

CATHERINE PARADIS-BLEAU

**DÉVELOPPEMENT ACCÉLÉRÉ DE NOUVEAUX
INHIBITEURS CONTRE LES PROTÉINES DE
DIVISION CELLULAIRE FTSZ ET FTSA DE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

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

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

AOÛT, 2003

Résumé

L'impact des infections bactériennes couplé à l'émergence des mécanismes de résistance aux antibiotiques suscite un besoin urgent de nouvelles classes d'agents antibactériens. D'ailleurs, la résistance du pathogène opportuniste *P. aeruginosa* diminue l'efficacité de traitement et met en danger la vie des personnes infectées. Dans le but d'identifier de nouveaux antimicrobiens, nous exploitons la machinerie de division cellulaire bactérienne en tant que cible. Ainsi, les protéines de division cellulaire FtsZ et FtsA de *P. aeruginosa* ont été utilisées afin d'identifier des inhibiteurs protéiques spécifiques à l'aide de la technique de présentation phagique. Nous avons identifié des peptides détenant une affinité pour les enzymes FtsZ et FtsA puis nous avons caractérisé 3 peptides inhibiteurs de l'activité GTPase de FtsZ. Le peptidomimétisme devrait permettre le développement d'une nouvelle classe d'agents antimicrobiens à partir de ces peptides.

Catherine Paradis-Bleau
Étudiante

Roger C. Levesque
Directeur

Abstract

The impact of bacterial infections and emergence of antibiotic resistance led to a serious need to develop new class of antibacterials. The acute resistance of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* lowers the treatment efficiency of infected cystic fibrosis patients and immuno-compromised individuals. In the perspective of finding new antimicrobial agents, we are using the bacterial cell division machinery of as a new target. Thus, *P. aeruginosa* cell division proteins FtsZ and FtsA have been used to identify inhibitory peptides with the phage-display technique. We identified FtsZ and FtsA tight binding peptides and we characterized three inhibitory peptides of FtsZ GTPase activity. Peptidomimetism will allow the development of new antimicrobial agents with these leader peptides.

Catherine Paradis-Bleau
Étudiante

Roger C. Levesque
Directeur

Avant-Propos

Un de mes principaux objectifs de vie consiste à aider les gens. Je souhaite apporter un peu de lumière et d'espoir aux gens qui en ont le plus besoin. Ainsi, j'espère que les travaux de recherche effectués au cours de ma maîtrise apporteront un jour une meilleure qualité de vie aux patients atteints de fibrose kystique ainsi qu'aux personnes immunodéprimées souffrant d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa*. Je souhaite que les perspectives de mes travaux de recherche soient entreprises et je serais extrêmement heureuse de voir surgir sur le marché pharmaceutique des antimicrobiens inhibant la division cellulaire bactérienne. Cependant, mon accomplissement personnel dépendra de l'accessibilité de ces nouveaux antimicrobiens. Je crois que les médicaments devraient être accessibles à tous et que le capitalisme nous pousse à oublier nos vraies valeurs humaines. Les personnes les plus démunies financièrement éprouvent un plus grand besoin de médicaments et nous ne devrions pas choisir de les laisser souffrir afin d'épargner des coûts aux plus riches. La recherche ne devrait pas rimer avec égoïsme, rivalité et possession mais avec collaboration et entraide. Ainsi, je souhaite poursuivre mes travaux au doctorat dans cette optique et j'espère qu'ils participeront à changer les mentalités et à diminuer la souffrance.

Je voudrais tout d'abord souligner l'aide précieuse de ma famille qui m'encourage et me supporte depuis maintenant 24 ans. Je remercie mes parents Hélène Paradis et Gilles Bleau qui m'ont guidée, appuyée et réconfortée tout au long de mes études. Je suis très reconnaissante des valeurs qu'ils m'ont véhiculées. Je voudrais également remercier mon frère Simon Paradis-Bleau qui est toujours présent et disponible pour moi. Il s'est beaucoup intéressé à mon projet de recherche et m'a supporté. Je remercie mes beaux-parents Céline Bergeon et Michel-Jaques Trottier pour leur appui et leurs encouragements.

Je ne pourrais passer sous silence le soutien constant et essentiel de Mathieu Allaire. Il a su vivre avec moi les hauts et les bas de ma maîtrise et je lui en suis très reconnaissante. Je suis persuadée que mes études ne se seraient pas si bien déroulées sans son écoute constante, ses conseils, sa confiance et sa compréhension. Mathieu m'a énormément aidé au plan personnel et il a également pris le temps de me donner son avis sur le plan scientifique.

Je tiens à remercier spécialement le Dr Roger C. Levesque et cela pour plusieurs raisons. Premièrement, le Dr Levesque a accepté de me rencontrer puis de me faire confiance et de croire en moi en m'accueillant dans son laboratoire. Il a su prendre le temps et les outils nécessaires afin de bien m'encadrer et de me supporter tout au long de ma maîtrise. Il m'a également conféré sa passion pour la division cellulaire qui m'a poussée à vouloir me dépasser. J'ai également hérité de son plaisir et de son amusement à faire de la recherche scientifique. Je remercie Roger C. Levesque pour la qualité de vie qu'il m'a permis d'avoir tous les jours au laboratoire. Finalement, le Dr Levesque m'a permis de réaliser des études de deuxième cycle extrêmement intéressantes et enrichissantes. J'ai appris à faire de la recherche, à développer des idées et à les mettre en pratique puis je possède maintenant plusieurs de techniques de pointe qui vont me permettre d'amorcer une belle carrière scientifique.

Je veux sincèrement remercier le Dr François Sanschagrin qui m'a fourni un support et une aide constante tous les jours de ma maîtrise. Il m'a enseigné les rudiments de la recherche de la revue de littérature à la rédaction en passant par le raisonnement scientifique et les techniques de biologie moléculaire, génomique bactérienne et de bioinformatique. Je dois une fière chandelle à François Sanschagrin et je n'aurais pas vécu une maîtrise de cette qualité sans sa compétence et son soutien scientifique et personnel.

Finalement, je tiens à souligner l'importance de l'ambiance amicale qui règne au laboratoire et qui m'a permis d'être heureuse au quotidien. Ainsi, je voudrais remercier tous les membres de l'équipe du Dr Levesque. Je remercie Dr Dario Lehoux et Dr Ahmed El Zoeby pour leur aide et leurs encouragements. Je tiens également à remercier Mélanie Beaumont et la jeune mère Iréna pour leur joie de vivre et leur compréhension. Un merci spécial va à Eric Potvin pour ses nombreux conseils scientifiques et son attention. Finalement, je remercie Karine L. Richard pour sa présence, sa complicité et sa joyeuse personnalité.

*À mon frère Simon Paradis-Bleau
en souhaitant que la vie te sourisse à
nouveau*

Table des matières

Chapitre 1. Introduction.....	11
1. Les infections bactériennes.....	12
1.1 Situation actuelle.....	12
1.1.1 Épidémiologie des infections bactériennes.....	12
1.1.2 L'émergence et la réémergence.....	13
1.2 Les infections nosocomiales.....	16
1.2.1 Le cas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.2.1.1 Caractéristiques générales.....	16
1.2.1.2 Implication en pathogénie.....	17
1.2.1.3 Génomique.....	19
1.2.1.4 Validation en tant que modèle d'étude.....	20
2. La résistance aux antibiotiques.....	21
2.1 L'évolution de la résistance.....	22
2.1.1 L'émergence de la résistance.....	22
2.1.2 Acquisition et mécanismes de résistance.....	22
2.1.3 Facteurs responsables de l'augmentation de la résistance.....	24
2.2 La résistance aujourd'hui.....	25
2.2.1 Ampleur du problème.....	25
2.2.2 Solutions possibles.....	26
3. Développement de nouveaux antimicrobiens.....	27
3.1 Méthodes traditionnelles.....	27
3.1.1 Criblage d'antibiotiques naturels.....	27
3.1.2 Blocage des mécanismes de résistance.....	28
3.2 Chimie combinatoire.....	28
3.2.1 Modification d'antibiotiques connus.....	28
3.2.2 Synthèse de banques de molécules.....	29
3.2.3 Synthèse organique sur mesure.....	30
3.3 Recherche de nouvelles cibles.....	31
3.3.1 La division cellulaire bactérienne.....	32
3.3.1.1 Vue d'ensemble.....	32
3.3.1.1.1 Protéines impliquées.....	32
3.3.1.1.2 Ordre spatial et temporel des événements.....	33
3.3.1.2 FtsZ.....	34
3.3.1.2.1 Conservation dans l'évolution.....	35
3.3.1.2.2 Caractéristiques structurales.....	35
3.3.1.2.3 Activité enzymatique.....	36
3.3.1.2.4 Régulation spatiale et temporelle de FtsZ.....	36
3.3.1.2.5 Fonction structurale de polymérisation.....	37
3.3.1.2.6 Constriction de l'anneau FtsZ.....	39
3.3.1.2.7 Inhibiteurs endogènes.....	40
3.3.1.3 FtsA.....	40
3.3.1.3.1 Conservation dans l'évolution.....	40
3.3.1.3.3 Structure tridimensionnelle.....	40

3.3.1.3.2	Activité ATPase.....	41
3.3.1.3.4	Localisation cellulaire.....	41
3.3.1.3.5	Fonction structurale de stabilisation de l'anneau FtsZ.....	42
3.3.1.3.6	Interaction avec PLP3.....	42
3.3.1.3.7	FtsA en tant que protéine motrice.....	42
3.3.1.4	Interaction FtsZ-FtsA.....	43
3.3.1.4.1	Ratio FtsZ :FtsA.....	43
3.3.1.4.2	Nature de l'interaction.....	44
3.3.1.4.3	Séquences impliquées.....	45
3.3.1.5	Caractéristiques de FtsZ et de FtsA en tant que cible.....	45
3.4	La présentation phagique.....	46
3.4.1	Principe de la technique.....	46
3.4.2	Pouvoirs et limitations.....	47
3.4.3	Applications.....	48
3.4.3.1	Peptides inhibiteurs.....	48
3.4.3.2	Modifications chimiques et peptidomimétisme.....	48
4.	Mise en situation du projet de recherche.....	50
4.1	Problématique.....	50
4.2	Hypothèse et objectifs.....	50
4.3	Résumé de la méthodologie.....	50
Chapitre 2	Résultats et discussion.....	52
	Contribution des auteurs.....	53
	Résumé.....	54
	Abstract.....	57
	Introduction.....	58
	Materials and methods.....	60
	Results.....	73
	Discussion.....	78
	Acknowledgements.....	86
	References.....	87
	Figure legends.....	93
Chapitre 3	Conclusion.....	102

Liste des tableaux

Table 1. Determination of relative affinity of selected phages against FtsZ by ELISA. Results are indicated as a ratio of specific/ non-specific phages.	91
Table 2. Determination of relative affinity of selected phages against FtsA by ELISA. Results are indicated as a ratio of specific/ non-specific phages.	92

Liste des figures

Figure 1. Facteurs favorisant le déclin des infections bactériennes au 20 ^e siècle (Cohen 2000).	13
Figure 2. Distributions géographiques des sites d'origine des maladies infectieuses émergentes et réémergentes (Fauci 2001).	14
Figure 3. Facteurs favorisant l'émergence et la réémergence des infections bactériennes (Cohen 2000).	15
Figure 4. Observation de <i>P. aeruginosa</i> en microscopie confocale (http://www.pseudomonas.com/whos_involved.html).	17
Figure 5. Principaux facteurs favorisant la colonisation pulmonaire des patients atteints de fibrose kystique par <i>P. aeruginosa</i> (Davies 2002).	18
Figure 6. Principales cibles des 4 grandes classes d'antimicrobiens (Walsh 2003).	21
Figure 7. Mécanismes généraux de la résistance bactérienne aux antibiotiques (http://images.google.ca/imgres?imgurl=images.medscape.com/pi/editorial/cmecircle/2002/1692/kollef/slide03.gif&imgrefurl=http://www.medscape.com).	24
Figure 8. Représentation de la chimie combinatoire dynamique (Lehn and Eliseev 2001).	30
Figure 9. Quelques exemples de cibles bactériennes (Breithaupt 1999).	31
Figure 10. Photographies de bactéries viables à 30°C et de bactéries filamenteuses à la température non permissive de 42°C (Pichoff and Lutkenhaus 2002).	33
Figure 11. Recrutement protéique séquentiel essentiel à la division cellulaire bactérienne (Pichoff and Lutkenhaus 2002).	33
Figure 12. Représentation dynamique du divisosome bactérien et de la constriction de l'anneau de division.	34
Figure 13. Structure cristalline de FtsZ de <i>Methanococcus jannaschii</i> résolue à 2.8 Angström illustrant la conformation de FtsZ; les tubes rouges représentent les hélices α alors que les feuillets β sont en jaune et les boucles en vert, le site actif referme l'ATP et le cofacteur magnésium schématisés au centre de la figure. (Lowe and Amos 1998).	35
Figure 14. Sélection du site de formation du septum par le système MinCDE (www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/JYL/MinC%20&%20MinD/MinCDE.pict.jpg).	37
Figure 15 Représentation des modèles de polymérisation (A) coopératif et (B) isodesmique (Romberg, Simon et al. 2001).	38
Figure 16. Représentation schématique de la polymérisation et de la constriction de l'anneau FtsZ (Lutkenhaus and Addinall 1997).	39
Figure 17. Structure cristalline de FtsA de <i>Thermotoga maritima</i> résolue à 1.9 Angström; les tubes rouges représentent les hélices α alors que les feuillets β apparaissent en jaune et les boucles en vert, le site actif présent au centre de la figure renferme l'ATP représenté par la molécule grise ainsi que le cofacteur magnésium schématisé par la sphère mauve (van den Ent and Lowe 2000).	41
Figure 18. Structure de la paroi des bactéries (A) à Gram négatif composée d'une membrane interne et d'une membrane externe séparées par une mince couche de peptidoglycan et (B) à Gram positif constituée d'une membrane interne et d'une épaisse couche de peptidoglycan	

(uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/gramneg.gif&imgrefurl=http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html).	44
Figure 19. Schéma expérimental de la présentation phagique.....	46
Figure 20. Représentation schématique d'une ronde de biocriblage.....	47
Figure 21. Schéma expérimental résumant la méthodologie.....	51

Chapitre 1.

Introduction

1. Les infections bactériennes

1.1 Situation actuelle

1.1.1 Épidémiologie des infections bactériennes

Les maladies infectieuses sont responsables de 45 % des décès dans les pays à faibles revenus et de presque une mortalité prématurée sur deux dans le monde entier. Environ 90 % de ces décès peuvent être attribués à six maladies; soit les infections respiratoires aiguës prédominées par la pneumonie, les maladies diarrhéiques, le VIH/SIDA (Virus d'Immunodéficience Humaine/Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise), la tuberculose, le paludisme et la rougeole (Prentice 2000). Les infections bactériennes responsables de la pneumonie, des maladies diarrhéiques et de la tuberculose causent 9 millions de décès sur les 13 millions occasionnés par les maladies infectieuses. Ainsi, les infections bactériennes représentent 70 % des cas de mortalité causés par les microorganismes (Walsh 2003). Selon le NIH (National Institute of Health), les maladies infectieuses représentent la seconde cause de décès et la première cause de perte d'années de vie productives à travers le monde (Fauci 2001). L'importance des infections d'origine bactérienne n'est donc plus à démontrer. De plus, les changements sociaux et technologiques combinés à l'évolution bactérienne favorisent l'émergence de nouveaux pathogènes tel *Escherichia coli* 0157:H7 ainsi que la réémergence d'infections anciennement contrôlées comme la tuberculose. Les infections bactériennes méritent donc d'attirer l'attention du grand public, des chercheurs académiques, des compagnies pharmaceutiques et du gouvernement (Cohen 2000).

1.1.2 L'émergence et la réémergence

Plusieurs facteurs ont contribué à diminuer l'impact des infections bactériennes et à augmenter l'espérance de vie au cours du 20^e siècle tel que résumé par la figure 1. La longue évolution conjointe des bactéries pathogènes et de l'être humain a entraîné une diminution de susceptibilité de l'hôte grâce à la sélection naturelle. Par la suite, la conscientisation de la population a amoindri la transmission via une meilleure hygiène, une alimentation plus sécuritaire et l'aménagement d'organisations sanitaires. Finalement, l'avenue des vaccins et antibiotiques a augmenté l'espérance de vie de 47 à 76 ans de 1900 à 1997 dans les pays développés (Cohen 2000).

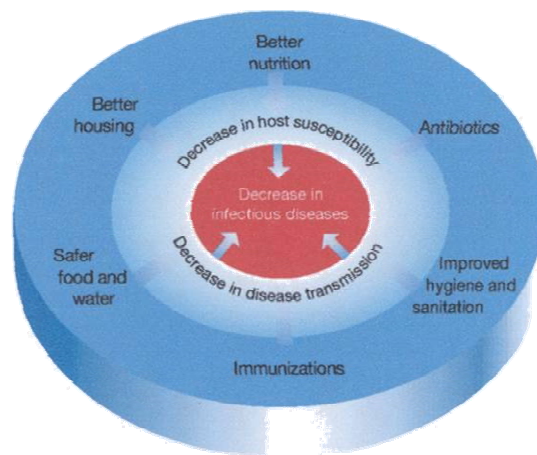


Figure 1. Facteurs favorisant le déclin des infections bactériennes au 20^e siècle (Cohen 2000).

Suite à cette diminution importante de l'incidence et de la gravité des maladies infectieuses, la recherche sur la prévention et le traitement de ces infections a été dévalorisée. Convaincues de détenir un arsenal suffisant pour éliminer toutes infections, les compagnies pharmaceutiques ont réduit leurs activités de recherche et de développement d'antibiotiques. Les générations suivantes ont sous-estimé le pouvoir évolutif des bactéries pathogènes et ont véhiculé une attitude de négligence et de confiance aveugle envers les antibiotiques. Cela a grandement favorisé l'émergence et la réémergence des infections bactériennes qui évoluent sur l'ensemble de la planète tel que démontré sur la figure 2 (Fauci 2001).

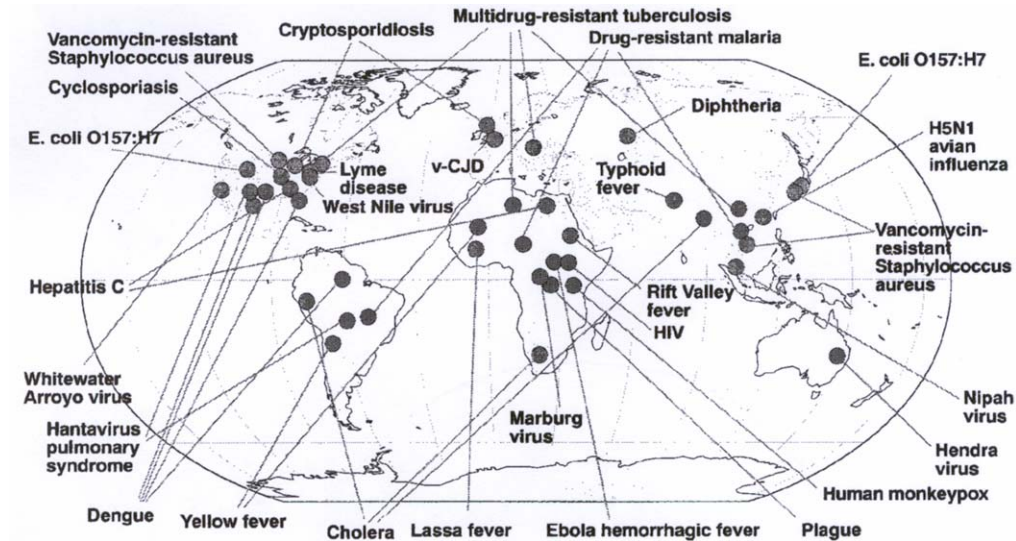


Figure 2. Distributions géographiques des sites d'origine des maladies infectieuses émergentes et réémergentes (Fauci 2001).

Une étude récente relate six facteurs principaux à la source de ce phénomène résumés par la figure 3. L'émergence et la réémergence découlent des changements sociaux et technologiques qui augmentent la susceptibilité des populations et favorisent la transmission des pathogènes. Les changements démographiques incluent des facteurs qui favorisent la transmission des infections tels que l'augmentation des situations familiales précaires qui entraînent de plus grandes charges en garderies, les voyages et l'immigration de populations hautement à risque, les relations sexuelles dangereuses et la prise de drogue par intraveineuse. Ils comprennent également les facteurs augmentant la susceptibilité de la population tel que le vieillissement, la malnutrition ou l'obésité ainsi que l'augmentation de l'incidence des maladies non infectieuses comme le cancer et les maladies auto-immunes. De plus, les avancées technologiques et médicales éliminent le processus de sélection naturelle en permettant aux malades de survivre plus longtemps et de se reproduire. Ainsi, les maladies infectieuses et génétiques se propagent davantage dans une population d'hôtes de plus en plus susceptibles. En fait, les technologies médicales comme la transplantation d'organes et la chimiothérapie créent des conditions propices à l'émergence de nouvelles maladies chez les patients les plus vulnérables. Même les avancées technologiques mineures comme les tampons super absorbants et les chaînes de restauration rapide favorisent l'émergence de pathologies comme le syndrome du choc toxique et la maladie du hamburger. Au point de vue environnemental, les changements climatiques tels que le réchauffement de la planète et le déboisement de la forêt tropicale contribuent grandement

à ce phénomène. Finalement, l'évolution des pathogènes bactériens via l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence et la résistance aux antibiotiques amplifient grandement l'émergence et la réémergence (Cohen 2000).

