MurA, MurB et MurE de la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne par la protéine P1 du phage AP205. Carine Paquet-Bouchard, François Sanschagrin, Catherine Paradis-Bleau, Roger C. Levesque. Département de biologie médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Qc, Canada, CREFSIP.

L'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques nécessite le développement d'autres stratégies complémentaires aux antibiotiques. C'est pourquoi nous étudions les stratégies qu'emploient les bactériophages ayant une activité bactéricide élevée. Entre autres, un mécanisme de lyse connu est celui des petits phages lytiques nécessitant un seul gène pour la lyse bactérienne, tels que Q β , ϕ X174 et AP205. Dans le cas de Q β , sa protéine de lyse A2 est inhibitrice de MurA, la première enzyme impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane (PG). Le phage ϕ X174 code pour la protéine E qui inhibe la translocase MraY de la biosynthèse du PG. Nous avons choisi de caractériser le mécanisme de lyse du phage AP205 qui lyse *Acinetobacter* avec la protéine P1.

Nous avons utilisé les protéines de lyse des phages Q β et ϕ X174 comme contrôles. Les protéines A2 et E ont été sous clonées dans pET24b, surexprimées chez *E. coli* et visualisées sur gel SDS-PAGE. Le gène encodant la protéine P1 de 35 acides aminés a été construit *in vitro* en utilisant des oligonucléotides se chevauchant dans un assemblage PCR. Après clonage moléculaire dans pET24b et transformation chez *E. coli*, la protéine a été surexprimée. La surproduction des trois protéines lytiques chez *E. coli* entraîne une lyse cellulaire caractérisée par une baisse de densité optique à 600 nm. Des essais de dosage de gène ont été effectués avec P1 afin de déterminer la cible de la protéine. Plusieurs cibles potentielles ont été obtenues : MurA, MurB, MurE, MurG et MraY. Des essais enzymatiques avec les enzymes MurA, MurB et MurE ont permis de déterminer des CI50

de 40 μM (ratio protéine : P1 de 1 : 2,5), 200 μM (ratio 1 : 10) et 30 μM (ratio 1 : 750) ont été obtenus, respectivement. Les tests d'inhibition pour les enzymes MurG et MraY restent à faire. Nous avons caractérisé le mécanisme de lyse de AP205 qui cible la biosynthèse du PG.