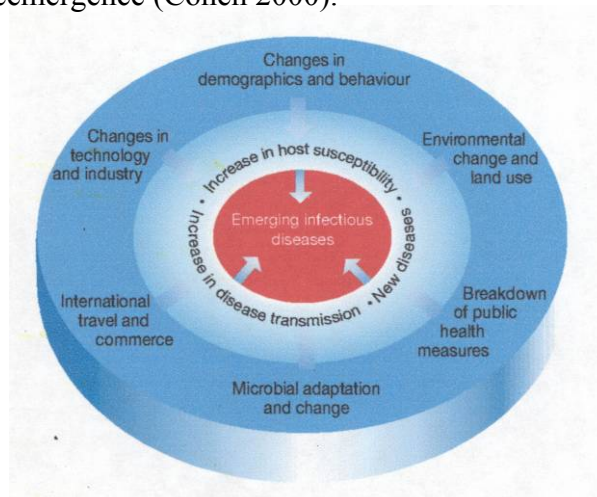


Figure 3. Facteurs favorisant l'émergence et la réémergence des infections bactériennes (Cohen 2000).

Ironiquement, des facteurs favorisant le déclin d'une maladie peuvent contribuer à en amplifier une autre et cela rend la problématique extrêmement complexe. Par exemple, l'avènement de la réfrigération a permis d'inhiber la croissance de la majorité des pathogènes alimentaires en augmentant la qualité microbiologique des aliments. Cependant, cela confère un avantage sélectif aux bactéries qui possèdent la capacité de croître à 4°C comme les espèces des genres *Listeria* et *Yersinia* (Cohen 2000). De plus, plusieurs maladies chroniques présumées non infectieuses s'avèrent directement ou indirectement liées à des microorganismes pathogènes. Les ulcères et carcinomes gastriques constituent un bon exemple car ils découlent principalement d'une infection à *Helicobacter pylori* (Fauci 2001). En perspective, les facteurs favorisant l'émergence des infections bactériennes ne vont que s'amplifier dans les prochaines années. Ainsi, il s'avère important de mettre en place des programmes de santé internationaux pour surveiller l'émergence et la réémergence de maladies infectieuses, d'entreprendre des recherches, de raffiner les différents systèmes de santé publique et de développer des stratégies d'intervention afin de diminuer la susceptibilité des populations puis de prôner une utilisation adéquate des antimicrobiens (Cohen 2000). Enfin, la recherche sur les maladies infectieuses devrait occuper une place prédominante au 21^e siècle dans les pays développés et en développement. Plus que jamais, la conscience des conséquences reliées aux infections

bactériennes sur l'état de santé globale, l'économie, la stabilité politique et le bioterrorisme augmente le support financier accordé aux recherches. Combiné aux récentes avancées technologiques comme le séquençage des génomes humains et bactériens, cela permet d'excellentes opportunités de recherche sur les causes de la prédisposition aux infections, sur la pathogénie bactérienne ainsi que sur le développement de nouvelles stratégies de défense contre les microorganismes (Fauci 2001).

1.2 Les infections nosocomiales

Parmi les maladies infectieuses en émergence et réémergence, les infections bactériennes nosocomiales occupent une place prédominante. Ces infections acquises en milieu hospitalier sont majoritairement causées par des microorganismes opportunistes qui n'affectent pas les hôtes sains mais qui portent préjudice aux hôtes avec un faible système immunitaire. Ce type d'infection se trouve en émergence car le nombre de sidéens, de cancéreux, de transplantés et de personnes âgées augmente. De plus, la majorité de cette population immunodéprimée est hospitalisée et cela favorise les infections opportunistes nosocomiales. Ainsi, les microorganismes opportunistes causent plus d'infections que jamais et ils constituent un sujet de recherche primordial en santé publique (Kaplan, Sepkowitz et al. 2001)

1.2.1 Le cas de *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1.1 Caractéristiques générales

La famille des Pseudomonacées constitue probablement la forme de vie la plus abondante et la plus répandue sur la planète (Pitt 2002). L'espèce *P. aeruginosa* représente un bon exemple car elle est ubiquitaire et se retrouve principalement dans le sol ainsi que dans l'eau douce et salée. Elle joue un rôle important dans l'écologie du sol et possède une capacité remarquable de dégradation qui en fait un agent de bioremédiation très utile. De plus, certaines souches de *P. aeruginosa* produisent des composés fongicides et constituent des outils intéressants de biocontrôle pour protéger les végétaux contre les infections à

champignons (Galli, Silver et al. 1992). *P. aeruginosa* se présente sous la forme d'un bâtonnet mobile à gram négatif exprimant un pigment vert nommé pyocyanine comme présenté ci-dessous par la figure 4 (Salyers and Whitt 2002). Il possède un métabolisme oxydatif et il peut croître en conditions anaérobiques en utilisant le nitrate en tant qu'accepteur final d'électrons.

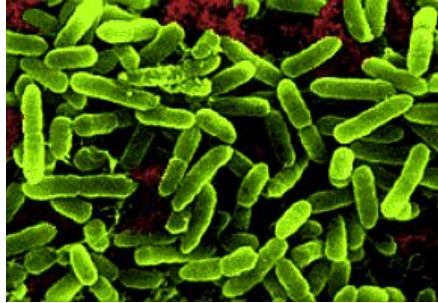


Figure 4. Observation de *P. aeruginosa* en microscopie confocale (http://www.pseudomonas.com/whos_involved.html).

1.2.1.2 Implication en pathogénie

Le pathogène opportuniste qu'est *P. aeruginosa* ne cause aucun problème aux organismes bénéficiant d'un bon système immunitaire mais il peut causer une variété d'infections chez les végétaux autant que chez l'humain. Ainsi, il tire avantage des brèches dans l'immunité des personnes immunodéprimées comme les grands brûlés, les personnes âgées ou les nouveau-nés ainsi que les patients atteints de fibrose kystique. *P. aeruginosa* peut alors engendrer des infections urinaires, oculaires ou pulmonaires et infecter des plaies profondes en entraînant un choc septique. En fait, *P. aeruginosa* représente l'une des trois plus grandes causes d'infections opportunistes chez l'humain (Stover, Pham et al. 2000). De plus, cette bactérie opportuniste est la principale cause de décès chez les grands brûlés et chez les personnes souffrant de mucoviscidose (fibrose kystique) (Salyers and Whitt 2002). Cette maladie autosomale récessive affecte un nouveau-né sur 2000 chez les Caucasiens et cela en fait la maladie héréditaire létale la plus prévalente. La mucoviscidose est causée par une mutation dans le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) et 70 % des cas découlent d'un changement d'acide aminé en position Phe 508 (May, Shinabarger et al. 1991). Cela occasionne une séquestration de la protéine CFTR au niveau du réticulum endoplasmique et abolit sa fonction biologique de canal à chlore (Goldberg and Pier 2000). Les patients présentent alors un transport anormal d'électrolytes ainsi

qu'une sécrétion aberrante de mucus par les glandes exocrines et l'épithélium sécrétoire. La maladie se traduit principalement par une affliction pulmonaire chronique avec une toux persistante et une détresse respiratoire ainsi qu'une insuffisance pancréatique (May, Shinabarger et al. 1991). Plusieurs défauts moléculaires illustrés à la figure 5 expliquent pourquoi *P. aeruginosa* colonise à vie la majorité des patients et entraîne la mort dans plus de 90 % des cas. Tout d'abord, la production anormale de mucus déshydraté et visqueux abolit la fonction protectrice du mucus et des cils qui évacuent habituellement les microorganismes. De plus, la haute concentration de sels dans le système respiratoire inhibe les peptides antimicrobiens protecteurs. Troisièmement, les cellules épithéliales pulmonaires des patients souffrant de fibrose kystique présentent davantage de récepteurs reconnus spécifiquement par *P. aeruginosa* et cela favorise son adhérence. De plus, les cellules épithéliales respiratoires normales peuvent ingérer certaines bactéries afin de protéger l'organisme mais les cellules qui ne présentent pas le canal CFTR perdent partiellement la capacité d'ingérer *P. aeruginosa*. Finalement, le niveau d'expression d'oxyde nitrique et de glutathione est sensiblement plus faible chez les patients et cela affaiblit leur immunité innée (Davies 2002).

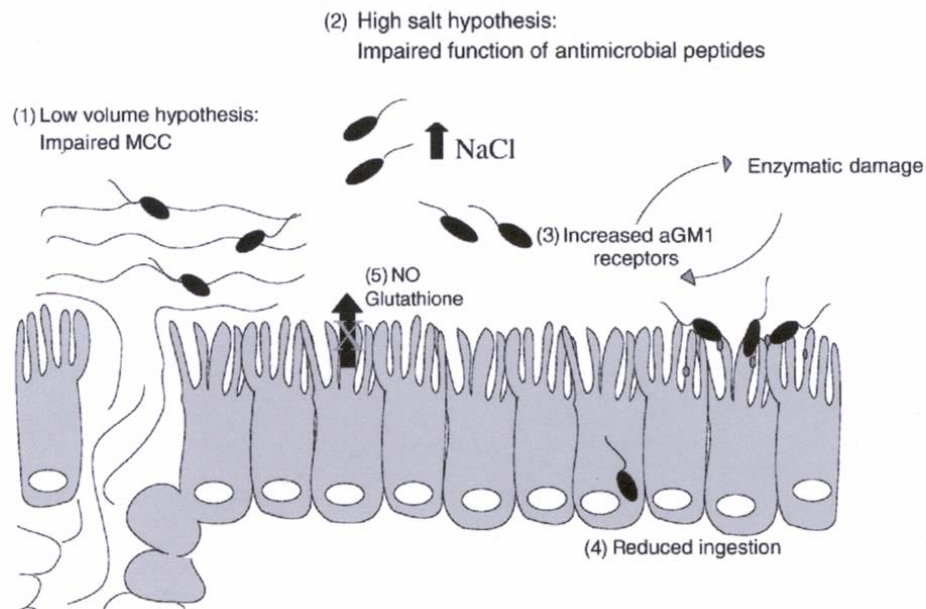


Figure 5. Principaux facteurs favorisant la colonisation pulmonaire des patients atteints de fibrose kystique par *P. aeruginosa* (Davies 2002).

Suite à la colonisation du système respiratoire par *P. aeruginosa*, l'infection perdure malheureusement jusqu'au décès du patient. Ce pathogène produit des immuno-évasines pour échapper au système immunitaire, il résiste aux antibiotiques puis il change de phénotype afin de persister dans l'hôte (Davies 2002). En effet, la majorité des souches deviennent mucoïdes en produisant de l'alginate puis forment un biofilm. Cela augmente la viscosité du mucus qui obstrue de plus en plus les voies respiratoires. De plus, la capsule d'alginate et le biofilm permettent la persistance chronique de *P. aeruginosa* car ils empêchent la fixation des anticorps spécifiques, protègent contre la phagocytose et l'opsonisation, inhibent l'attachement des cellules immunitaires, nuisent à la chimiotaxie des leucocytes, favorisent l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales puis constituent une barrière ionique contre le passage de certains antibiotiques comme les aminoglycosides (May, Shinabarger et al. 1991) À ce jour, aucun traitement efficace n'existe pour enrayer l'infection à *P. aeruginosa* et les mesures de prévention telle que l'hygiène sont favorisées. Cependant, la majorité des personnes susceptibles reposent étroitement en contact avec *P. aeruginosa* dans les milieux hospitaliers (Pitt 2002). En effet, la versatilité nutritionnelle de ce pathogène lui permet de survivre jusque dans l'eau distillée et dans du désinfectant en solution (Salyers and Whitt 2002).

1.2.1.3 Génomique

L'année 2000 compte parmi ces exploits la fin du séquençage du génome de *P. aeruginosa*. Le terme employé n'est pas exagéré car ce pathogène possède le plus grand génome bactérien connu avec 6,3 Mpb et un contenu en GC de 66 %. Ce génome impressionnant comprend 5570 cadres de lecture ouverts et renferme la plus haute proportion de gènes régulateurs enregistrée. La complexité génétique de *P. aeruginosa* rime avec sa capacité d'adaptation car il possède plusieurs gènes de catabolisme, de transport et d'efflux et de chimiotaxie. À titre d'exemple, cette bactérie opportuniste dispose de plus de 300 systèmes de transport de nutriments (Stover, Pham et al. 2000). Le génome code également pour de nombreux systèmes de régulation à deux composantes comprenant 55 protéines kinase détectrices, 89 facteurs de transcription et 14 protéines de fusion détectrices/régulatrices qui confèrent à *P. aeruginosa* une grande capacité d'intégration de signaux et de réponse aux changements environnementaux. De plus, *P. aeruginosa* possède un nombre

impressionnant de porines et de pompes d'efflux qui lui permettent de maintenir de faibles concentrations d'antibiotiques dans son cytoplasme (Walsh 2003). Finalement, le séquençage complet du génome facilite l'étude des multiples facteurs de virulence tels que les adhésines, le LPS, le système de sécrétion de type III, les toxines ExoS et ExoU, l'élastase et la production d'alginate puis de biofilm (Salyers and Whitt 2002).

1.2.1.4 Validation en tant que modèle d'étude

La raison principale justifiant le choix de *P. aeruginosa* en tant que modèle d'étude pour le développement de nouveaux antimicrobiens est l'absence de traitement efficace pour combattre ces infections d'importance considérable en santé humaine. Une deuxième raison réside en la capacité surprenante de *P. aeruginosa* à résister aux antibiotiques. En effet, ce microorganisme pathogène est naturellement résistant contre la majorité des antibiotiques utilisés à ce jour. De plus, certaines souches de *P. aeruginosa* ont acquis des mécanismes de résistance exogène et ne répondent à aucun antimicrobien disponible (Salyers and Whitt 2002). Enfin, la production d'alginate combinée aux nombreux systèmes d'efflux actifs et à sa faible perméabilité membranaire en font un véritable champion de la résistance qui mérite d'être étudié (Hancock and Brinkman 2002). Finalement, le génome de ce pathogène est séquencé et cela favorise grandement les recherches dans les domaines de pointe comme la génomique et protéomique (Stover, Pham et al. 2000).

2. La résistance aux antibiotiques

Par définition, un antibiotique consiste en une substance chimique naturelle produite par un microorganisme qui détruit ou inhibe la croissance microbienne spécifiquement à faible concentration. L'histoire des antibiotiques débute en 1928 lorsque l'Anglais Alexander Fleming observe des zones de lyses bactériennes autour du célèbre champignon *Penicillium notatum*. La pénicilline a soulevé un élan d'enthousiasme en ces années de guerre puis l'ère des antibiotiques a supplanté celle de la thérapie phagique. Aujourd'hui, les tablettes de pharmacie regorgent de divers antimicrobiens qui possèdent quatre principales cibles bactériennes représentées à la figure 6. La vancomycine et les antimicrobiens à noyau β -lactame comme la pénicilline attaquent la paroi de peptidoglycan spécifique aux bactéries. Ensuite, les aminoglycosides, la tétracycline, le chloramphénicol et les macrolides bloquent la synthèse protéique. La synthèse d'acides nucléiques quant à elle est inhibée par la rifampicine et les quinolones. Finalement, la voie métabolique de l'acide folique est inefficace sous l'action des sulfamides et du triméthoprim (Franklin and Snow 1989; Axelsen 2002)

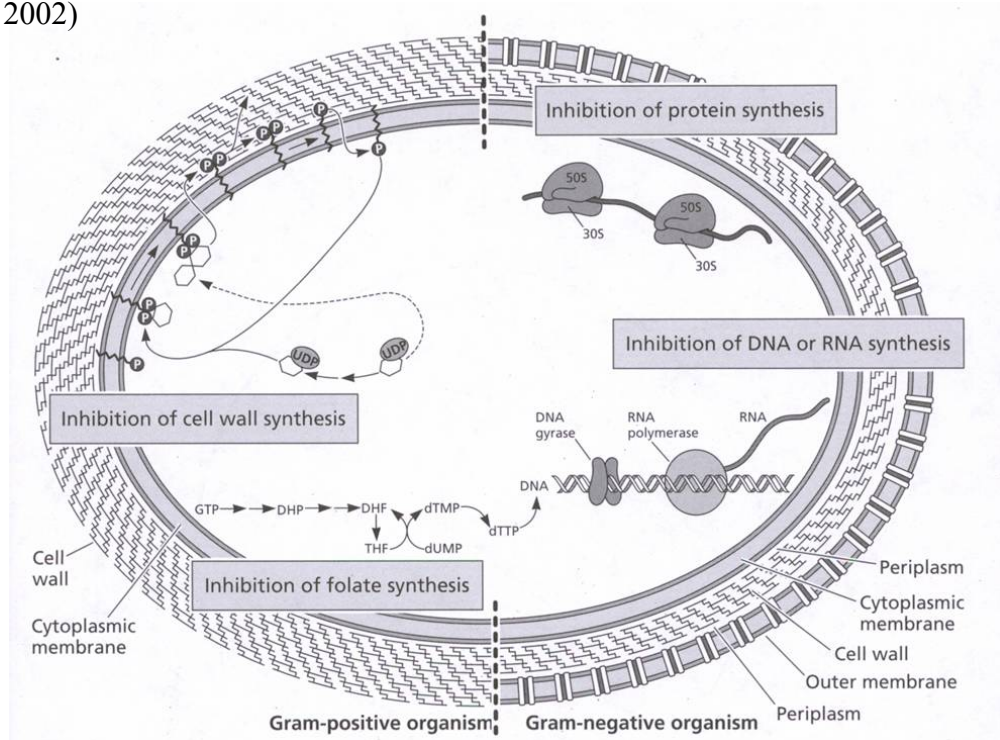


Figure 6. Principales cibles des 4 grandes classes d'antimicrobiens (Walsh 2003).

2.1 L'évolution de la résistance

2.1.1 L'émergence de la résistance

La nature même des antibiotiques répond efficacement à la question suivante : quelle est l'origine des gènes de résistance? Les antibiotiques naturels proviennent de microorganismes de l'environnement tels les champignons et les espèces du genre *Streptomyces*. Les populations microbiennes environnantes et les espèces productrices d'antibiotiques doivent donc se protéger contre ces molécules destructrices depuis des millions d'années. Ainsi, elles ont développé plusieurs stratégies de résistance favorisées par ce fort facteur de sélection. Par la suite, les transferts de matériel génétique verticaux et horizontaux comme la conjugaison, la transformation et la transduction ont permis la propagation des mécanismes de résistance aux cellules filles puis aux diverses espèces bactériennes.

2.1.2 Acquisition et mécanismes de résistance

Il existe deux principales astuces qui permettent aux bactéries d'échapper à l'action des antibiotiques. La résistance génétique compte pour plus de 99 % des cas alors que la résistance non génétique se retrouve plus rarement. Cette forme de résistance comprend l'évasion où un microorganisme persiste dans les tissus hors d'atteinte des antimicrobiens tout en y demeurant sensible. Les bactéries peuvent également adopter une forme transitoire L où elles sont dépourvues d'une grande portion de leur paroi et résistent aux antibiotiques qui ciblent cette dernière. En ce qui concerne la résistance génétique, elle provient d'un changement génétique chromosomique ou extra chromosomique suivi d'une sélection par un antimicrobien. Les modifications chromosomiques découlent de mutations stables qui confèrent rarement un désavantage évolutif. L'ADN polymérase bactérienne introduit une mutation sur 10^7 paires de base et les foyers infectieux comprennent environ 10^9 bactéries alors il n'est pas surprenant de voir surgir des clones résistants (Walsh 2003). L'acquisition de matériel génétique sous forme de plasmide, de transposon ou d'intégron compte pour environ 80 % des cas de résistance. Les plasmides transportent souvent plusieurs gènes de résistance et peuvent en acquérir davantage par recombinaison

homologue, transposition ou intégration. Les intégrons consistent en des éléments complexes avec leur propre promoteur, intégrase et points de recombinaison homologue pour l'intégration de cassettes avec des gènes de résistance (Normark and Normark 2002).

Les bactéries se défendent contre les grandes classes d'antimicrobiens par trois mécanismes généraux illustrés sur la figure 7. Tout d'abord, elles peuvent modifier ou détruire l'antibiotique à l'aide d'un gène de résistance extra chromosomique. Ce mécanisme agit principalement contre les antimicrobiens naturels comme la pénicilline qui se retrouve dans l'environnement depuis des millions d'années. Le meilleur exemple est l'expression d'enzymes β -lactamases bactériennes qui hydrolysent les antibiotiques à noyau β -lactame. Par contre, ce mécanisme ne contribue pas encore à la résistance contre les antibiotiques synthétiques comme le triméthoprim qui se trouve sur le marché depuis à peine 70 ans. L'absence de réserve de gènes de résistance environnementaux explique ce phénomène (Walsh 2003). Plusieurs espèces bactériennes possèdent des pompes d'efflux qui expulsent activement les antibiotiques à l'extérieur de la cellule. Ce second mécanisme prévient l'accumulation de concentrations thérapeutiques d'antimicrobiens dans le cytoplasme bactérien. Les pompes transmembranaires peuvent être acquises via un plasmide ou un transposon mais elles font souvent partie intégrante de la physiologie bactérienne. Ces dernières exportent des métabolites, des composés toxiques ainsi que des facteurs de virulence comme des toxines. Le cas de *P. aeruginosa* ne peut être passé sous silence car il possède plus de 72 pompes distinctes qui lui permettent de résister à une multitude d'antibiotiques (Hancock and Brinkman 2002). Finalement, le troisième mécanisme implique une modification ou un remplacement de la cible thérapeutique. Les bactéries peuvent subir une mutation chromosomique qui entraîne une altération de la cible. Ainsi, cette dernière peut devenir insensible à l'action de la drogue tout en conservant son activité biologique. Les espèces naturellement transformables comme *Streptococcus pneumoniae* acquièrent facilement du matériel génétique de leur environnement et résistent à la pénicilline en empruntant une nouvelle enzyme PLP (Protéine Liant la Pénicilline) insensible à une autre espèce telle *Streptococcus mitis* (Normark and Normark 2002).

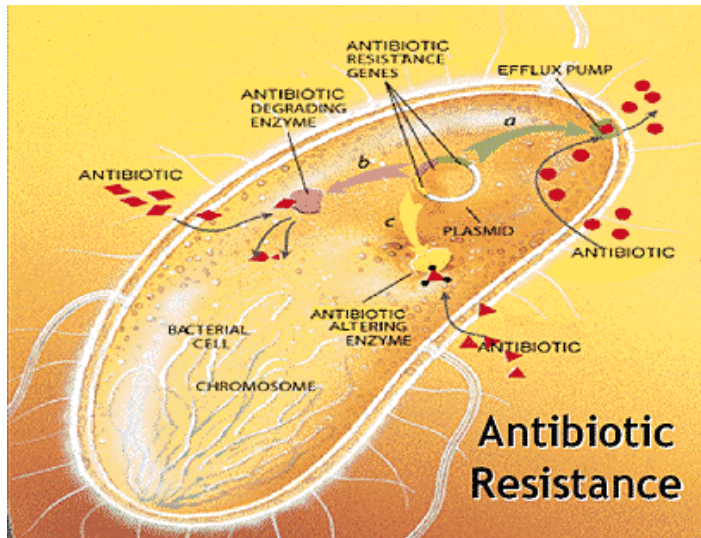


Figure 7. Mécanismes généraux de la résistance bactérienne aux antibiotiques (<http://images.google.ca/imgres?imgurl=images.medscape.com/pi/editorial/cmecircle/2002/1692/kollef/slide03.gif&imgrefurl=http://www.medscape.com>)

2.1.3 Facteurs responsables de l'augmentation de la résistance

L'évolution et la progression de la résistance bactérienne aux grandes classes d'antibiotiques découlent de quatre principaux facteurs. Tout d'abord, l'utilisation abusive des antimicrobiens a exercé une forte pression sélective sur les populations bactériennes. Ainsi, les antibiotiques ont enclenché le processus de l'évolution en créant un nouveau facteur de sélection naturelle. Les microorganismes possédant des gènes de résistance ou d'évasion face aux molécules destructrices ont été les seuls à survivre et à se multiplier dans les environnements traités. Ainsi, les populations résistantes ont spontanément pris le dessus sur les souches bactériennes sensibles et leur domination s'amplifie au gré de l'utilisation des antibiotiques. Une seconde cause d'évolution de la résistance réside dans la capacité stupéfiante des microorganismes à se propager. La dissémination des grands clones épidémiques tel que les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthycilline (SARM) et les Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) propagent la problématique à travers le globe (Normark and Normark 2002). De plus, le mode de vie actuel et la croissance démographique combinés aux déplacements à grande vitesse augmentent les contacts humains. En troisième lieu, le vieillissement de la population accompagné de l'augmentation des cas de cancers et de la propagation du VIH accroît considérablement les

populations humaines immunodéprimées. Ce phénomène favorise l'émergence d'infections opportunistes causées par des microorganismes de la flore normale tels que *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ces derniers subsistent dans le corps humain donc ils se trouvent fréquemment en contact avec des antibiotiques et, par le fait même, sont souvent résistants. Finalement, l'utilisation d'analogues d'antibiotiques employés en médecine humaine dans la supplémentation nutritionnelle animale a favorisée l'avenue d'une résistance croisée pour nos antibiotiques (Witte 1997).

2.2 La résistance aujourd'hui

2.2.1 Ampleur du problème

La résistance bactérienne face aux antibiotiques s'avère très préoccupante en ce début de millénaire. En fait, aucune espèce bactérienne connue parmi celles rencontrées en pathologie humaine et aucun antibiotique n'échappent aujourd'hui à ce phénomène. Les mécanismes de résistance les plus anciens se sont répandus parmi les souches bactériennes en s'ajoutant aux nouvelles mutations spontanées pour entraîner une augmentation drastique de la fréquence de résistance en quelques années. Finalement, aucune nouvelle classe d'antibiotiques s'attaquant à une cible bactérienne inédite n'a été commercialisée depuis 30 ans alors aucun échappatoire n'est disponible (Acar 1998). La problématique actuelle de la résistance entraîne plusieurs conséquences néfastes pour l'être humain. En fait, de plus en plus de malades ne peuvent être traités adéquatement alors ils demeurent infectés plus longtemps et cela les expose davantage au risque de décès. De plus, l'augmentation du phénomène de résistance prolonge et aggrave les épisodes d'épidémie à travers le monde qui propagent encore plus les pathogènes multirésistants. Finalement, il ne faut pas négliger l'emballement des prix des antimicrobiens causé par l'évolution de la résistance. Cela diminue l'accès aux médicaments des populations les plus pauvres et souvent les plus touchées par les infections bactériennes (Prentice 2000). Ainsi, il s'avère crucial de conscientiser la population humaine afin d'apporter des solutions à cette problématique.

2.2.2 Solutions possibles

Les avenues possibles pour contrebalancer l'évolution de la résistance aux antimicrobiens sont multiples. Tout d'abord, il s'avère primordial d'instaurer une pratique d'utilisation plus prudente des différentes drogues. Pour ce faire, il faudrait encourager l'utilisation d'antibiotiques à spectre étroit suite à l'identification bactérienne, optimiser les doses et durées des traitements afin de diminuer les risques de sélection, établir des tests de diagnostic rapides et efficaces afin d'établir les profils de résistance des pathogènes puis restreindre au maximum l'emploi d'antibiotique. Ensuite, il est important de lutter contre la diffusion des souches bactériennes multirésistantes en prenant soin de détecter de façon précoce les personnes porteuses, de les isoler convenablement, d'établir un réseau mondial d'observation épidémiologique puis de mettre en place des mesures de vaccination et d'hygiène adéquates. Finalement, il s'avère essentiel de développer de nouveaux antimicrobiens. Cela peut être réalisé en criblant des microorganismes, en bloquant les mécanismes de résistance, en exploitant la chimie combinatoire puis en étudiant de nouvelles cibles thérapeutiques (Cunha 2001).

3. Développement de nouveaux antimicrobiens

L'histoire des cinquante dernières années démontre que l'usage abusif des antibiotiques mène inévitablement au développement de la résistance. Afin de contrer ce phénomène, la communauté scientifique se doit de développer de nouvelles classes structurales et fonctionnelles d'antimicrobiens et d'en faire une utilisation intelligente. Depuis le début des années 1990, plusieurs stratégies sont mises en œuvre afin de découvrir et de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques. Les méthodes traditionnelles comme le criblage d'antimicrobiens naturels et le blocage des mécanismes de résistance occupent toujours une place importante. Cependant, l'avenue de nouvelles méthodes de chimie combinatoire procure un grand enthousiasme en recherche thérapeutique. En effet, la modification d'antimicrobiens naturels, la synthèse de banques de molécules puis la synthèse d'inhibiteurs sur mesure dominant le marché pharmaceutique. Afin de déjouer le processus de résistance, la recherche doit mener au développement d'antimicrobiens de structure et de fonction nouvelle et, pour ce faire, il faut identifier des cibles bactériennes inédites. Les récentes avancées technologiques en biologie moléculaire, en génomique et en protéomique mettent à jour de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que des méthodes innovatrices de criblage biologique telle la présentation phagique.

3.1 Méthodes traditionnelles

3.1.1 Criblage d'antibiotiques naturels

Depuis 4,8 milliards d'années, les organismes ont synthétisé bien plus de molécules différentes que les chimistes n'en produiront jamais. Ce principe favorise le criblage de microorganismes à la recherche de métabolites secondaires bactériostatiques ou bactéricides. La stratégie traditionnelle consistait à cribler en continu des cultures microbiennes diversifiées. Après six décennies d'expérimentation, les scientifiques se consacrent maintenant à la recherche de nouveaux gènes de biosynthèse d'antibiotiques parmi les microorganismes non cultivables en laboratoire. La probabilité de dénicher de

nouveaux antimicrobiens parmi cette population sous étudiée est élevée car elle représente 99 % de la diversité microbienne (Walsh 2003). La disponibilité de la séquence de plus de 50 génomes microbiens et la bioinformatique favorisent le criblage moléculaire des espèces non cultivables. En effet, plusieurs gènes responsables de la biosynthèse des métabolites secondaires sont caractérisés et cela permet la synthèse d'amorces spécifiques puis le criblage par PCR (Polymerase Chain Reaction). Le séquençage suivi de l'analyse bioinformatique des génomes microbiens peut également constituer une stratégie de criblage moléculaire (Breithaupt 1999).

3.1.2 Blocage des mécanismes de résistance

Les inhibiteurs de β -lactamase inactivent les principales enzymes bactériennes responsables de la résistance aux antibiotiques de type β -lactame. Ces inhibiteurs constituent le premier exemple de blocage d'un mécanisme de résistance bactérienne (Franklin and Snow 1989). Quelques autres avenues d'interférence avec ces mécanismes sont présentement à l'étude. La recherche de composés qui déstabilisent la membrane externe des bactéries à gram négatif est primordiale car de nombreuses espèces résistent aux antibiotiques via une faible perméabilité membranaire. Finalement, plusieurs groupes de recherche tentent de développer des molécules qui déstabilisent les pompes à efflux ainsi que des antimicrobiens qui échappent à leur action (Breithaupt 1999).

3.2 Chimie combinatoire

3.2.1 Modification d'antibiotiques connus

La chimie combinatoire permet maintenant la synthèse de milliers de nouvelles molécules à partir d'un antibiotique naturel connu. Ces antimicrobiens modifiés sont ensuite testés sur des bactéries multirésistantes comme *P. aeruginosa* ou *S. aureus* résistant à la vancomycine afin de sélectionner les meilleurs candidats thérapeutiques. L'objectif principal des modifications chimiques apportées aux divers antibiotiques naturels consiste à les

transformer de telle façon qu'ils ne soient plus reconnus pas les mécanismes de résistance bactériens. Elles visent également à maximiser les propriétés pharmacologiques des antimicrobiens comme leur efficacité, leur stabilité et leur biodisponibilité (Hughes 2003). Cette approche pharmacologique possède un fort potentiel et les quatre générations de céphalosporine (antibiotique à noyau β -lactame) en témoignent (Walsh 2003). Cependant, elle possède un inconvénient majeur qui réside dans l'absence de développement de nouveaux modes d'action moléculaire.

3.2.2 Synthèse de banques de molécules

La synthèse de banques de molécules et la synthèse organique sur mesure décrites ci-dessous prennent une ampleur considérable dans la recherche thérapeutique. Cela découle de leur principal avantage qu'est la création de molécules innovatrices au point de vue structural et fonctionnel avec aucun homologue naturel. Cela réduit considérablement les probabilités de réserve de gènes de résistance provenant de l'environnement et minimise les risques de développement de résistance (Walsh 2003). Par contre, cette approche fait face à une problématique de taille : comment trouver les bonnes molécules? La synthèse de banques moléculaires assume que les chimistes peuvent produire une diversité moléculaire suffisante pour atteindre des probabilités favorables de découverte d'antimicrobiens. Cette présomption s'avère réaliste car la discipline révolutionnaire que représente la chimie combinatoire produit rapidement toutes les combinaisons possibles d'un jeu de molécules. (Hughes 2003). La chimie combinatoire peut s'effectuer sur support solide mais la synthèse en milieu liquide gagne de l'intérêt auprès des compagnies pharmaceutiques. En effet, la synthèse sur support solide s'avère beaucoup plus limitante car elle dépend de la formation de liaisons amides donc elle s'applique principalement à la synthèse protéique puis elle requiert plus d'étapes de purification (Geysen, Schoenen et al. 2003). Un exemple de synthèse sur support solide consiste à faire réagir à chaque étape les 20 acides aminés naturels afin d'obtenir en n étapes 20^n peptides différents. La méthode de répartition et de mélange se déroule également sur un support solide constitué de billes de polystyrène. Lorsque ces dernières viennent en contact avec un solvant, elles gonflent et deviennent accessibles aux réactifs dissous. Chaque bille porte environ 10^{13} amorces qui se combinent

aux réactifs pour produire de multiples oligomères (Thompson and Ellman 1996). En ce qui concerne la synthèse en milieu liquide, elle exploite les mêmes mécanismes en utilisant des polymères solubles. La chimie combinatoire dynamique illustrée à la figure 8 est une application qui se réalise en solution. Dans ce cas, la banque de molécules réfère à un nombre limité de groupements de synthèse qui se réarrangent continuellement. Finalement, l'ajout d'une protéine cible favorise la formation de molécules de forte affinité pour cette dernière (Lehn and Eliseev 2001).

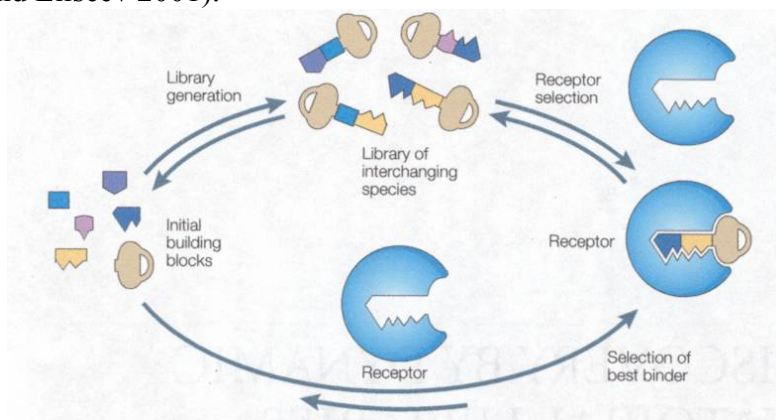


Figure 8. Représentation de la chimie combinatoire dynamique (Lehn and Eliseev 2001).

Finalement, les tests de criblage colorimétrique spécifiques décèlent les candidats intéressants qui sont caractérisés. En moyenne, un criblage à haut débit robotisé permet d'analyser entre 100 000 et 500 000 molécules en quelques semaines.

3.2.3 Synthèse organique sur mesure

Les progrès de la biologie moléculaire, de la chimie, de la génomique structurale, de la protéomique et de la bioinformatique permettent maintenant une conception rationnelle d'antibiotiques. De plus, la modélisation moléculaire et les études de structure tridimensionnelle réalisées grâce au RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), aux rayons X et à la cristallographie permettent d'analyser en profondeur la conformation de protéines bactériennes. Par conséquent, il est possible de cibler correctement la structure moléculaire appropriée afin d'inhiber ces protéines puis d'effectuer la synthèse organique nécessaire. (Hughes 2003). Cependant, la validité de cette stratégie de développement d'antimicrobiens repose entièrement sur le choix éclairé de la cible thérapeutique.

3.3 Recherche de nouvelles cibles

Le séquençage des génomes bactériens combiné à la génomique et à la protéomique permet d'identifier des gènes essentiels à la survie et à la virulence des pathogènes (Breithaupt 1999). Une application importante de la génomique bactérienne est la STM (Signature-Tagged Mutagenesis) qui permet l'identification de gènes essentiels à la survie bactérienne *in vivo* (Lehoux, Sanschagrin et al. 2002). Finalement, les analyses bioinformatiques révèlent l'identité des protéines essentielles pour la persistance dans l'animal. Cependant, ces dernières doivent répondre à plusieurs critères qui s'ajoutent à l'essentialité avant d'être considérées comme cibles. Ainsi, les protéines doivent être exprimées en quantité appréciable lors de l'infection, être conservées dans l'évolution bactérienne, leur inhibition doit entraîner un phénotype létal puis elles ne doivent pas être conservées chez l'humain. Plusieurs cibles bactériennes ont déjà été sélectionnées tel que montré par la figure 9; soit la machinerie de réplication de l'ADN, la signalisation intracellulaire et intercellulaire, les facteurs de virulence comme les adhésines, la synthèse du LPS, la biosynthèse de la paroi, la division cellulaire, l'ARN polymérase, les mécanismes d'acquisition du fer, la glycosylation puis la biosynthèse des acides gras et de l'acide folique (Breithaupt 1999; Projan 2002; Salyers and Whitt 2002). Parmi ces dernières, notre équipe de recherche s'intéresse particulièrement à la division cellulaire bactérienne.

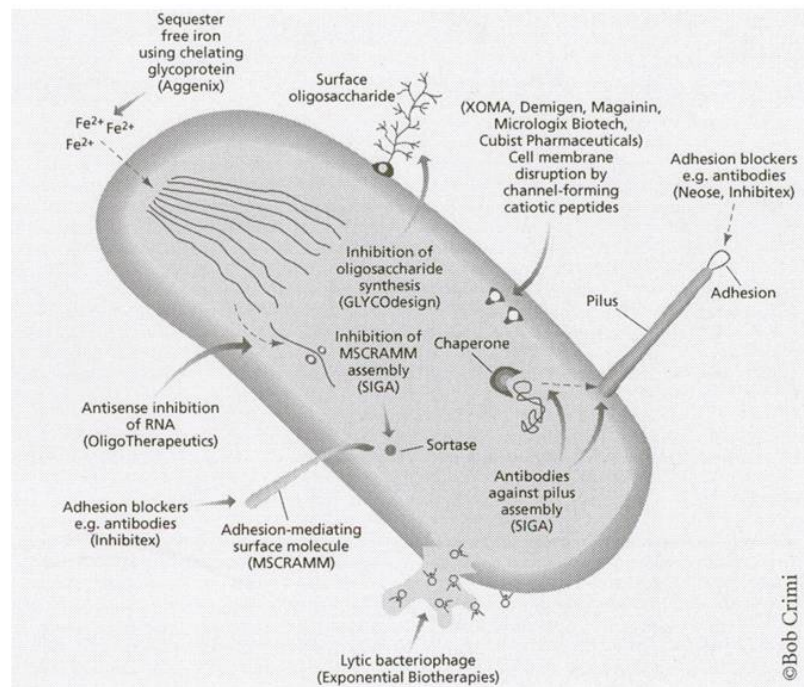


Figure 9. Quelques exemples de cibles bactériennes (Breithaupt 1999).

3.3.1 La division cellulaire bactérienne

La machinerie de division cellulaire s'avère un excellent choix de cible thérapeutique dans l'optique du développement de nouveaux antimicrobiens (Projan 2002). Tout d'abord, il s'agit d'un processus essentiel à la survie bactérienne qui mène à un phénotype létal s'il est inhibé. Le divisosome, qui se définit comme l'ensemble des protéines impliquées dans la division cellulaire, est très conservé dans l'évolution bactérienne mais absent chez l'humain. De plus, le processus de division s'avère extrêmement sensible aux altérations car il implique une cascade précise de protéines ainsi que des ratios critiques. Finalement, aucun antimicrobien connu ne s'attaque spécifiquement à la division cellulaire et cela suggère que les espèces bactériennes n'ont pas encore développé de mécanismes de résistance contre cette classe d'inhibiteurs.

3.3.1.1 Vue d'ensemble

Les avancées technologiques dans les domaines de la cytologie, de la génomique et de la structure protéique ont permis d'approfondir la compréhension de la division cellulaire bactérienne. Ce processus dépend d'une régulation stricte au niveau spatial, temporel et quantitatif qui permet l'invagination des membranes et de la paroi cellulaire coordonnée à la synthèse du peptidoglycan de septation.

3.3.1.1.1 Protéines impliquées

L'opéron *dcw* situé à 2 minutes sur la carte génétique de *E. coli* regroupe les 16 gènes nécessaires à la division cellulaire et à la synthèse du peptidoglycan de septation (Dai and Lutkenhaus 1992). La majorité des protéines impliquées dans la division portent l'acronyme Fts (Filamentous Temperature Sensitive). Cette appellation date des années 1960-70 au cours desquelles des chercheurs ont identifié des bactéries mutantes filamentant à la température non permissive de 42°C suite à l'inactivation de protéines thermosensibles (Margolin 1999). Ce phénotype illustré à la figure 10 résulte d'une croissance bactérienne continue sans division cellulaire entraînant la formation de longs filaments non viables. Cela fournit la première évidence de l'implication des protéines Fts dans le processus de septation.

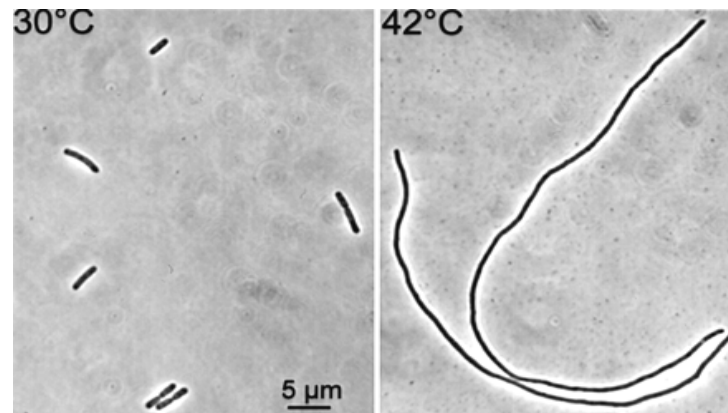


Figure 10. Photographies de bactéries viables à 30°C et de bactéries filamenteuses à la température non permissive de 42°C (Pichoff and Lutkenhaus 2002).

La division cellulaire requiert une synthèse accrue de peptidoglycan de septation effectuée par les PLP (Protéines Liant la Pénicilline). Ainsi, les PLP de haut poids moléculaire se chargent des étapes finales de division en formant un septum de peptidoglycan qui se joint aux protéines Fts cytoplasmiques et membranaires afin de traverser la cellule mère pour la séparer physiquement en cellules filles (Nanninga 1998).

3.3.1.1.2 Ordre spatial et temporel des événements

La localisation de FtsZ au centre de la cellule initie le processus de division suite à la réplication du génome bactérien. Ainsi, cette protéine se positionne au site de division cellulaire situé entre les nucléoïdes répliqués au début de leur ségrégation. Par la suite, FtsZ polymérise en un anneau de division et recrute les protéines FtsA et ZipA qui stabilisent l'anneau et l'ancre à la membrane plasmique. Ces dernières enclenchent alors un processus de recrutement protéique en cascade illustré à la figure 11 afin de rapatrier toutes les protéines requises à la division de la cellule mère (Errington, Daniel et al. 2003).

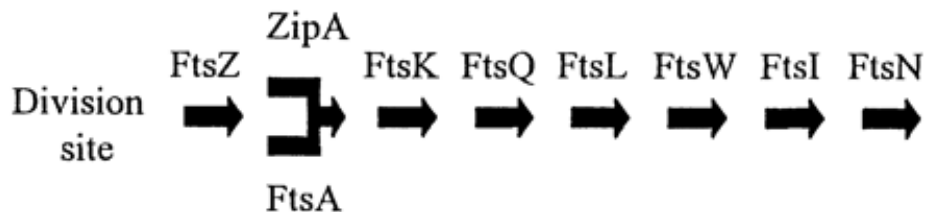


Figure 11. Recrutement protéique séquentiel essentiel à la division cellulaire bactérienne (Pichoff and Lutkenhaus 2002).

Le recrutement protéique mène progressivement à l'assemblage du divisosome qui regroupe toutes les protéines requises pour la division cellulaire bactérienne. Suite à la ségrégation des génomes homologues et à la formation du divisosome, l'anneau de division se contracte pour séparer physiquement les cellules filles tel que montré par la figure 12 (Den Blaauwen, Buddelmeijer et al. 1999).

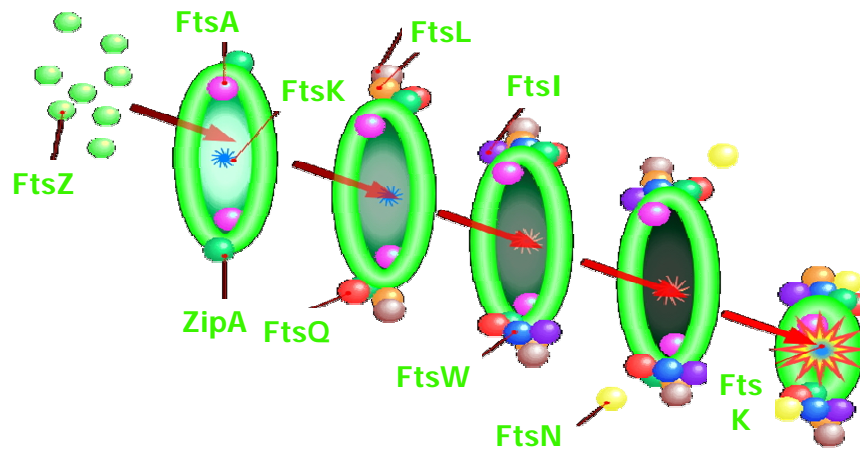


Figure 12. Représentation dynamique du divisosome bactérien et de la constriction de l'anneau de division.

La division cellulaire ne peut être complétée sans une insertion massive de peptidoglycan sous la forme de triplets au site de septation. Cette addition simultanée de triplets de peptidoglycan combinée à la pression osmotique et à la tension de surface fragilise la paroi bactérienne et engendre un site d'invagination continuellement tiré par le divisosome. (Nanninga 1998). Suite à la septation de la cellule mère, l'anneau FtsZ dépolymérise puis les nouveaux anneaux se forment aux sites de division cellulaire des cellules filles qui sont déjà déterminés dans la cellule mère. Chez *Deinococcus radiodurans*, les sites de division des cellules filles commencent même à se préciser avant celui de la cellule mère (Margolin 1999)!

3.3.1.2 FtsZ

La première protéine de division cellulaire bactérienne identifiée se révèle être FtsZ. Cette protéine cytoplasmique de 394 acides aminés possédant un poids moléculaire de 40 KDa joue un rôle essentiel et prédominant dans le processus de division.

3.3.1.2.1 Conservation dans l'évolution

L'homologue structural de la tubuline que constitue FtsZ s'avère la protéine bactérienne la plus conservée dans l'évolution. Ainsi, toutes les espèces d'eubactéries et d'archéobactéries en possèdent un analogue à l'exception de *Clamylidia trachomatis* et des mitochondries. La structure tridimensionnelle de FtsZ ressemble de près à celle de la tubuline mais ces protéines possèdent seulement 15 % d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés. Les études phylogénétiques suggèrent que FtsZ est l'ancêtre moléculaire de la tubuline (van den Ent, Amos et al. 2001). En fait, les archéobactéries et *Rhizobium meliloti* détiennent une copie non essentielle du gène *ftsZ* qui résulte d'un phénomène de duplication. Cette seconde copie a subi une série de mutations afin de diverger en tubuline qui forme aujourd'hui les microtubules du cytosquelette eucaryote (Margolin 1999).

3.3.1.2.2 Caractéristiques structurales

La structure cristalline de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* a été résolue à 2.8 Angström tel que démontré par la figure 13. Le domaine C-terminal de cette protéine comprend 4 feuillets β supportés par 2 hélices α centrales. Quant au domaine N-terminal, il contient un feuillet β nécessaire à l'activité enzymatique de FtsZ. La portion centrale de la protéine renferme le site de fixation du GTP et comporte 4 boucles qui lient le phosphate ainsi qu'une cinquième qui se joint à l'hélice centrale afin de fixer la guanine (Lowe and Amos 1998).

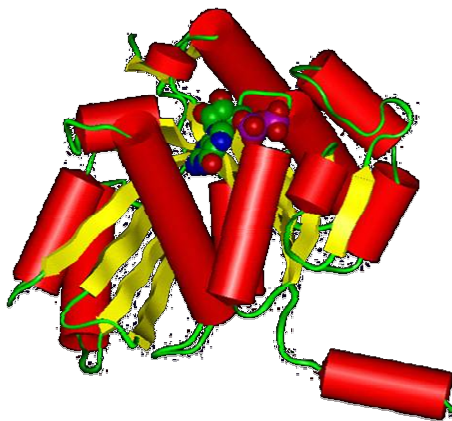


Figure 13. Structure cristalline de FtsZ de *Methanococcus jannaschii* résolue à 2.8 Angström illustrant la conformation de FtsZ; les tubes rouges représentent les hélices α alors que les feuillets β sont en jaune et les boucles en vert, le site actif renferme l'ATP et le cofacteur magnésium schématisés au centre de la figure. (Lowe and Amos 1998).

3.3.1.2.3 Activité enzymatique

La protéine FtsZ possède une activité enzymatique GTPase très bien caractérisée. Il est démontré que l'hydrolyse du GTP s'effectue une minute après la fixation du substrat et qu'une molécule de FtsZ hydrolyse 5 molécules de GTP en GDP par minute *in vitro* (Stricker, Maddox et al. 2002). De plus, la population de FtsZ retrouvée dans une cellule bactérienne renferme seulement une portion de molécules actives biochimiquement (Romberg, Simon et al. 2001). L'activité GTPase de FtsZ est étroitement liée à sa polymérisation. En effet, l'activité enzymatique est activée par la boucle T7 d'un monomère de FtsZ qui s'insère dans le site de fixation du GTP d'un monomère adjacent suite à la polymérisation. Après l'hydrolyse du GTP, le phosphate inorganique se retrouve séquestré dans la protéine avant d'être relâché (Errington, Daniel et al. 2003).

3.3.1.2.4 Régulation spatiale et temporelle de FtsZ

L'enzyme FtsZ doit se positionner au centre de la cellule afin d'amorcer le processus de division. Deux principaux mécanismes contrôlent cette localisation : l'occlusion du nucléoïde et le système MinCDE. Les protéines Min régulent de façon spatiale la division cellulaire en inhibant la formation de l'anneau FtsZ aux pôles bactériens et en restreignant la formation de l'anneau exclusivement au centre de la cellule. MinC constitue un inhibiteur spécifique de FtsZ qui déstabilise les polymères en empêchant la polymérisation de l'anneau. Quant à la protéine MinD, il s'agit d'une enzyme ATPase qui séquestre MinC à la membrane tout en l'activant. Finalement, la protéine MinE dirige le complexe inhibiteur MinCD vers les pôles afin que le centre de la cellule demeure exempt d'inhibiteur de FtsZ (Pichoff and Lutkenhaus 2001). En pratique, le complexe MinCD oscille d'un pôle à l'autre dans un cycle d'environ 20 secondes et il est inhibiteur seulement quand MinD fixe l'ATP. Lorsque MinCD rencontre MinE qui forme un anneau au centre de la cellule, MinE active l'activité ATPase de MinD qui se décroche de la membrane et relâche MinC qui n'est alors plus inhibiteur. Le cycle recommence lorsque le complexe inhibiteur MinCD se reforme suite à la fixation de l'ATP par MinD (Errington, Daniel et al. 2003). Ainsi, l'anneau MinE oscille au centre de la cellule afin d'éviter la présence du complexe inhibiteur MinCD au site de division tel qu'illustré à la figure 14 (Lackner, Raskin et al. 2003).

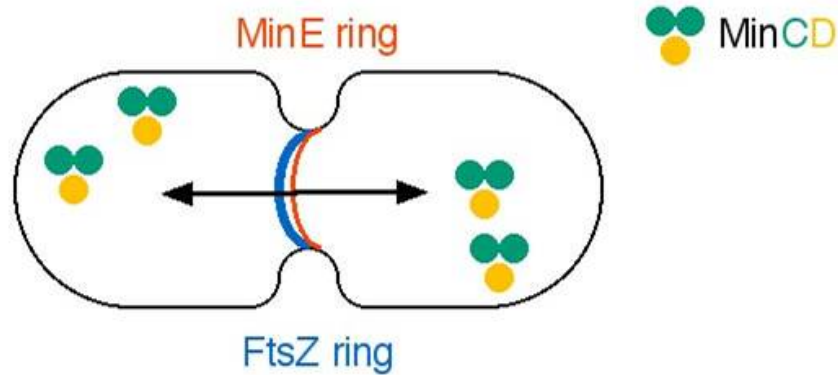


Figure 14. Sélection du site de formation du septum par le système MinCDE (www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/JYL/MinC%20&%20MinD/MinCDE.pict.jpg).

L'occlusion du nucléoïde fournit un signal temporel et spatial qui régule la division cellulaire bactérienne afin de prévenir la formation de l'anneau FtsZ avant la ségrégation des génomes (Margolin 1999). Ce mécanisme fait appel au génome bactérien en répllication ou nucléoïde qui agit comme une barrière physique contre la division cellulaire en inhibant la formation de l'anneau. Il existe seulement 3 endroits où la concentration du nucléoïde permet la formation de l'anneau ; les pôles où le système MinCDE inhibe la polymérisation de FtsZ et le centre de la cellule qui devient disponible uniquement à la fin de la répllication et vers le milieu de la ségrégation (Errington, Daniel et al. 2003). L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la répllication du génome et la biosynthèse de la paroi de peptidoglycan prennent leurs nucléotides pyrimidines de la même réserve cellulaire. Ainsi, la compétition pour les nucléotides ne permet pas la synthèse accrue de peptidoglycan nécessaire à la division cellulaire près du nucléoïde condensé. Lorsque la ségrégation des génomes homologues débute, la synthèse de peptidoglycan est favorisée au centre de la cellule exempt de nucléoïde et cela soutient la formation de l'anneau FtsZ à l'endroit et au moment opportun (Nanninga 1998; Den Blaauwen, Buddelmeijer et al. 1999).

3.3.1.2.5 Fonction structurale de polymérisation

La polymérisation de FtsZ au centre de la cellule engendre la formation d'un anneau de 6 à 7 filaments d'épaisseur. La portion N-terminale de FtsZ permet la polymérisation et la localisation de l'anneau alors que le C-terminal est crucial pour sa morphologie et sa stabilité (Ma, Ehrhardt et al. 1996). Au cours de la division cellulaire, environ 30 % des

molécules de FtsZ polymérisent et une réserve considérable demeure disponible. La polymérisation s'avère très rapide et elle se réalise en environ 10 secondes à 28°C. De plus, l'anneau est de nature extrêmement dynamique et il possède une demi-vie de 30 secondes (Stricker, Maddox et al. 2002). Quelques chercheurs affirment que l'hydrolyse du GTP est requise pour la polymérisation de FtsZ (Scheffers and Driessen 2002). Cependant, la majorité des auteurs s'entendent sur le fait que FtsZ polymérise lorsqu'il fixe le GTP et qu'il dépolymérise suite à l'hydrolyse du GTP en GDP (Lutkenhaus and Addinall 1997; Romberg, Simon et al. 2001; Stricker, Maddox et al. 2002; Errington, Daniel et al. 2003). Tel que mentionné précédemment, la polymérisation de FtsZ favorise l'hydrolyse du GTP qui dépend de l'interaction de la boucle T7 d'un monomère avec le site de fixation du GTP du monomère adjacent (Scheffers, de Wit et al. 2002). Ainsi, l'hydrolyse du GTP et la liaison subséquente au GDP et au phosphate inorganique déstabilisent les polymères suite au changement de conformation occasionné. D'ailleurs, la stabilité de l'anneau dépend de la liaison au GTP et les polymères sont grandement consolidés par l'ajout de GTP non hydrolysable. De plus, les polymères de FtsZ se désassemblent instantanément en présence de GDP (Errington, Daniel et al. 2003). Finalement, une bonne corrélation unit l'échange des monomères de l'anneau avec les monomères libres du cytoplasme et l'activité GTPase (Errington, Daniel et al. 2003). En ce qui concerne le mécanisme de polymérisation, la protéine FtsZ fait exception à la règle. En effet, elle représente le seul exemple de polymérisation isodesmique où la concentration critique n'entre pas en jeu et l'initiation de la polymérisation se fait rapidement tel que montré par la figure 15. La majorité des polymères biologiques comme l'actine et la tubuline polymérisent selon le modèle coopératif en formant des polymères très stables au centre qui se remanient continuellement aux extrémités. Quant aux polymères de FtsZ, ils présentent de fortes liaisons longitudinales et de faibles interactions latérales (Romberg, Simon et al. 2001).

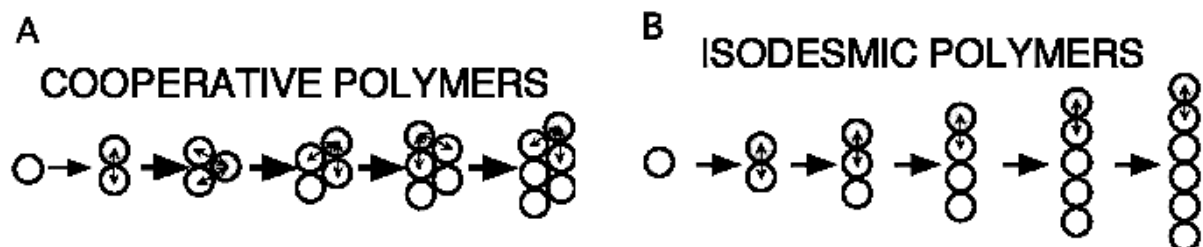


Figure 15 Représentation des modèles de polymérisation (A) coopératif et (B) isodesmique (Romberg, Simon et al. 2001).

3.3.1.2.6 Constriction de l'anneau FtsZ

Suite à la polymérisation de FtsZ et à l'assemblage du divisosome, l'anneau FtsZ se contracte afin de diviser la cellule mère tel qu'illustré à la figure 16. La nature de la force de constriction de l'anneau FtsZ est encore méconnue à ce jour. Cependant, la littérature scientifique expose 2 hypothèses; soit la force de constriction surmonte l'activité constante de l'anneau ou le réarrangement de l'anneau fait partie intégrante de la force. La première hypothèse implique qu'une protéine telle que FtsA fournisse l'énergie nécessaire à la constriction de l'anneau. Quant à l'hypothèse suggérant un réarrangement de l'anneau, elle regroupe 3 différents modèles. Tout d'abord, la dynamique même de l'anneau pourrait être à la base de sa constriction si la perte de molécules de FtsZ surpasse le gain. Ce modèle dépend de l'activité enzymatique de FtsZ car la relâche de molécules de l'anneau est couplée et proportionnelle à son activité GTPase (Stricker, Maddox et al. 2002). Cela est soutenu par le fait qu'une surproduction de FtsZ inhibe la constriction de l'anneau et que ce dernier dépolymérise complètement à la fin de la constriction (Den Blaauwen, Buddelmeijer et al. 1999; Errington, Daniel et al. 2003). Un second modèle suggère que la constriction découle d'un glissement des polymères de FtsZ qui réduirait la circonférence de l'anneau. Le troisième modèle implique un repliement des filaments de FtsZ suite au changement de conformation des monomères occasionné par l'hydrolyse du GTP (Errington, Daniel et al. 2003).

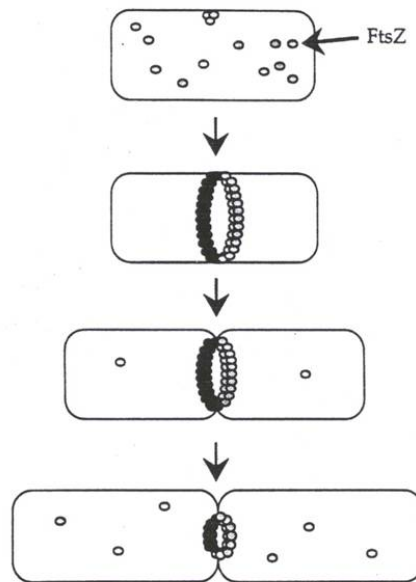


Figure 16. Représentation schématique de la polymérisation et de la constriction de l'anneau FtsZ (Lutkenhaus and Addinall 1997).

3.3.1.2.7 Inhibiteurs endogènes

Il existe plusieurs inhibiteurs cellulaires endogènes de FtsZ dont SulA et MinC. SulA empêche la localisation cellulaire et la formation de l'anneau en bloquant spécifiquement la polymérisation et l'activité GTPase de FtsZ lorsque l'ADN bactérien est endommagé. Ce système SOS prévient la division cellulaire et la propagation des génomes altérés chez les souches bactériennes RecA- qui ne possèdent pas de machinerie de réparation d'ADN (Lutkenhaus and Addinall 1997). L'inhibiteur endogène MinC décrit dans la section portant sur la localisation cellulaire déstabilise les polymères en empêchant la formation de l'anneau (Pichoff and Lutkenhaus 2001). En fait, MinC prévient la polymérisation de FtsZ et sa colocalisation avec la protéine ZipA (Errington, Daniel et al. 2003).

3.3.1.3 FtsA

La protéine cytoplasmique FtsA joue un rôle essentiel mais encore nébuleux dans le processus de division cellulaire bactérien. Cette protéine de 417 acides aminés et 42,6 KDa s'avère beaucoup moins bien caractérisée que FtsZ mais elle n'en est pas pour autant moins intéressante.

3.3.1.3.1 Conservation dans l'évolution

La protéine de division cellulaire FtsA est la plus conservée après FtsZ et elle se retrouve dans presque toutes les espèces bactériennes caractérisées à ce jour à l'exception des archéobactéries. FtsA montre une forte homologie structurale avec l'actine et elle appartient à la famille de protéines liant l'ATP regroupant également l'actine, Hsp70 et les kinases des sucres (Feucht, Lucet et al. 2001). Les études phylogénétiques suggèrent que FtsA et l'actine découlent de l'évolution d'un ancêtre commun suite à une duplication et une fusion de gènes (van den Ent, Amos et al. 2001).

3.3.1.3.3 Structure tridimensionnelle

La structure cristalline de la protéine FtsA de *Thermotoga maritima* a récemment été résolue. Cette protéine est constituée de 2 domaines distincts réunis par un inter domaine

liant l'ATP (van den Ent and Lowe 2000). La figure 17 illustre la conformation des deux domaines et du site actif de l'enzyme situé dans l'inter domaine.

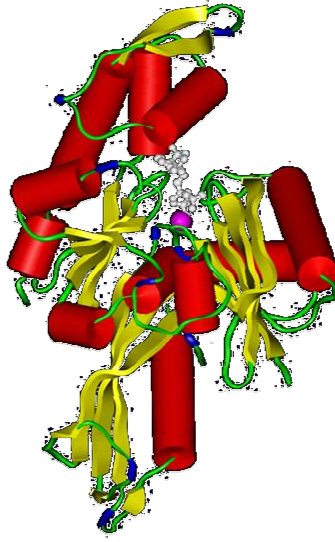


Figure 17. Structure cristalline de FtsA de *Thermotoga maritima* résolue à 1.9 Angström; les tubes rouges représentent les hélices α alors que les feuillets β apparaissent en jaune et les boucles en vert, le site actif présent au centre de la figure renferme l'ATP représenté par la molécule grise ainsi que le cofacteur magnésium schématisé par la sphère mauve (van den Ent and Lowe 2000).

3.3.1.3.2 Activité ATPase

La caractérisation biochimique de FtsA révèle la présence d'un site liant et hydrolysant l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). FtsA possède une forte affinité pour l'ATP et une faible affinité pour l'ADP (Adénosine Di-Phosphate) et le GTP. De plus, la présence du cofacteur Mg^{2+} s'avère essentielle pour l'activité ATPase de FtsA *in vitro* (Feucht, Lucet et al. 2001)

3.3.1.3.4 Localisation cellulaire

La localisation de FtsA dans le divisosome dépend uniquement de FtsZ et elle suit de près la formation de l'anneau (Pichoff and Lutkenhaus 2002). De plus, il a été démontré que le résidu conservé Trp 415 de FtsA s'avère essentiel pour sa localisation (Yim, Vandebussche et al. 2000). Finalement, le positionnement de FtsA est indépendant de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP mais il dépend autant des portions N et C-terminales ainsi que de l'inter domaine (Ma, Ehrhardt et al. 1996).

3.3.1.3.5 Fonction structurale de stabilisation de l'anneau FtsZ

L'anneau de division FtsZ peut se former sans FtsA mais il ne peut se contracter afin de séparer physiquement la cellule mère (Begg, Nikolaichik et al. 1998). Ainsi, le rôle de stabilisation de l'anneau de FtsA s'avère essentiel au déroulement de la division cellulaire bactérienne. Une hypothèse suggère que FtsA pourrait consolider l'anneau en inhibant l'activité GTPase de FtsZ requise pour la dépolymérisation (Romberg, Simon et al. 2001).

3.3.1.3.6 Interaction avec PLP3

Les preuves appuyant la présence d'une interaction entre FtsA et PLP3 s'accumulent dans la littérature. La protéine membranaire PLP3 possède une activité transpeptidase et transglycosidase essentielle à la synthèse du peptidoglycan de septation. Les archéobactéries ne possèdent pas de peptidoglycan ni de protéine FtsA et cela renforce le lien entre ces 2 protéines (Nanninga 1998). De plus, une mutation spécifique de FtsA affecte la capacité de PLP3 à lier l'ampicilline puis la surexpression de FtsA provoque une accumulation de peptidoglycan intracellulaire. Finalement, FtsA s'avère essentielle au recrutement et à la localisation de PLP3 (Weiss, Chen et al. 1999). Une hypothèse suggère que FtsA assume le lien entre FtsZ et PLP3 afin de coordonner la polymérisation et la constriction de l'anneau avec la synthèse de peptidoglycan (Dai and Lutkenhaus 1992).

3.3.1.3.7 FtsA en tant que protéine motrice

Plusieurs auteurs suggèrent que FtsA pourrait jouer le rôle de protéine motrice en agissant sur FtsZ afin de rapprocher les unités de divisosome au cours de la septation (Nanninga 1998; Feucht, Lucet et al. 2001; Errington, Daniel et al. 2003). Cette hypothèse s'avère des plus plausibles car FtsA possède une activité enzymatique ATPase pouvant fournir l'énergie nécessaire à la constriction cellulaire. De plus, FtsA montre une forte homologie structurale avec l'actine qui consiste en une protéine motrice eucaryote. Chez *B. subtilis*, le nombre de molécules de FtsA s'avère suffisant pour la formation d'un anneau contracteur (Feucht, Lucet et al. 2001). Finalement, une autre évidence provient du fait que l'anneau FtsZ ne peut pas se contracter sans la présence de FtsA (Begg, Nikolaichik et al. 1998).

3.3.1.4 Interaction FtsZ-FtsA

Les protéines FtsZ et FtsA interagissent étroitement et spécifiquement ensemble afin de mener à bien le processus de division cellulaire. Cette interaction s'avère particulièrement intéressante en tant que cible thérapeutique et elle inspire de nombreuses recherches.

3.3.1.4.1 Ratio FtsZ :FtsA

Une expérience clé démontre que le ratio cellulaire FtsZ :FtsA est critique pour la division cellulaire. L'équipe du Dr Lutkenhaus a tout d'abord montré que la surproduction de FtsZ altère le processus de division en entraînant la production de mini cellules non viables (Dai and Lutkenhaus 1992). Par la suite, ce groupe de recherche a prouvé que la fonction de la protéine FtsZ est affectée lorsqu'elle se retrouve en surplus par rapport à FtsA. Ainsi, une surproduction équivalente de FtsA rétablit la division cellulaire en restituant le ratio moléculaire adéquat. L'analyse du nombre de FtsZ et de FtsA par immunobuvardage quantitatif indique que chaque cellule de *E. coli* renferme 20 000 molécules de FtsZ et 200 molécules de FtsA. Le ratio de 100 pour 1 se maintient grâce à une régulation stricte qui dépend de l'efficacité différentielle de trois RBS (Ribosome Binding Site) et d'un promoteur additionnel pour *ftsZ* (Dai and Lutkenhaus 1992). Chez *B. subtilis*, le ratio FtsZ :FtsA se chiffre à 5 pour 1 et chaque cellule contient 1000 molécules de FtsA. Ainsi, la formation d'un anneau FtsA s'avère possible chez *B. subtilis* mais improbable chez *E. coli* étant donné le faible nombre de molécules de FtsA (Feucht, Lucet et al. 2001). La formation d'un tel anneau est d'ailleurs appuyée par l'interaction FtsA-FtsA médiée par la région C-terminale de cette protéine (Yim, Vandenbussche et al. 2000). Les hypothèses élaborées afin d'expliquer la différence de ratio s'appuient sur les divergences fondamentales entre les bactéries à gram négatif tel *E. coli* et à gram positif comme *B. subtilis*. Ainsi, le ratio élevé retrouvé chez les bactéries à gram positif pourrait compenser l'absence de ZipA. En effet, les fonctions biologiques de FtsA et de ZipA se recoupent car elles recrutent toutes deux FtsK au site de division et l'anneau FtsZ peut se former avec seulement FtsA ou ZipA (Pichoff and Lutkenhaus 2002). De plus, il a récemment été démontré qu'une seule mutation dans FtsA élimine le besoin de ZipA chez les bactéries à Gram négatif (Geissler, Elraheb et al. 2003). Finalement, les bactéries à Gram positif possèdent davantage de peptidoglycan tel que montré par la figure 18 et elles subissent une

pression osmotique interne supérieure aux bactéries à Gram négatif; leur division cellulaire demande donc plus d'énergie. Ainsi, le plus grand nombre de molécules de FtsA chez les bactéries à Gram positif répond peut-être à un besoin supérieur en hydrolyse d'ATP (Feucht, Lucet et al. 2001).

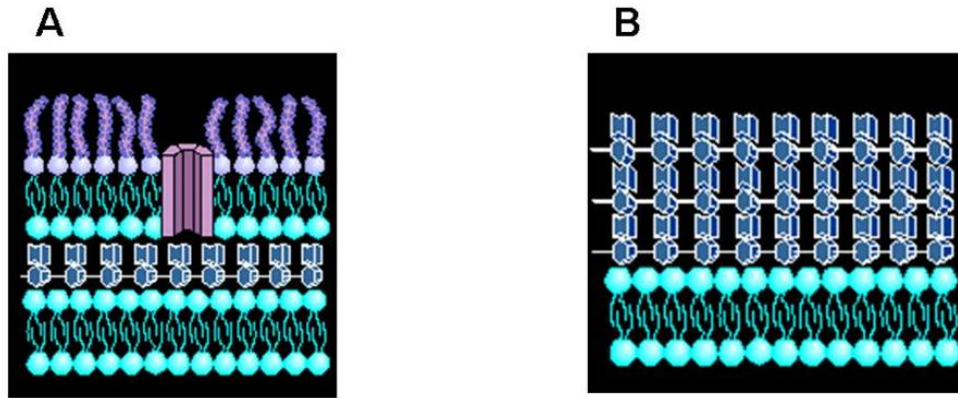


Figure 18. Structure de la paroi des bactéries (A) à Gram négatif composée d'une membrane interne et d'une membrane externe séparées par une mince couche de peptidoglycan et (B) à Gram positif constituée d'une membrane interne et d'une épaisse couche de peptidoglycan (uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/gramneg.gif & [imgrefurl=http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html)).

3.3.1.4.2 Nature de l'interaction

L'interaction entre FtsZ et FtsA a été confirmée par le système de Yeast Two-hybrid ainsi que par microscopie électronique chez *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Caulobacter crescentus*, *R. meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens* (Feucht, Lucet et al. 2001). Les études phylogénétiques démontrent que l'interaction directe et spécifique entre FtsA et FtsZ est conservée dans l'évolution bactérienne. De plus, ces protéines semblent évoluer ensemble et elles sont cotranscrites dans les génomes bactériens (Ma, Sun et al. 1997). Une hypothèse suppose que FtsZ pourrait engendrer un changement de conformation qui favoriserait l'activité enzymatique ATPase de FtsA requise pour la constriction de l'anneau (van den Ent and Lowe 2000). Enfin, l'interaction FtsZ-FtsA s'entoure encore de mystère mais il ne fait plus aucun doute qu'elle est essentielle à la division cellulaire (Yan, Pearce et al. 2000).

3.3.1.4.3 Séquences impliquées

FtsA interagit avec les 70 derniers acides aminés de la région C-terminale de FtsZ (Haney, Glasfeld et al. 2001). Cette région de FtsZ renferme 8 à 10 acides aminés hautement conservés chez la majorité des espèces bactériennes à l'exception des archéobactéries qui ne détiennent pas d'analogue de FtsA. Le résidu Phe 376 s'avère particulièrement important mais il est possible que FtsA interagisse également avec une autre portion de FtsZ et que la structure tridimensionnelle de FtsA soit requise pour l'interaction (Ma, Ehrhardt et al. 1996; Yan, Pearce et al. 2000). Finalement, la portion C-terminale de FtsZ nuit à sa polymérisation et il se pourrait que la liaison de FtsA au C-terminal de FtsZ favorise la polymérisation.

3.3.1.5 Caractéristiques de FtsZ et de FtsA en tant que cible

FtsZ s'avère un excellent choix de cible car il s'agit de la protéine la plus importante pour la division cellulaire. En effet, elle se retrouve en haut de la hiérarchie du recrutement protéique et elle forme l'anneau de constriction. FtsZ est la protéine bactérienne la plus conservée dans l'évolution et des mutations dans cette dernière entraînent un phénotype létal (Errington, Daniel et al. 2003). Finalement, l'activité enzymatique quantifiable de FtsZ peut être exploitée afin de cribler des inhibiteurs. FtsA constitue également une bonne cible thérapeutique car elle est conservée puis essentielle pour la constriction de l'anneau et pour le recrutement protéique. Finalement, l'insertion de mutations dans FtsA mène à un phénotype létal et l'activité ATPase de cette enzyme permet de cribler de potentiels inhibiteurs. De plus, l'interaction FtsZ-FtsA représente une cible intéressante car elle est essentielle puis elle possède un avantage considérable par rapport à l'activité enzymatique protéique. En fait, une inhibition de 50 % de cette interaction bloque la division alors que la majorité des protéines peuvent remplir leur fonction biologique avec une inhibition de 95 %. FtsZ et FtsA échappent cependant à la règle car une inhibition de 50 % d'une de ces protéines débalance leur ratio et inhibe la division. L'interaction FtsZ-FtsA demeure une cible avantageuse car elle est extrêmement sensible et elle est beaucoup plus spécifique qu'une enzyme GTPase ou ATPase (Haney, Glasfeld et al. 2001). Le désavantage majeur des ces cibles cytoplasmiques réside dans le fait que les inhibiteurs potentiels doivent pénétrer les membranes et la paroi bactérienne afin de les atteindre.

3.4 La présentation phagique

La recherche conventionnelle de nouveaux antimicrobiens constitue un processus laborieux et de longue haleine. L'exploration de la diversité génétique via la technique de présentation phagique permet quant à elle une sélection rapide et efficace de petits ligands peptidiques interagissant avec une cible thérapeutique déterminée.

3.4.1 Principe de la technique

La présentation phagique réfère à un criblage moléculaire de banques de bactériophages M13. Ces dernières renferment 1000 copies de chacune des 10^9 combinaisons peptidiques distinctes fusionnées à la protéine mineure pIII du phage qui se présentent sous la forme de 12-mer, de 7-mer ou de C7C (7 acides aminés flanqués de 2 cystéines). La protéine pIII se retrouve en 5 copies à la surface de la capsid du phage et elle permet l'adhésion au pili sexuel de *E. coli* requise pour l'infection (Hoess 2001). La spécificité de la technique est maximisée par les 3 rondes de biocriblage au cours desquelles la rigueur des lavages augmente puis le temps de contact entre les phages et la protéine d'intérêt diminue (Kay, Kasanov et al. 2001). La figure 19 illustre le principe des 3 rondes où les phages adhésifs à la protéine cible sont élués avec de la glycine à pH acide puis de façon compétitive.

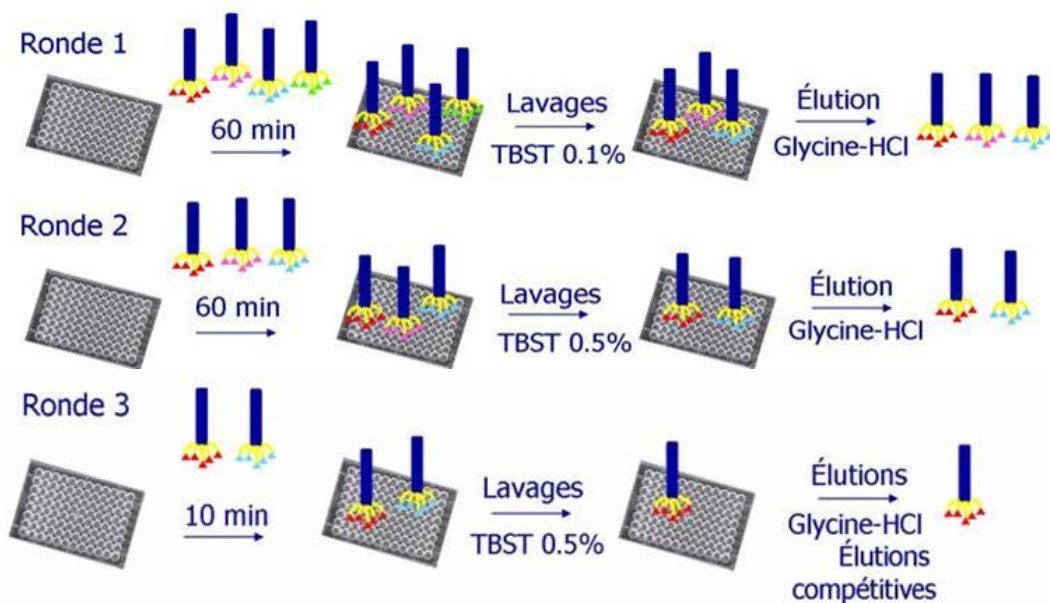


Figure 19. Schéma expérimental de la présentation phagique.

La figure 20 décrit une ronde typique de biocriblage où les différentes banques de phages sont mises en contact avec la protéine cible fixée dans le fond d'un puits. Par la suite, les lavages éliminent les bactériophages non spécifiques et l'élution permet de récolter les phages adsorbés à la protéine. Finalement, les phages sélectionnés subissent une amplification afin de constituer le matériel de départ nécessaire pour amorcer une seconde ronde (Kay, Kasanov et al. 2001)

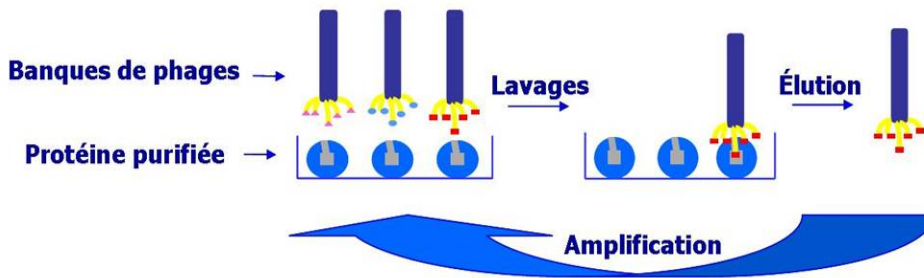


Figure 20. Représentation schématique d'une ronde de biocriblage.

Suite à l'élution des phages spécifiques de la dernière ronde de biocriblage, l'ADN phagique de 10 à 20 phages purifiés est séquencé puis les analyses bioinformatiques identifient les peptides sélectionnés ainsi que les consensus peptidiques.

3.4.2 Pouvoirs et limitations

L'avantage majeur de la présentation phagique réside dans la diversité moléculaire qui permet l'identification rapide et efficace de peptides spécifiques pour une cible d'intérêt pharmacologique (Peczuh and Hamilton 2000). De plus, la construction de banque de phages spécialisées, de banques d'anticorps et d'ADN complémentaires repousse les limites et permet l'identification de ligands peptidiques pour n'importe quelle protéine (Sidhu 2000). Cependant, la présentation phagique comporte certains désavantages qui méritent une attention particulière. Tout d'abord, les éluions ne permettent pas de décrocher tous les phages adsorbés à la surface des protéines et les phages les plus affins et intéressants y demeurent fixés. Deuxièmement, les diverses fusions peptidiques peuvent altérer le pouvoir réplcatif ou infectieux des phages et cela peut biaiser les résultats. Finalement, les banques de phages ne renferment pas toutes les combinaisons peptidiques possibles et quelques acides aminés s'y trouvent sous représentés (Hoess 2001).

3.4.3 Applications

3.4.3.1 *Peptides inhibiteurs*

Il a été démontré que la majorité des peptides sélectionnés par présentation phagique se lient aux régions d'importance biologique présentes sur la protéine d'intérêt. Ainsi, la plupart des peptides identifiés constituent des inhibiteurs spécifiques des protéines cibles (Hoess 2001). Cependant, les peptides inhibiteurs traînent une mauvaise réputation car ils possèdent une faible demi-vie puis ils se distribuent difficilement dans les tissus. Par contre, les bactéries, les champignons, les végétaux ainsi que les eucaryotes produisent des peptides antimicrobiens en guise de première ligne de défense. Par exemple, les défensines humaines font partie intégrante de l'immunité innée et jouent un rôle important au niveau des défenses des muqueuses (Zasloff 2002). Ces peptides cationiques linéaires proviennent de la dégradation protéolytique d'un précurseur et agissent en déstabilisant les membranes microbiennes. Ce mode d'action n'encourage pas la résistance microbienne qui ne s'est pas encore amorcée et cela contribue à la vague d'intérêt envers les peptides inhibiteurs (Breithaupt 1999; Zasloff 2002). Ainsi, les peptides sélectionnés par présentation phagique sont dignes d'intérêt et il convient de les façonner afin de maximiser leurs propriétés biochimiques et pharmacologiques.

3.4.3.2 *Modifications chimiques et peptidomimétisme*

Les modifications chimiques apportées aux peptides incluent la cyclisation, l'ajout de liaisons esters ou de noyaux d'acides gras et de sucres aminés qui peuvent accroître leur stabilité, leur liposolubilité ainsi que leur pouvoir inhibiteur. De plus, le remplacement par des acides aminés inhabituels ou de configuration D et l'ajout de prolines contribuent grandement à la résistance des peptides contre la dégradation protéolytique. Plusieurs peptides antimicrobiens riches en proline isolés chez les insectes empruntent les systèmes de pompes d'import bactériens pour atteindre le cytoplasme alors l'ajout de prolines pourrait également contribuer à la pénétration cytoplasmique des peptides (Walsh 2003). Finalement, l'attribution de charges positives aux peptides sélectionnés peut s'avérer extrêmement avantageuse. En effet, les peptides cationiques s'associent aux membranes

microbiennes chargées négativement et ils se lient au site de fixation cationique du LPS. Ils migrent ensuite à travers la paroi de peptidoglycan puis traversent directement la membrane plasmique ou se regroupent sous forme de micelles en formant des canaux qui déstabilisent les membranes. De plus, les peptides cationiques détiennent une spécificité pour les membranes procaryotes qui ne renferment pas de cholestérol et qui présentent des lipides chargés négativement. Ainsi, le gradient électrochimique de ces membranes se distingue du gradient des membranes eucaryotes qui comprennent du cholestérol et des lipides neutres (Zaslouff 2002). Finalement, il a été démontré que l'ajout d'un lien carbamate augmente la spécificité des peptides pour les membranes bactériennes tout en diminuant les effets néfastes sur les cellules eucaryotes (Lee and Oh 2000). D'autre part, le peptidomimétisme peut mettre à jour de nouvelles molécules pharmacologiques en imitant la structure et le mode d'action des peptides inhibiteurs. Le peptidomimétisme de base réfère à la synthèse organique de petites molécules qui miment la structure tridimensionnelle des peptides ou de fragments de peptides. Cela permet de conserver ou même d'améliorer le pouvoir inhibiteur des peptides tout en éliminant la problématique de la demi-vie et de la biodisponibilité (Nefzi, Dooley et al. 1998). Quant à l'imitation du mode d'action des peptides, cela requiert de multiples études préliminaires telles que la co-cristallographie de la cible moléculaire et du peptide inhibiteur ainsi que la modélisation informatique. La connaissance approfondie du mode d'action du peptide et des liaisons moléculaires impliquées permet alors d'orienter la synthèse correctement. En perspective, les peptides isolés par présentation phagique peuvent également servir de ligand dans des essais de criblage par compétition afin d'identifier de petites molécules organiques possédant une affinité supérieure (Christensen, Gottlin et al. 2001).

4. Mise en situation du projet de recherche

4.1 Problématique

La recrudescence des infections bactériennes et l'occurrence de la résistance accrue contre la plupart des agents antimicrobiens engendrent un besoin urgent de nouvelles classes d'antibiotiques. De plus, le cas du pathogène opportuniste *P. aeruginosa* doit être pris en considération car il regorge de mécanismes de résistance puis il engendre de multiples infections intraitables et mortelles.

4.2 Hypothèse et objectifs

Le programme de recherche proposé vise au développement accéléré d'antimicrobiens contre de nouvelles cibles bactériennes. Ainsi, nous exploitons la machinerie de division cellulaire procaryote en tant que cible. Plus particulièrement, les protéines essentielles FtsZ et FtsA représentent de nouvelles cibles thérapeutiques identifiées par génomique bactérienne et par des analyses récentes du laboratoire. L'hypothèse soutenue suggère que des inhibiteurs de l'activité enzymatique de FtsZ et de FtsA bloqueront spécifiquement la division cellulaire bactérienne en engendrant un phénotype létal. En guise d'objectifs, le criblage des protéines FtsZ et FtsA de *P. aeruginosa* par présentation phagique devrait mener à l'identification de peptides inhibiteurs qui seront caractérisés biochimiquement et structuralement. Ce programme de recherche devrait donc mener au développement des premiers agents antimicrobiens inhibant la division cellulaire bactérienne tout en apportant de nouvelles connaissances fondamentales sur le processus de division.

4.3 Résumé de la méthodologie

Les gènes *ftsA* et *ftsZ* de *P. aeruginosa* ont tout d'abord été clonés dans le vecteur d'expression pET30a et fusionnés avec une étiquette histidine puis les protéines ont été surexprimées chez *E coli* BL21 (λ DE3). FtsZ a été purifiée par chromatographie d'affinité au nickel alors que FtsA a été renaturée suite à la solubilisation des corps d'inclusion

purifiés. L'identité et l'activité biochimique respectives de ces protéines ont été confirmées par séquençage en N-terminal puis par essais enzymatiques sur CCM (Chromatographie sur Couche Mince). Ensuite, le criblage des banques de bactériophages M13 12-mer et C7C a été effectué avec les 2 enzymes actives. Les phages adhérents à FtsZ ont été élués avec de la glycine à pH acide puis de façon compétitive avec le substrat de l'enzyme, un analogue non hydrolysable du substrat ainsi qu'avec FtsA. En ce qui concerne les phages adsorbés à FtsA, ils ont été élués avec de la glycine à pH acide puis de façon compétitive avec le substrat de l'enzyme, un analogue non hydrolysable du substrat ainsi qu'avec FtsZ. Enfin, l'ADN a été extrait des phages et les peptides correspondants ont été identifiés. La spécificité de l'interaction entre les peptides sélectionnés et FtsA ou FtsZ a été analysée par ELISA. Les consensus peptidiques identifiés contre FtsZ par présentation phagique ont été synthétisés, leur activité inhibitrice a été caractérisée et leur CI_{50} (Concentration Inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique de l'enzyme) a été déterminée par CCM. Finalement, les peptides démontrant la plus grande affinité pour FtsA ont également été synthétisés et leur caractérisation est en cours. La figure 21 résume la méthodologie employée.

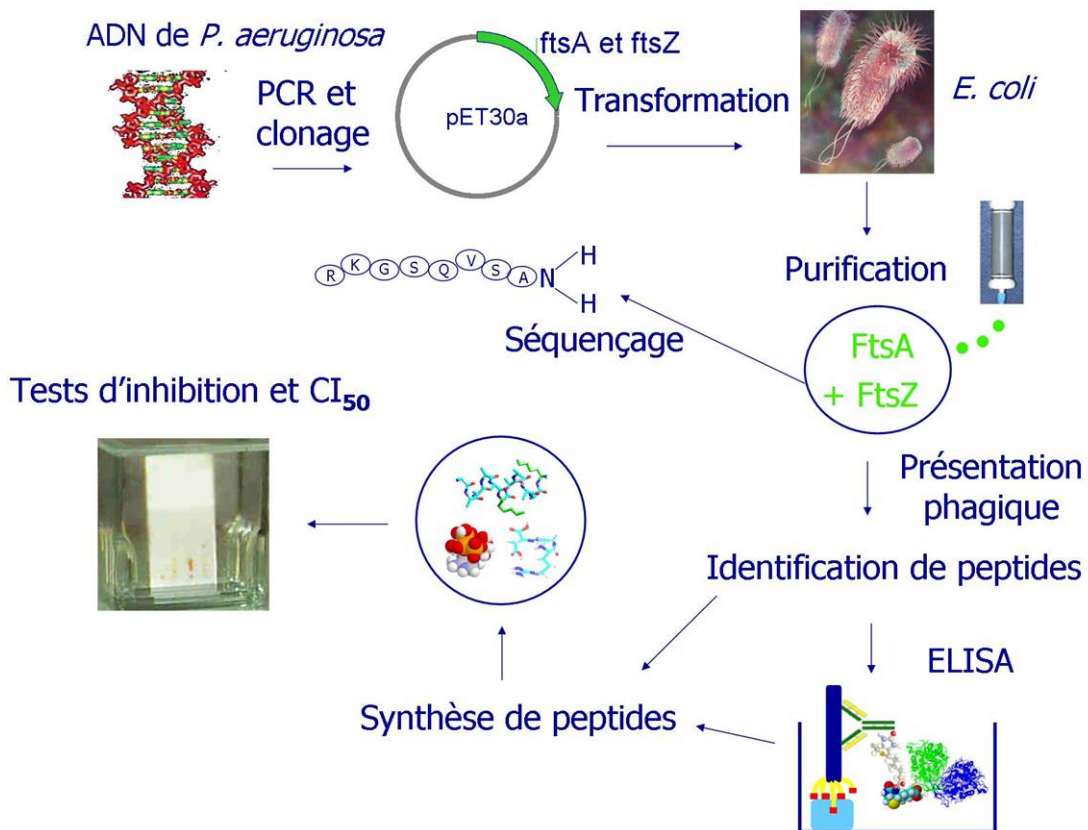


Figure 21. Schéma expérimental résumant la méthodologie.

Chapitre 2

Résultats et discussion

Les résultats issus de ce projet de maîtrise sont présentés sous forme de manuscrit d'article scientifique rédigé en anglais en vue d'une soumission aux éditeurs de la revue Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Contribution des auteurs

Trois auteurs signent la réalisation du manuscrit d'article scientifique faisant l'objet de ce second chapitre de mémoire. En tant que première auteure, j'ai réalisé une revue de littérature détaillée afin d'apporter ma vision du projet et de suggérer des expériences à entreprendre afin d'explorer les hypothèses émises. J'ai également réalisé l'ensemble des expériences décrites puis j'ai analysé les résultats afin d'en faire grandir le projet. Enfin, j'ai rédigé ce manuscrit et élaboré les figures et tableaux résumant les résultats. Ce projet n'aurait pris en tel envol sans la contribution du Dr François Sanschagrín qui m'a guidée et supportée quotidiennement au laboratoire. Ses connaissances fondamentales et pratiques se reflètent tout au long du manuscrit et sa logique scientifique m'a aidée à mener à bien ce projet. L'accomplissement scientifique traduit dans ce chapitre de mémoire résulte de la brillante conceptualisation du projet par le Dr Roger C. Levesque. L'idée de départ consistant à cibler les protéines bactériennes essentielles à la division cellulaire afin de développer une classe innovatrice d'antimicrobiens s'avère excellente et cette perspective m'a permis de me dépasser. Le Dr Levesque a sélectionné judicieusement la méthodologie utilisée et cela m'a permis de sélectionner des inhibiteurs spécifiques. De plus, il a contribué à la réalisation de ce projet en élaborant un échéancier scientifique réalisable, en orientant le projet semaine après semaine et en me fournissant un environnement de travail propice à la réussite.

Résumé

Identification d'inhibiteurs protéiques contre les protéines de division cellulaire FtsZ et FtsA de *Pseudomonas aeruginosa* en tant que nouvelle classe potentielle d'antimicrobiens

L'ère révolutionnaire des antibiotiques est aujourd'hui dépassée par la capacité évolutive des microorganismes à développer des mécanismes de résistance. D'ailleurs, la résistance accrue du pathogène opportuniste *P. aeruginosa* diminue l'efficacité de traitement et met en danger les patients immuno-déprimés ou souffrants de fibrose kystique. Dans le but d'identifier de nouveaux agents antimicrobiens, nous utilisons la machinerie de division cellulaire bactérienne en tant que cible. Nous étudions plus particulièrement les protéines FtsZ et FtsA de *P. aeruginosa*; deux protéines de division cellulaire essentielles et hautement conservées. Les gènes *ftsZ* and *ftsA* ont tout d'abord été clonés et les protéines ont été respectivement purifiées par chromatographie et par renaturation de corps d'inclusion purifiés. Le séquençage en N-terminal a confirmé l'identité des protéines et un essai de chromatographie sur couche mince a également confirmé l'activité enzymatique respective de FtsZ et FtsA. Un essai de fixation à l'UV a démontré que FtsZ lie préférentiellement le GTP et que FtsA fixe préférentiellement l'ATP parmi les 4 nucléotides marqués. Les enzymes purifiées ont ensuite été utilisées pour identifier des peptides inhibiteurs avec la technique de présentation phagique. Les phages possédant une affinité spécifique pour FtsZ ou FtsA ont été élués selon 4 conditions spécifiques; la glycine à pH acide, le substrat de l'enzyme, un analogue non-hydrolysable du substrat et

avec FtsA pour FtsZ et vice-versa. Nous avons identifié 3 consensus peptidiques contre FtsZ et 2 contre FtsA. La spécificité de l'interaction entre les peptides sélectionnés et FtsZ ou FtsA a été évaluée par ELISA et cela a permis d'identifier les peptides les plus affins. Les 3 consensus peptidiques sélectionnés contre FtsZ ont été synthétisés et testés sur l'activité GTPase de FtsZ. Les 2 peptides C7C inhibent l'activité enzymatique de FtsZ avec des valeurs de CI_{50} de 0.45 mM et 1.2 mM alors que le peptide 12-mer montre une CI_{50} de 5 mM. Ainsi, la technique de présentation phagique utilisée sur de nouvelles cibles bactériennes a permis la découverte de peptides inhibiteurs et le peptidomimétisme devrait permettre le développement d'une nouvelle classe d'agents antimicrobiens.

**Identification of *Pseudomonas aeruginosa* FtsZ and FtsA Peptide
Inhibitors as a Potential Novel Class of Antimicrobials**

Catherine Paradis-Bleau, François Sanschagrín and Roger C. Levesque*

*Centre de recherche sur la fonction, structure et ingénierie des protéines, Faculté de
médecine, pavillon Charles-Eugène-Marchand,¹ Université Laval, Sainte-Foy, Québec,
Canada G1K 7P4*

Running title: Novel FtsZ and FtsA peptide inhibitors

*Corresponding author. Mailing address: Centre de recherche sur la fonction, structure et ingénierie des protéines, Faculté de médecine, pavillon Charles-Eugène-Marchand, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4. Phone: (1) (418) 656-3070. Fax: (1) (418) 656-7176. E-mail: rclevesq@rsvs.ulaval.ca.

Abstract

The revolutionary era of antibiotics has been overwhelmed by the evolutionary capacity of microorganisms to develop resistance. The acute resistance of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* lowers the treatment efficiency of infected cystic fibrosis patients and immuno-compromised individuals. In the perspective of identify new antimicrobial agents, we are using the bacterial cell division machinery of as a new target. We study *P. aeruginosa* FtsA and FtsZ; two essential and highly conserved cell division proteins. ftsZ and ftsA were cloned and proteins were respectively purified by a single nickel affinity chromatography step and by refolding of purified inclusion bodies. N-terminal sequencing confirms the identity of both proteins and a TLC assay confirms the enzymatic activity of each enzyme. A UV cross-linking showed that FtsZ binds preferentially GTP and that FtsA binds preferentially ATP among the 4 nucleotides used as substrates. Purified enzymes were used to screen for GTPase and ATPase peptide inhibitors with the phage-display technique using 12-mer and the C7C-mer phage libraries. Specifically bounded phages were eluted with 4 different conditions; acidic glycine, substrate, non-hydrolysable substrate analogue and with FtsA against FtsZ and vice-versa. We identified 3 consensus peptide sequences against FtsZ and two against FtsA. The specificity of the interaction between selected peptide and FtsZ or FtsA was analysed by ELISA and revealed the best binding peptides. The 3 FtsZ consensus peptides have been synthesized and tested on the GTPase activity of FtsZ. The C7C-mer peptides showed inhibition of FtsZ GTPase activity with an IC₅₀ value of 0.45 mM and 1.2 mM hence the 12-mer peptide showed IC₅₀ value of 5 mM. The phage display technique was helpful in the discovery of new promising peptides and peptidomimetism will allow the development of new antimicrobial agents.

Introduction

The alarming increase and spread of resistance among emerging and re-emerging bacterial pathogens to all clinically useful antibacterial agents is one of the most serious public health problems of the last decade {Normark, 2002 #6;Cohen, 2000 #1;Fauci, 2001 #11}. This critical situation made it highly imperative to design novel classes of antibacterial agents with new modes of action against novel bacterial targets. These innovative future drugs should also circumvent the amazing adaptive bacterial adaptation capacity to develop various resistance mechanisms for evading their action.

The recent development in genomics, proteomics and bio-informatics areas allows the identification of many uncommon bacterial targets {Projan, 2002 #22;Breithaupt, 1999 #20}. The perfect bacterial target should be essential for bacterial survival and pathogenesis, highly conserved in bacterial evolution but not in the animal kingdom, easily accessible and sufficiently expressed during the infection in the host. To meet these criteria, we selected the prokaryotic cell division machinery as a tool to identify the most attractive new targets. This choice is based upon the intrinsic properties of the cell division process encoding essential proteins and giving a lethal phenotype when inhibited. These proteins are highly conserved in bacterial species but absent in eukaryotic cells and extremely sensitive to inhibition because the process depends on specific protein cascade recruitment {Errington, 2003 #51;Projan, 2002 #22;Dai, 1992 #29}. No new antimicrobial agent specifically targets this process and it will be of interest to see if the prokaryotic kingdom possesses any resistance mechanisms against cell division inhibitors. An additional observation that confirms the validity of the cell division machinery as targets is that intrinsic division inhibitors MinC {Errington, 2003 #51} and SulA {Cordell, 2003 #63} which constitute active regulator of cell division do not select resistance. However, the bacterial cell division process possesses some limitations as drug target due to its cytoplasmic localization. Among bacterial division proteins, we chose FtsZ and FtsA as specific targets. These two most conserved proteins {van den Ent, 2001 #50} presumably constitute key bacterial targets because of their essential enzymatic activities {Errington, 2003 #51} that can be exploited to screen and analyse inhibitory molecules. FtsZ is the most important cell division protein at the top of hierarchic recruitment in the divisosome and its polymerisation into the Z-ring allows the physical separation of daughter cells

{Lutkenhaus, 1997 #30}. The FtsA protein is also essential for protein recruitment in the divisosome {Pichoff, 2002 #32} and for the constriction process of the Z-ring {Begg, 1998 #38}. Accumulating evidences suggest that FtsA plays the role of a motor protein in providing energy for constriction {Nanninga, 1998 #31;Feucht, 2001 #27;Errington, 2003 #51}. Finally, the essential FtsZ-FtsA protein-protein interaction {Yan, 2000 #39} represent a more sensitive and specific target than the GTPase FtsZ and ATPase FtsA alone {Haney, 2001 #41}. Thus, these cytoplasmic essential enzymes and interaction remain to be fully characterized in the aim of developing antibacterials with novel modes of action.

In order to identify specific inhibitors of FtsZ and FtsA enzymes, we used phage-display which represents a powerful technique for the selection of short peptide ligands having high binding affinities to proteins of interest among a large pool of random peptide permutations {Christensen, 2001 #57;Sidhu, 2000 #56}. This approach was already proved useful for the detection of various enzyme inhibitors {Hyde-DeRuyscher, 2000 #64} and hence became one of the valuable tools for antibacterial drug discovery.

In this paper, we first describe the purification and biochemical characterization of FtsZ and FtsA cell division proteins. We then systematically exploit the use of two different phage display libraries and identification of specific peptides. Three rounds of phage display screening led to the identification of clear consensus peptide sequences presumably active against FtsZ and FtsA. High affinity binding peptides were also identified. The three FtsZ related synthesized peptides showed specific inhibition of its GTPase enzymatic activity. In order to obtain promising lead compounds with appropriate pharmacologically properties, inhibitory peptides will undergo many chemical modifications and their sequences will constitute the core for the synthesis of libraries of peptidomimetic molecules.

Materials and methods

Plasmid construction, bacterial strains, reagents and media

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, Ontario, Canada) unless otherwise indicated. Restriction endonucleases and T4 ligase were obtained from New England Biolabs (Mississauga, Ontario, Canada). Agarose gel electrophoresis and plasmid DNA preparations were performed according to published procedures {Sambrook, 1989 #60}. Recombinant plasmids containing *P. aeruginosa* PAO1 *ftsZ* and *ftsA* genes were conserved in *Escherichia coli* NovaBlue, *endA1 hsdR17(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^qZΔ *MI5::Tn10*] (Novagen, Madison, WI, USA) prior to protein synthesis in *E. coli* BL21, F' *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) (Novagen). TBS was 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl. TBST was TBS + 0.1% [v/v] Tween-20. PEG/NaCl was 20% [w/v] polyethylene glycol-8000, 2.5 M NaCl. Agarose Top (per liter) was: 10 g Bacto-Tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 1 g MgCl₂•6H₂O, 7 g agarose. IPTG/Xgal was 1.25 g isopropyl β-D-thiogalactoside (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) and 1 g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside dissolved in 25 mL dimethyl formamide. LB/IPTG/Xgal plates were prepared by autoclaving 1 L of LB broth (EM Science, Gibbstown, NJ, USA) + 15 g agar, the medium was cooled to < 70°C, 1 mL IPTG/Xgal was added, plates were stored at 4°C in the dark. Host strain used for production, amplification, and determination of the titer of bacteriophage was *E. coli* ER2537, F' *lacI*^qΔ(*lacZ*)*MI5 proA*⁺*B*⁺ *lfhuA2 supE thi* Δ(*lac-proAB*) Δ(*hsdMS-mcrB*)5 (*r_K⁻ m_K⁻ McrBC*⁻), (New England Biolabs).

Cloning of P. aeruginosa ftsZ, ftsA and DNA sequencing

Polymerase chain reaction (PCR) cloning was used to obtain FtsZ and FtsA proteins with a His-tag at their C-terminal by deleting the original stop codons and adding 6 histidine amino acids before a termination codon. The *ftsZ* gene was amplified from genomic DNA of *P. aeruginosa* PAO1 (70 ng) with forward and reverse primers FtsZ-*NdeI* 5'-GGA GAG GGC ATA TGT TTG AAC TGG-3' and FtsZ-*XhoI* 5'-TTA CTT CAC TCG AGC TGA CGA CGC-3' designed to contain appropriate restriction sites *NdeI* and *XhoI*. The *ftsZ* gene was amplified in frame with the His-tag changing the two last amino acids of the C-terminal alanine-aspartic acid for leucine-glutamic acid. PCR was done with primers at 0.1 μ M each, dNTP (Amersham Biosciences) at 0.2 mM each and MgCl₂ at 2 mM in a final volume of 50 μ L. PCR conditions were optimized as follows: after 7 min at 95°C, 2.5 U of the Expand High Fidelity TAQ polymerase (Roche Diagnostics) was added and DNA amplification was done using 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 73°C for 1.5 min. The *ftsA* gene was amplified from genomic DNA of *P. aeruginosa* PAO1 (70 ng) with reverse and forward primers FtsA-Ctforw 5'-GTA ATA CAT ATG GCA AGC GTG CAG A-3' and FtsA-Ctrev 5'-TTG AAG CTT AAT TGC CCT GGA CCC-3' designed to contain appropriate restriction sites *HindIII* and *NdeI*. Amplification of *ftsA* insert was done with primers at 0.1 μ M each, dNTP (Amersham Biosciences) at 0.2 mM each, MgCl₂ at 1.5 mM and 2.5 U of Hot start TAQ polymerase (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) in a final volume of 50 μ L. PCR conditions were optimized as follows: 30 cycles, denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56.3°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min and a final step at 72°C for 10 min after

addition of the Hot start 15 min at 95°C. PCR products were purified using Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) and were digested with appropriate restriction enzymes. DNA insert containing *ftsZ* was cloned into the corresponding sites of the expression vector pET24b (Novagen) and the *ftsA* insert was cloned into the expression vector pET30a (Novagen); both under the control of the bacteriophage T7 promoter. The recombinant plasmids pMON2020 containing the *ftsZ* insert and pMON2023 with *ftsA* insert were electroporated into competent *E. coli* NovaBlue and kept at -80°C. The DNA inserts in recombinant plasmids were sequenced using the T7 promoter primer and the T7 terminator primer (Novagen). Sequence data were compared with the *ftsZ* and *ftsA* *P. aeruginosa* PAO1 sequences using the programs from the Wisconsin Package Version 10.3 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA).

Overexpression and purification of FtsZ

The recombinant plasmid pMON2020 was introduced into the competent *E. coli* host strain BL21 (λ DE3) (Novagen) by classic transformation for expression of FtsZ with an His-Tag at the C-terminus. Two cultures of 950 mL of Luria-Bertani (LB) Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplied with 0.05 g/L of kanamycin were inoculated with an overnight culture of 50 mL of *E. coli* BL21 (λ DE3) containing pMON2020 in LB broth with 0.05 g/L of kanamycin and were incubated at 37°C under agitation at 250 rpm until an optical density (O.D.) of 0.8 at 600nm. The induction was done by adding 1 mM of IPTG and overexpression was done for 4 h at 37°C under agitation at 250 rpm. Cells were centrifuged for 15 min at 7 000g at 4°C and the cell pellets were immediately stored at -

80°C. Pellets were resuspended 3.33 times their weight values in sonication buffer (50mM Tris-HCl pH 8.6 and 2 mM EDTA) and treated with lysosyme with 100 µg/mL for 15 min at 30°C. Cells were lysed by sonication for 30 sec/mL using a Virsonic digital 475 ultrasonic cell disrupter (The Virtis Company, Gardiner, New-York, USA) and a protease inhibitor cocktail was immediately added as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics). Cells and cellular debris were then removed by centrifugation at 17 000g 30 min. Recombinant FtsZ protein was purified to homogeneity on an affinity His-bind nickel resin chromatography (Novagen) as recommended by the manufacturer and the elution was optimized at 150 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9. Proteins fractions were visualized by SDS-PAGE analysis {Sambrook, 1989 #60} and fractions with sufficient purity were pooled, dialysed in conservation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM NaCl and 1 mM EDTA) {Zhulanova, 1998 #61} with Slide-A-Lyser Mini Dialysis (Pierce, Rockford, IL, USA) and conserved in aliquots in 50% (v/v) Glycerol at -80°C. FtsZ protein concentration was measured by the Bradford method (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada).

Overexpression of FtsA

The recombinant plasmid pMON2023 was introduced into the competent *E. coli* host strain BL21 (λDE3) (Novagen) by classic transformation for expression of FtsA with His-tag at the C-terminus. Two cultures of 930 mL of LB Broth (Difco) supplied with 0.05 g/L of kanamycin were each inoculated with an overnight culture of 70 mL of *E. coli* BL21 (λDE3) carrying pMON2023 in LB broth with 0.05 g/L of kanamycin and were incubated

at 37°C under agitation at 260 rpm until it reach an O.D. of 0.65 at 600nm. The induction was done by adding 1 mM of IPTG and overexpression was carried out during 6 h. Cells were centrifuged and the pellets were immediately stored at -80°C.

Purification of inclusion bodies and refolding of FtsA

Pellets were resuspended in 1B Wash buffer from the Protein Refolding Kit (Novagen) as recommended by the manufacturer and treated with lysosyme at 100 µg/mL 15 min at 30°C. Cells were lysed by sonication as for FtsZ and protease inhibitor cocktail tablets were immediately added as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics). Purification of inclusion bodies containing FtsA was optimized as follows; disrupted cells were centrifuged for 10 min at 5 000g; pellets were resuspended in 1B Wash buffer (Novagen) as recommended by the manufacturer and centrifuged for 10 min at 5 000g and pellets were resuspended again in 1B Wash buffer (Novagen), centrifuged for 10 min at 10 000g and inclusion bodies were stored at -80°C. Solubilization of inclusion bodies was performed by gently resuspending pellets in 1X 1B Solubilization buffer from the Protein Refolding Kit (Novagen) with 0.3% N-laurylsarcosine and 0.1% dithiothreitol (DTT) to a final concentration of 5 mg/mL. The suspension was incubated 30 min at room temperature; centrifuged for 30 min at 25 000g at room temperature and the supernatant was stored at 4°C. Protein fractions were visualized by SDS-PAGE {Sambrook, 1989 #60} and fractions having sufficient purity were pooled and conserved at 4°C for less then 4 months. Refolding of FtsA was carried out by multistep dialysis of solubilized inclusion bodies containing purified FtsA using the Slide-A-Lyser Mini Dialysis (Pierce). The suspension

was first dialysed in 75 volumes of 1X Dialysis buffer from the Protein Refolding Kit (Novagen) with 0.1% (v/v) DTT 4 h at 4°C and overnight at 4°C with fresh buffer. The suspension was then dialysed in 100 volumes of 1X Dialysis buffer (Novagen) with 10 mM MgCl₂ overnight at 4°C and 5 h at 4°C with fresh buffer. The refolded FtsA protein concentration was measured by the Bradford method (BioRad) and conserved at 4°C for less than 2 months.

FtsZ and FtsA N-terminal Sequencing

Preparation of protein samples was done as follows: after SDS-PAGE {Sambrook, 1989 #60}, 2 µg of both FtsZ and FtsA were transferred on PVDF membranes using a transfer buffer without glycine (10 mM CAPS pH 11 and 10% (v/v) methanol). The membrane was washed twice with water for 5 min and colored with Ponceau Red for 1-2 min. FtsZ and FtsA bands were cut out and abundantly washed with water and N-terminal sequencing was done by Edman degradation at the Biotechnology Research Institute (National Research Council Canada, Montreal, Québec, Canada).

Biochemical characterization of FtsZ and FtsA

The GTPase and ATPase enzymatic activity of FtsZ and FtsA was measured using a thin layer chromatography (TLC) assay with P³²-labelled nucleotides as substrates. The FtsZ GTPase assay was performed using 12 µM of fresh FtsZ in reaction buffer Z (50 mM Bis-Tris propane pH 7.4, 10 mM MgCl₂ and 2.5 mM DTT) and 1 µL of GTP³² 10 µCi/µL

(PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada) in a final volume of 20 μL . The FtsA ATPase assay was done using 6.5 μM of fresh FtsA in reaction buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 50 mM potassium acetate, 10 mM MgCl_2 and 1 mM DTT) and 1 μL of ATP^{32} 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (PerkinElmer) in a final volume of 20 μL {Feucht, 2001 #27}. Both mixtures were then incubated 1 h at 37°C and 2 μL of each sample was deposited on a TLC along with negative controls without enzyme. After separation by TLC, hydrolysis of radioactive substrates was measured by autoradiography with a Phosphorimager (Fuji, Stanford, CA, US). An UV cross-link specific nucleotide binding assay was performed with FtsZ and FtsA against the four radioactive nucleotides. Three μg of FtsZ or FtsA were mixed with each of the four P^{32} -labelled nucleotides (PerkinElmer) and the UV cross-link assay was carried out as described previously {Feucht, 2001 #27}. Briefly, the samples were incubated 30 min at 0°C and irradiated 10 min at 254 nm in wells of a microtiter plate on top of a chilled lead brick in iced water. The protein samples were then washed and purified prior to analysis by SDS-PAGE and visualized by autoradiography.

Affinity selection of phage-displayed peptides against FtsZ and FtsA

Phage display screening was carried out with the PH.D.-12 and PH.D.-C7C phage libraries (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) containing $\sim 2.7 \times 10^9$ 12-mer and $\sim 3.7 \times 10^9$ C7C random peptide sequences, respectively. Peptides are fused to the minor coat protein pIII of M13 phage via a flexible linker glycine-glycine-glycine-serine. The target proteins FtsZ and FtsA were immobilized directly on the charged plastic surface of a 96-well microtiter plate. Two 150 μL aliquots of a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FtsZ and FtsA solutions in 0.1 M

NaHCO₃ pH 8.6 were incubated in a microtiter plate overnight at 4°C. Protein solutions were then discarded; coated wells were incubated with 200 µL Blocking buffer (0.1 M NaHCO₃ pH 8.6, BSA 5 g/L, 0.02% (v/v) NaN₃) for 1 h at 4°C and washed 6 times with TBST. Ten µL of each original library containing 4 x 10¹⁰ phages were diluted with 100 µL TBST and incubated in the wells for 1 h at room temperature. Non specific binding phages were discarded and wells were washed 10 times with TBST. Bound phages were eluted with 100 µL of 0.2 M glycine-HCl pH 2.2 and 1 mg/mL BSA 5 min at room temperature. Each eluted sample was then collected, neutralized with 15 µL of 1 M Tris-HCl pH 9.1 and 2 µL aliquots were titered as described below. The rest of the phage eluate was amplified by adding it to a 20 mL *E. coli* ER2537 culture at early-log phase (O.D._{600nm} ~ 0.3) and incubated at 37°C for 4.5 h under agitation (250 rpm). Each culture was then centrifuged at 14 500g for 10 min at 4°C. Each supernatant containing amplified phages was transferred to a fresh tube and centrifuged again. The upper 80% of the supernatant (~ 16 mL) was transferred to a fresh tube and 1/6 volume of PEG/NaCl was added for phage precipitation overnight at 4°C. Precipitated phages were centrifuged at 14 500g for 15 min at 4°C; the supernatant was decanted, re-centrifuged for 2 min and residual supernatant was removed with a pipette. The phage pellet was suspended in 1 mL TBS, transferred to a microtube and centrifuged for 5 min at 4°C to remove residual cells. The supernatant was transferred to a fresh microtube, re-precipitated with 1/6 volume of PEG/NaCl (~ 167 µL), incubated on ice for 60 min prior centrifugation for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded, phages were re-centrifuged for 1 min and residual supernatant was removed with a micropipette. The purified phage pellet was suspended in 200 µL TBS and 0.02% NaN₃, centrifuged for 1 min and the supernatant containing the amplified eluate was conserved in a fresh tube at 4°C. Ten µL aliquots of each amplified eluate were titered as described

below and phage titers were used to calculate phage input for the second round of biopanning. The second round was carried out using each of the first round of amplified eluates as input phage and raising the Tween concentration for the washing steps to 0.5% (v/v). 2×10^{11} phages of each amplified eluate diluted with TBST was incubated in wells coated overnight with 150 μ L aliquots of 100 μ g/mL FtsZ and FtsA solutions in 0.1 M NaHCO₃ pH 8.6 for 1 h at room temperature. Bound phages were eluted with 100 μ L of 0.2 M glycine-HCl pH 2.2 and 1 mg/mL BSA for 5 min at room temperature, neutralized with 15 μ L 1 M Tris-HCl pH 9.1; 2 μ L phage aliquots were titered as described below. The rest of each phage eluate was amplified and purified as described above and 10 μ L of amplified phages was then titered. The third round of biopanning was carried out using each of the second round of amplified phages as input phage and 0.5% (v/v) Tween was used in the washing steps. Eight 150 μ L aliquots of each 100 μ g/mL FtsZ and FtsA solutions in 0.1 M NaHCO₃ pH 8.6 were coated in a 96-well microtiter plate overnight at 4°C. Four aliquots of 2×10^{11} phages per library were incubated in wells for 10 min (instead of 1 h) at room temperature. Specifically bounded phages from each library were eluted using 4 different conditions. Phages adsorbed on FtsZ were eluted with 1) glycine as previously described, 2) with 100 μ L of 1 mM GTP in TBS for 30 min, 3) with 100 μ L of 1 mM 5'-guanylylimidodiphosphate (a non-hydrolysable analogue of GTP) for 30 min and 4) with 100 μ L of 1 mM FtsA in TBS for 30 min. Phages adsorbed on FtsA were eluted with 1) glycine as previously described, 2) with 100 μ L of 1 mM ATP in TBS for 30 min, 3) with 100 μ L of 1 mM 5'-adenylylimi-dodiphosphate (a non-hydrolysable analogue of ATP) for 30 min and 4) with 100 μ L of 1 mM FtsZ in TBS for 30 min. Finally, 2 μ L of phage from the third round of unamplified eluate was titered as described below and the rest was conserved at 4°C.

Phage titering

For unamplified eluates, 10^1 to 10^4 from binary dilutions in LB broth were used and 10^8 to 10^{11} dilutions were used for amplified phage eluates. Ten μL of each dilution was added to 200 μL fresh *E. coli* ER2537 culture at mid-log phase ($\text{OD}_{600} \sim 0.5$). The mixture was vortexed and incubated 5 min at room temperature. Infected bacterial cultures were added to a culture tube containing 3 mL of melted Agarose Top maintained at 45°C , vortexed and immediately poured onto pre-warmed LB/IPTG/Xgal plates. Plates were allowed to solidify, inverted, incubated at 37°C overnight and phage plaques counted.

Phage DNA preparation and sequencing

Phage amplification from the third round of biopanning began by inoculating culture tubes containing 10 mL of LB broth with 100 μL *E. coli* ER2537 from an overnight culture. For each of the two proteins and phage libraries eluted by the 4 elution methods, twelve phage plaques from each of the third round titering plates were randomly used to infect *E. coli* ER2537. Culture tubes were incubated at 37°C for 4.5 h under agitation at 250 rpm. Phages were centrifuged and phage DNA was then prepared using the Qiaprep spin M13 kit (Qiagen) and sequenced with a -96 gIII sequencing primer (New England Biolabs). Sequencing was done by the Big dye terminator cycle sequencing technique with *AmpliTaq* DNA polymerase (PerkinElmer) and DNA fragments were separated with an ABI Stretch 373 system (PerkinElmer). DNA sequence analyses were performed on a SGI Origin 2000 computer using programs from the Wisconsin Package Version 10.3 (Accelrys Inc). A FASTA search was carried out with all the deduced amino acid sequences.

Affinity ELISA

The principle of the experiment is described by Carettoni *et al.* {Carettoni, 2003 #62} and carried out with the following modifications. Briefly, 150 μL of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ his-FtsZ and his-FtsA solutions in TBS were adsorbed overnight at 4°C on Ni-NTA strips (Qiagen) along with 1% BSA control. Strips were washed four times with 200 μL of TBS and blocked with 200 μL of 1% BSA 1 h at room temperature. After a brief wash with TBS, 2 $\times 10^9$ pfu/well of each amplified phage samples were incubated 1 h at room temperature in triplicates with protein target-coated wells. TBS was added in triplicate to BSA-coated wells for evaluation of non-specific signals. Strips were washed six times with TBS 1% Triton, two times for 10 min and again six times with TBS 1% Triton. One hundred fifty μL of biotine-labeled anti-fd rabbit polyclonal antibodies diluted 1:2 500 in TBS 1% Triton was incubated for 1 h at room temperature in each well. After four 1 min washes with TBS 1% Triton, 150 μL of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP-labeled streptavidine (Roche Diagnostics) in TBS 1% Triton was added to strips for 30 min at room temperature and the excess was removed with four 1 min TBS 1% Triton washes. Strips were developed by incubating 20 min at room temperature with 100 μL of ABTS (Roche Diagnostics) and reading at O.D._{405nm}. The average was calculated for each experiment done in triplicate and the BSA non-specific signal was subtracted from all values. Specific affinity ratios for phages from the third round of biopanning were determined by dividing the value with the non-specific control phage value.

Choice and synthesis of selected peptides

Consensus peptide sequences were synthesized as they could represent specific inhibitors of FtsZ. Among selected peptides against FtsA, the consensus sequences were synthesized along with the peptide demonstrating higher ratio of specific affinity. Peptides were synthesized on an ABI 433A Peptide Synthesizer using FastMoc chemistry. The activation was carried out with HBTU/DIEA. The N-terminal amino group was protected by Fmoc and side chain functional groups were protected by t-bu (Asp, Glu, Ser, Thr and Tyr), Boc (Lys and Trp), Trt (Asn and Gln) and Pmc (Arg). The peptides were cleaved with TFA/thioanisole/water/EDT (90:5:2.5:2.5) for 2-3 hrs at room temperature, precipitated with ether prior to lyophilization. The peptides were purified on a Vydak 22 x 250 mm C18 reverse-phase HPLC column using a 0.1% TFA/acetonitrile gradient at 10 mL/min.

FtsZ and FtsA inhibitory enzymatic assays

The enzymatic activities of both GTPase FtsZ and ATPase FtsA were measured by detecting products of hydrolysis as described above. The inhibitory capacities of the 12-mer and C7C-mer synthesized peptides were determined by pre-incubating both enzymes in their respective buffers Z or A lacking DTT and P³²-labelled nucleotides substrates with various concentrations of peptide buffered solutions for 20 min at room temperature. P³²-labelled GTP or ATP was then added and mixtures were immediately incubated for 1 h at 37°C. Then, 2 µL of each sample was separated by TLC along with positive and negative controls. After TLC separation, the percentage of hydrolysis of radioactive substrates was

measured by autoradiography with Phosphorimager (Fuji). The 50% inhibitory concentrations (IC_{50} s) of peptides were obtained by plotting the percentage of enzymatic residual activity as a function of increasing peptide concentration. By way of additive controls, inhibitory capacity of non-specific peptide was tested on GTPase FtsZ and ATPase FtsA. A competitive rescue assay was also done with BSA at twice the enzyme concentrations. DTT effect on enzyme inhibition with specific peptides was analysed by testing the inhibition of peptides with or without 2.5 mM DTT and including non-specific peptides as controls.

Results

Purification of P. aeruginosa FtsZ and FtsA

P. aeruginosa ftsZ and *ftsA* genes were efficiently cloned in pET expression vectors with six histidine at their C-termini as confirmed by DNA inserts sequencing (data not shown). FtsZ protein was overexpressed in the soluble cytoplasmic fraction and FtsA was overexpressed and concentrated in inclusion bodies (Fig. 1 A and B). FtsZ was purified to homogeneity in a single chromatographic step on an affinity nickel column with a yield of 20 mg/L. Overexpressed FtsA was purified by multistep solubilization and the renaturation of purified inclusion bodies with a yield of 2.5 mg/L. The purified proteins with expected molecular weight were analysed by N-terminal sequencing of the first 15 amino acid residues and confirmed to be FtsZ and FtsA (100% identities in both cases), respectively (data not shown).

Biochemical characterization of FtsZ and FtsA

The GTPase and ATPase enzymatic activity of FtsZ and FtsA was measured using a TLC assay with P^{32} -labelled nucleotides as substrates. FtsZ autoradiography showed that 12 μM of the enzyme hydrolysed 85% of GTP^{32} in GDP^{32} in 1 h at 37°C (Fig. 2 A). FtsA autoradiography demonstrated that 6.5 μM of the enzyme hydrolyse 43% of ATP^{32} distributed in 10% ADP^{32} , 3% AMP^{32} and 30% P_i^{32} in 1 h at 37°C (Fig. 2 B). This data

confirmed that both enzymes were biologically active and that FtsA was properly refolded. An UV cross-link binding assay was performed to study the FtsZ and FtsA binding properties. The autoradiography showed that FtsZ binds preferentially GTP and that FtsA binds preferentially ATP amongst the four P³²-labelled nucleotides used as substrates (Fig. 3). This firmly supports the corresponding enzymatic activity of FtsZ and FtsA.

Affinity selection of phage-displayed peptides against FtsZ and FtsA

Two phage-display libraries expressing randomized 12-mer and C7C-mer peptides were exploited to identify specific binding peptides having affinity with FtsZ or with FtsA. The specificity of the three rounds of biopanning was raised by increasing the stringency of the washes and by decreasing the time of contact between the peptides and the proteins. Elution of tightly bound phages was done by non-specific disruption of binding interactions using glycine and by competitive elution in biopanning using the respective enzyme substrates and their non-hydrolysable analogues. Since FtsZ interacts with FtsA (and vice versa)⁷, we decided to use FtsA and FtsZ as competitors in biopanning. We assumed that elution with a known ligand of the target protein such as FtsZ for FtsA would compete with the corresponding bound phage and would yield phage-displaying peptides with probable binding affinities to FtsZ and FtsA active sites. The phage-display technique and the unique biopanning used identified two C7C-mer and one 12-mer consensus peptide sequence against FtsZ (Fig. 4). After the third round of biopanning DNA sequencing of randomly selected phages from each elution group showed a clear consensus peptide sequence for each library against FtsA. We noted the presence of a perfect 12-mer consensus with the FtsZ elution against FtsA (Fig. 5). Among the 12 sequenced phage DNAs from each elution

group (Fig. 4 and 5), lost peptide revertants were selected therefore diminishing the number of peptide sequences. To identify known peptides and proteins found in databases, a FASTA search was carried out with the deduced amino acid sequences from each peptide identified in Fig. 5. No peptides or proteins interacting with FtsZ or with FtsA and containing the peptide sequences could be identified.

Affinity ELISA

The relative affinity of chosen phages expressing the selected peptide sequences were tested by ELISA to evaluate the strength of their binding to FtsZ or FtsA. The relative affinity ratios defined as the value of specific/ non-specific phages obtained against FtsZ varied from 2.0 to 4.6 (Table I). For example, a 4.6 relative affinity ratio would indicate that the specific phage had 4.6 times more affinity for the target protein as compared to FtsZ binding of random peptide phages. It can be noted that some phage peptide sequences had higher relative affinity for FtsZ than others and that the three consensus peptides synthesized did not give the highest ratio values. The mean relative affinity ratio of 12-mer peptides was 2.65 ± 0.8 and was non-significantly different from the mean ratio of the C7C-mer peptides of 3.5 ± 0.9 . The relative affinity ratio values obtained against FtsA varied from 2.7 to 43.1 (Table II). We noted that the two consensus peptide sequences did not give the highest ratio values and that the 12-mer peptides mean ratio was 24.7 ± 14 and was more significant than the C7C-mer mean ratio of 11.2 ± 6 . An interesting fact is that the two best binding peptides with relative affinity ratios of 43.1 and 42.4 have the same **G P H** conserved motif at their N-termini and both end with a proline. The second and third

strongest binding peptide with relative affinity ratios of 42.4 and 32 contain a **G M** motif at their center and end with a **R P** motif (Table II). When comparing the FtsZ and FtsA results, we noted that the FtsZ relative affinity ratio values are lower than those of FtsA and present a lower variation range. This difference can be explained by a weak affinity of the non-specific phage for FtsZ that biased the results by diminishing the relative affinity ratio values and lowering the variation range. In fact, the average absorbance at O.D._{405nm} of the non-specific phage was 0.28 against FtsZ and 0.048 against FtsA.

Choice of synthesized peptides

In order to analyse the inhibitory effect of selected peptides against FtsZ GTPase and FtsA ATPase activities, the peptides were synthesized on an ABI 433A Peptide Synthesizer and HPLC purified. The FtsZ peptide was selected on the basis of consensus sequences even if they did not give the highest affinity ratio values. The first C7C-mer consensus sequence (CSYEKRPMC) was FtsZp1, the second C7C-mer consensus (CLTKSYTSC) was FtsZp2 and the 12-mer consensus (GAVTYSRISGQY) was FtsZp3. In the case of FtsA, the peptide with the highest relative affinity was synthesized along with the C7C-mer and 12-mer consensus sequences that had low and high ratio values, respectively. This was done in an attempt to compare the impact of relative affinity ratios and the frequency of recovery when searching for peptide inhibitors. FtsAp1 was the C7C-mer consensus sequence (CLAPSPSKC), FtsAp2 was the 12-mer consensus (SVSVGMPSPRP) and FtsAp3 was the (GPHHYWYHLRLP) peptide that had the highest relative affinity ratio value (Table II).

Inhibition of FtsZ and FtsA enzymatic activities by synthesized peptides

The GTPase enzyme activity of FtsZ and the ATPase activity of FtsA were measured by detecting substrate nucleotide products of hydrolysis. The inhibitory capacities of the synthesized peptides were estimated by calculating the percentage of residual enzyme activities when using various peptide concentrations. This data was obtained by comparing the reaction rate of enzymes in presence of each peptide concentration to the reaction rate of the uninhibited enzyme assay. Both synthesized peptides were able to inhibit GTPase activity of FtsZ. The IC_{50} s obtained from the measurements were 0.45 mM, 1.5 mM and 5 mM for FtsZp1, FtsZp2 and FtsZp3, respectively (Fig. 6). We noted that the two C7C-mer peptides FtsZp1 and FtsZp2 showed significantly lower IC_{50} values and higher inhibitory capacities than the IC_{50} values of 12-mer peptides. The BSA competitive rescue assay gave similar IC_{50} values (data not shown) indicating that the synthesized peptides have a specific binding affinity with FtsZ. DTT had no effect on inhibitory capacity of the 12-mer peptide FtsZp3 (data not shown) but reduced significantly the inhibitory potential of the two C7C peptides FtsZp1 and FtsZp2. In fact, the inhibitory capacity of these C7C-mer peptides dropped less than 50% with DTT and this suggests that the disulfide bond between the flanked cysteine residues and the consequent loop conformation was important for their inhibitory potential. Analysis of FtsZ GTPase activity using random peptides at high concentration showed that the reaction rate was not reduced by the addition of any of the two peptides (data not shown). This result indicated that GTPase activity of FtsZ was not inhibited by non-specific C7C or 12-mer peptides.

Discussion

The development of novel antibacterial agents with novel bacterial targets and modes of action is essential for the treatment of the widespread resistant bacterial infections. In the last few years, there has been a growing interest in finding new bacterial targets from essential bacterial mechanisms such as the cell division process but few novel class of antimicrobial agents have been developed {Breithaupt, 1999 #20}. In this work, we are exploiting the bacterial cell division machinery as a tool to identify new antimicrobial agents via peptides obtained by phage-display. Natural intrinsic regulators of prokaryotic cell division machinery MinC and SulA are now well characterized but no pharmacologically active inhibitors of division proteins exist yet. MinC protein prevents polymerization of FtsZ and its colocalization with ZipA at the cell poles for restricting the FtsZ-ring formation at the mid-cell {Errington, 2003 #51}. SulA, a protein expressed when the SOS response is induced, binds the T7 loop surface of FtsZ by blocking polymerization {Cordell, 2003 #63}. In this work, we targeted the two most conserved and essential cell division proteins FtsZ {van den Ent, 2001 #50} and FtsA {Feucht, 2001 #27} as probes to selected specific peptides as potential inhibitors.

The purification of FtsZ was efficiently done in a single chromatographic step (Fig. 1 A) giving an appreciable and often superior yield to those previously reported {Lowe, 1998 #46; Romberg, 2001 #43}. The purification of biologically active FtsA was a challenge because this protein is difficult to overexpress and accumulates in inclusion bodies. We developed an adapted multistep solubilization and renaturation protocol that gives purified active FtsA at an acceptable yield (Fig. 1 B). This purification method is faster and easier than those previously described {Feucht, 2001 #27}. The method

describes here contain simple purification steps based upon the easy purification of inclusion bodies which contains FtsA at >99% homogeneity. This protocol may be useful for any insoluble protein when taking into consideration the presence of disulfide bonds and the nature of the cofactor or stabilising molecule for the protein expressed in inclusion bodies.

Enzymatic activities of purified biologically active enzymes expressing GTPase for FtsZ and ATPase for FtsA (Fig. 2) were confirmed. Indeed, we corroborate the GTPase activity (Fig. 2 a) as reported previously {Stricker, 2002 #34;Errington, 2003 #51;Scheffers, 2002 #47}. The ATPase activity of FtsA has been demonstrated by another group only {Feucht, 2001 #27} and we are the first to show that FtsA hydrolysed ATP to ADP, AMP and inorganic phosphate (Fig. 2 b). It has previously been shown that FtsZ binds GTP {Diaz, 2001 #65} and that FtsA binds ATP {Feucht, 2001 #27}. Here we clearly demonstrate that FtsZ binds preferentially GTP and that FtsA binds preferentially ATP among the 4 P³²-labelled nucleotides used as substrates (Fig. 3). This firmly confirms their respective activities and gives additional information about their enzyme binding specificity.

It is strongly suggested that peptides that adhere to protein would bind preferentially to functional sites, either their substrate binding sites, at their interaction sites with other proteins in the protein-protein interaction context or at allosteric regulatory sites, rather than interacting randomly with the protein surface {Hyde-DeRuyscher, 2000 #64}. Consequently, peptides could exert inhibition of the biological function of the target protein. The powerful technique of phage display has been used by Hyde-DeRuyscher *et al.* to isolate a series of peptide ligands that bound specifically to a broad range of well-

characterized enzymes. The majority of tested peptides were found to be specific inhibitors of enzyme function; kinetic analysis did not reveal a general trend in the peptide inhibitory mechanism {Hyde-DeRuyscher, 2000 #64}. Based on these principles, we used M13 phage libraries to identify peptide sequences with high binding affinities and hence with potential biological interactions with the FtsZ and FtsA activities essential for bacterial survival. Sequencing of phage DNA revealed at least 3 predominant consensus sequences against FtsZ (Fig. 4) and two against FtsA (Fig. 5) with conserved amino acid motifs which could be important for their binding to the target protein. Since FtsZ interacts with FtsA in the divisosome, we noted the presence of a perfect 12-mer consensus against FtsA when eluting with FtsZ (Fig. 5). This firmly suggests that this consensus peptide binds with FtsA at the FtsZ interaction site. This site is not well characterized yet but there is evidence that FtsZ binds FtsA at the C-termini {Yan, 2000 #39; Haney, 2001 #41} and that the FtsZ-FtsA protein interaction is essential for the bacterial cell division process {Yan, 2000 #39}. We noted that for both proteins the frequency of recovery of phages containing each consensus sequence and the nature of amino acid sequences vary in function of elution conditions. This demonstrates that it is useful to employ several different stringent elution conditions during biopanning so as to obtain a repertoire of peptides. The glycine elution leads to recovery of binding phages except for those with very high binding properties. The time of contact between glycine and the phage will not favour selection of these phages {Hoess, 2001 #58}. Competitive elution during the biopanning scheme permitted the recovery of peptides binding to their respective competitive sites. The non-hydrolysable substrate analogues 5'-guanylylimidodiphosphate and 5'-adenylylimidodiphosphate bind more tightly to the enzyme and we supposed that it would allow the recovery of phage with a tighter binding capacity than the hydrolysable substrate which binds lower. We noted that

the substrates or non-hydrolysable analogues elution during biopanning did not reveal a characteristically different amino acid consensus sequence than the FtsA or FtsZ elution. This may suggest that the nucleotide binding site of both enzymes are implicated in the FtsZ-FtsA protein-protein interaction. Bio-informatics analysis revealed no relevant peptide homologues or protein motifs in databases. This may be due to the tridimensional structure of peptides which must share tridimensional homology when interacting with the targeted protein. The FtsZ protein interacts with itself during the polymerisation process {Romberg, 2001 #43} and this self-interaction is essential for the enzymatic activity of FtsZ {Scheffers, 2002 #49}. FtsZ interacts also with FtsA and ZipA {Yan, 2000 #39}, MinC {Errington, 2003 #51}, Sula {Cordell, 2003 #63} and MukB {Den Blaauwen, 1999 #45}. The FtsA protein interacts with itself, FtsZ, PBP3, FtsQ and FtsN {Yim, 2000 #37} (Fig. 7). Indeed, the conformation of some peptides obtained could relate from those of mentioned proteins. It would be interesting to use other elution conditions and analyse the peptides selected. A FtsZ elution against FtsZ and a FtsA elution against FtsA could give peptides that inhibit these essential protein-protein interactions {Errington, 2003 #51}.

The affinity ELISA experiments gave useful information about the selected peptides in the perspective of using them as inhibitors. We noted that the FtsZ relative affinity ratio values are lower and present a lower variation range than those of FtsA. We explained this fact by a weak intrinsic affinity of the non-specific phage for FtsZ that biased the results and the intrinsic nature of both proteins. This bias could be avoided if the affinity of the non-specific phage was tested prior to the selection process. Indeed, the results that we obtained confirmed that some peptide sequences obtained had higher relative affinity for FtsZ than those synthesized. The tridimensional structure of FtsZ obtained at 2.8 Angströms resolution indicates a compact and globular structure {Lowe, 1998 #46}; we

hypothesised that the C7C-mer peptides would have more affinity than the 12-mer for this protein which contains a sterical hindrance. The results obtained indicate that the mean relative affinity ratio of 12-mer peptides and C7C-peptides are not different when binding to C7C-mer on FtsZ. We did not identify conserved amino acids motifs among the peptides that have the higher relative affinity ratios (Table 1) as we did for FtsA. There is evidence that biopanning gave a collection of more diverse peptides against FtsZ than FtsA. FtsZ may present several distinct protein binding sites; FtsZ interacts with 6 proteins {Romberg, 2001 #43; Yan, 2000 #39; Errington, 2003 #51; Cordell, 2003 #63; Den Blaauwen, 1999 #45} while FtsA interacts with 5 proteins {Yim, 2000 #37} (Fig. 7). The FtsA affinity experiments for peptides gave higher ratios of relative affinity than those of FtsZ. We supposed that the intrinsic nature of both proteins should have a significant effect on the relative affinity ratio results. An interesting point is that the 12-mer peptides mean ratio surpassed significantly the C7C-mer mean ratio. This correlates with our hypothesis that 12-mer peptides would bind more efficiently on FtsA than the C7C-mer because the crystallography of FtsA resolved at 1.9 Angströms shows a scattered and elongated tridimensional structure {van den Ent, 2000 #28}. Indeed, 12-mer peptides should take more physical space than the C7C-mer because cysteines spontaneously form a disulfide bond constraining the peptide in a disulfide loop in the absence of reducing agents. An important fact to note is the conserved amino acids motifs identified amongst the peptides with higher ratios of relative affinity (Table II). These conserved motifs must be important for the binding of 12-mer peptides to FtsA. We noted that the selected consensus peptide sequences did not have the highest ratio values and that the relative affinity values did not correlate with the phage frequency of recovery. This can be explained by several factors that affect phage recovery apart from the inherent binding property such as replication

advantage or disadvantage affected by the pIII fusion peptide, protein translocation problems and folding bias, pIII coat stability and retained phage infection efficiency {Carettoni, 2003 #62}. We present evidence that non-hydrolysable substrate analogues used during the elution in biopanning will allow the recovery of better phage ligands than the hydrolysable substrate. However, the affinity ratio results did not confirm this affirmation.

The inhibitory capacities of synthesized peptides on GTPase activity of FtsZ were evaluated by estimating the percentage of residual activity of enzymes when using peptides at various concentrations. The three peptides synthesized were able to inhibit specifically FtsZ when compared to the BSA protein competitive assay and the non-specific peptide inhibitory assay. We noted that the two C7C-mer peptides FtsZp1 and FtsZp2 showed the highest inhibitory capacities compared to the 12-mer peptide FtsZp3. The inhibitory potential of the three peptides does not correlate with their frequency of recovery but it correlates among the C7C-mer peptides. In fact, the best peptide inhibitor FtsZp1 has been isolated 14 times and FtsZp2 has been obtained 9 times. We noted that the peptide IC_{50} values do not correlate well with the data from the relative affinity assays. Indeed, peptide inhibitory capacity depends essentially on the localization of the interaction and on the binding strength. Therefore weaker binding peptides may have better inhibitory potential than a high affinity peptide because it presumably binds directly in the active site. This observation implies choice of interesting peptides as inhibitors among the selected is still hazardous because neither the frequency of phage recovery nor the relative affinity ratio data well reflect their inhibitory capacity.

This study allowed the identification of three specific inhibitory peptides against the essential cell division protein FtsZ and some promising peptides against FtsA. In

perspective, it will be useful to characterize the inhibition mechanism of the inhibitory peptides and their K_i . It will also be necessary to analyse the inhibitory capacity of these peptides on other bacterial GTPases to analyse their specificity as potential antimicrobial agents. The therapeutic use of peptides is limited due to their potential enzymatic degradation, low permeability and unsuitability for oral administration. Ideally, a major goal of medicinal chemistry is to discover novel structures that circumvent the multiple export and metabolism mechanisms that exist to control levels of active peptides *in vivo* {Bursavich, 2002 #66}. Inhibitory molecules should be able to cross bacterial cell membranes, avoid bacterial efflux pumps, reach its target at a sufficiently high concentration so as to inhibit a vital bacterial function and not be targeted for bacterial modifying or hydrolysing enzymes that could inactivate it. Also, for economic and diagnostic reasons, antimicrobial agents should have a broad spectrum of antibacterial activity. Finally, it should reach inhibitory concentrations at the site of infection in the organism, have little or no toxicity and have minimal side effects in humans {Hughes, 2003 #21}. In order to obtain promising lead compounds that fulfill these objectives, inhibitory peptides will undergo many chemical modifications and their sequences will constitute the core for the synthesis of libraries of peptidomimetic molecules. Compounds of non-peptide nature would emulate the three-dimensional structure of the original peptides but possess much more useful pharmacodynamic properties as leads for new antibacterials, being less subject to degradation and of higher bioavailability {Nefzi, 1998 #52}. Peptides have been shown to be useful as screening tools for the detection of small-molecule inhibitors of enzyme function by a competitive binding assay {Hyde-DeRuyscher, 2000 #64}. The conservation of FtsZ and FtsA {van den Ent, 2001 #50} among almost all bacterial species indicates the potential for development of specific inhibitors. The ZipA protein is present

only in gram-negative bacterial species and demonstrate overlapping functions with FtsA {Pichoff, 2002 #32}. Indeed, inhibiting FtsA in gram-negative bacteria may not give a lethal phenotype since ZipA may replace partially FtsA.

Acknowledgements

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. The Canadian Bacterial Diseases Network via the Canadian Centers of Excellence supported this work along with a FCAR team grant to Roger C. Levesque and a CRSNG studentship to Catherine Paradis-Bleau.

References

1. Normark, B. H. & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252, 91-106.
2. Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature* 406, 762-767.
3. Fauci, A. S. (2001). Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis* 32, 675-685.
4. Projan, S. J. (2002). New (and not so new) antibacterial targets - from where and when will the novel drugs come? *Curr Opin Pharmacol* 2, 513-522.
5. Breithaupt, H. (1999). The new antibiotics. *Nat Biotechnol* 17, 1165-1169.
6. Errington, J., Daniel, R. A. & Scheffers, D. J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 52-65, table of contents.
7. Dai, K. & Lutkenhaus, J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 6145-6151.
8. Cordell, S. C., Robinson, E. J. & Lowe, J. (2003). Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7889-7894.
9. van den Ent, F., Amos, L. & Lowe, J. (2001). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Curr Opin Microbiol* 4, 634-638.
10. Lutkenhaus, J. & Addinall, S. G. (1997). Bacterial cell division and the Z ring. *Annu Rev Biochem* 66, 93-116.
11. Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J* 21, 685-693.

12. Begg, K., Nikolaichik, Y., Crossland, N. & Donachie, W. D. (1998). Roles of FtsA and FtsZ in activation of division sites. *J Bacteriol* 180, 881-884.
13. Nanninga, N. (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 110-129.
14. Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M. D. & Errington, J. (2001). Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 40, 115-125.
15. Yan, K., Pearce, K. H. & Payne, D. J. (2000). A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 387-392.
16. Haney, S. A., Glasfeld, E., Hale, C., Keeney, D., He, Z. & de Boer, P. (2001). Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ.ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J Biol Chem* 276, 11980-11987.
17. Christensen, D. J., Gottlin, E. B., Benson, R. E. & Hamilton, P. T. (2001). Phage display for target-based antibacterial drug discovery. *Drug Discov Today* 6, 721-727.
18. Sidhu, S. S. (2000). Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11, 610-616.
19. Hyde-DeRuyscher, R., Paige, L. A., Christensen, D. J., Hyde-DeRuyscher, N., Lim, A., Fredericks, Z. L., *et al.* (2000). Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Chem Biol* 7, 17-25.
20. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

21. Zhulanova, E. & Mikulik, K. (1998). Characterization of *ftsZ* gene and its protein product from *Streptomyces collinus* producing kirromycin. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 556-561.
22. Carettoni, D., Gomez-Puertas, P., Yim, L., Mingorance, J., Massidda, O., Vicente, M., *et al.* (2003). Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of *Escherichia coli* FtsA. *Proteins* 50, 192-206.
23. Lowe, J. & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203-206.
24. Romberg, L., Simon, M. & Erickson, H. P. (2001). Polymerization of Ftsz, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative? *J Biol Chem* 276, 11743-11753.
25. Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E. D. & Erickson, H. P. (2002). Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3171-3175.
26. Scheffers, D. J., de Wit, J. G., den Blaauwen, T. & Driessen, A. J. (2002). GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* 41, 521-529.
27. Diaz, J. F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J. M., Vicente, M. & Andreu, J. M. (2001). Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate. *J Biol Chem* 276, 17307-17315.
28. Hoess, R. H. (2001). Protein design and phage display. *Chem Rev* 101, 3205-3218.
29. Scheffers, D. J. & Driessen, A. J. (2002). Immediate GTP hydrolysis upon FtsZ polymerization. *Mol Microbiol* 43, 1517-1521.

30. Den Blaauwen, T., Buddelmeijer, N., Aarsman, M. E., Hameete, C. M. & Nanninga, N. (1999). Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 5167-5175.
31. Yim, L., Vandenbussche, G., Mingorance, J., Rueda, S., Casanova, M., Ruyschaert, J. M., *et al.* (2000). Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self-interaction and cell division. *J Bacteriol* 182, 6366-6373.
32. van den Ent, F. & Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* 19, 5300-5307.
33. Bursavich, M. G. & Rich, D. H. (2002). Designing non-peptide peptidomimetics in the 21st century: inhibitors targeting conformational ensembles. *J Med Chem* 45, 541-558.
34. Hughes, D. (2003). Microbial genetics: Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 4, 432-441.
35. Nefzi, A., Dooley, C., Ostresh, J. M. & Houghten, R. A. (1998). Combinatorial chemistry: from peptides and peptidomimetics to small organic and heterocyclic compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2273-2278.

Table 1. Determination of relative affinity of selected phages against FtsZ by ELISA. Results are indicated as a ratio of specific/ non-specific phages.

12-mer sequence	Ratio	C7C-mer sequence	Ratio
G A V T Y S R I S G Q Y ³	2.0	C S Y E K R P M C ¹	2.4
E A P W F W T P V S H M	2.4	C L T K S Y T S C ²	3.0
E R I N L Q H H M P S E	4.5	C T P K H T W L C	4.6
A P R L P Q S L L P Q L	2.8	C A R V Y P Q S C	2.8
Y N G Y R I L G P S L P	2.4	C T K A L A Q F C	2.1
V P P L Q T P L F L P L	2.4	C T Q I M M H K C	3.7
S A G H K L S A P S T L	2.2	C S R P P S L H C	4.3
F S T L A D T S E S P T	2.5	C T L K M S L R C	4.3
		C T W L Q P D S C	3.4
		C K P A S P H T C	4.2

1 Consensus peptide FtsZp1

2 Consensus peptide FtsZp2

3 Consensus peptide FtsZp3

Table 2. Determination of relative affinity of selected phages against FtsA by ELISA. Results are indicated as a ratio of specific/ non-specific phages.

12-mer sequence	Ratio	C7C-mer sequence	Ratio
S V S V <u>G M</u> K P S P <u>R P</u> ²	32.0	C L A P S P S K C ¹	3.2
F T T S N H T S R H G S	26.7	C S S A T G K S C	12.9
T P S L P P T M F R L T	17.8	C L G Q T K M R C	15.4
<u>G P H</u> H Y W Y H L R L <u>P</u> ³	43.1	C G H R P Y Q Y C	11.1
Q S P V N H H Y H Y H I	7.7	C W A F P L H H C	16.0
N M T T Y P M H N N T V	5.1	C T L N S H S N C	12.7
S L L P H S N H A K H Y	31.4	C E I S A K R T C	9.4
E F E Y F H P A T F R L	16.5	C H I L H A Q A C	2.7
<u>G P H</u> L <u>G M</u> N Q R R <u>R P</u>	42.4	C P R P P S L E C	4.9
		C T G H W A S E C	23.3

1 Consensus peptide FtsAp1

2 Consensus peptide FtsAp2

3 Peptide that had the highest relative affinity ratio value FtsAp3

X Conserved motifs among the peptides with higher relative affinity ratios

Figure legends

Figure 1. SDS-PAGE showing the overexpression and purification of the *P. aeruginosa* (A) FtsZ and (B) FtsA proteins in *E. coli* BL21 (λ DE3) cell lysates. **Lanes: 1**, overexpressed proteins in (A) soluble cytoplasmic fraction and (B) insoluble fraction; **2**, homogeneity purified proteins.

Figure 2. Autoradiogram of thin layer chromatography (TLC) demonstrating enzymatic activity of (A) GTPase FtsZ and (B) ATPase FtsA. **Lanes: 1**, negative control without enzyme; **2**, (A) hydrolysis of GTP to GDP by FtsZ and (B) hydrolysis of ATP to ADP, AMP and P_i.

Figure 3. UV cross-link specific nucleotide binding assay showing that (A) FtsZ binds preferentially GTP and that (B) FtsA binds preferentially ATP among the 4 nucleotides.

Figure 4. Consensus peptide sequences of the Ph.D.-12 and Ph.D.-C7C phage libraries against FtsZ obtained by sequencing of phage eluted after the third round of biopanning. Acidic amino acids (D, E) are in green, polar amino acids (Q, N) are in light green, basic amino acids (K, R, H) are in blue, hydrophobic amino acids (I, L, M, V) are in rose, hydrophobic aromatic amino acids (F, Y, W) are in red, small amino acids (A, S, C, T) are in pink, G (tiny amino acid) is in orange, and P (leading to turn formation) is in black (classified according to the Venn diagram for defining the relationships between amino acids).

Figure 5. Consensus peptide sequences of the Ph.D.-12 and Ph.D.-C7C phage libraries against FtsA obtained by sequencing of phage eluted after the third round of biopanning. Amino acids are classified according to Venn diagram as described at Figure 4.

Figure 6. IC₅₀ determinations for the phage display derived peptide inhibitors of FtsZ GTPase. The residual enzymatic activity was measured as a function of the concentration of the C7C peptides (A) FtsZp1, (B) FtsZp2 and (C) the 12-mer FtsZp3.

Figure 7. Schematic representation of the bacterial divisome showing the FtsZ interactions with itself, FtsA, ZipA, SulA, MinC and MukB along with the FtsA interactions with itself, FtsZ, PBP3, FtsN and FtsQ.

Figure 1

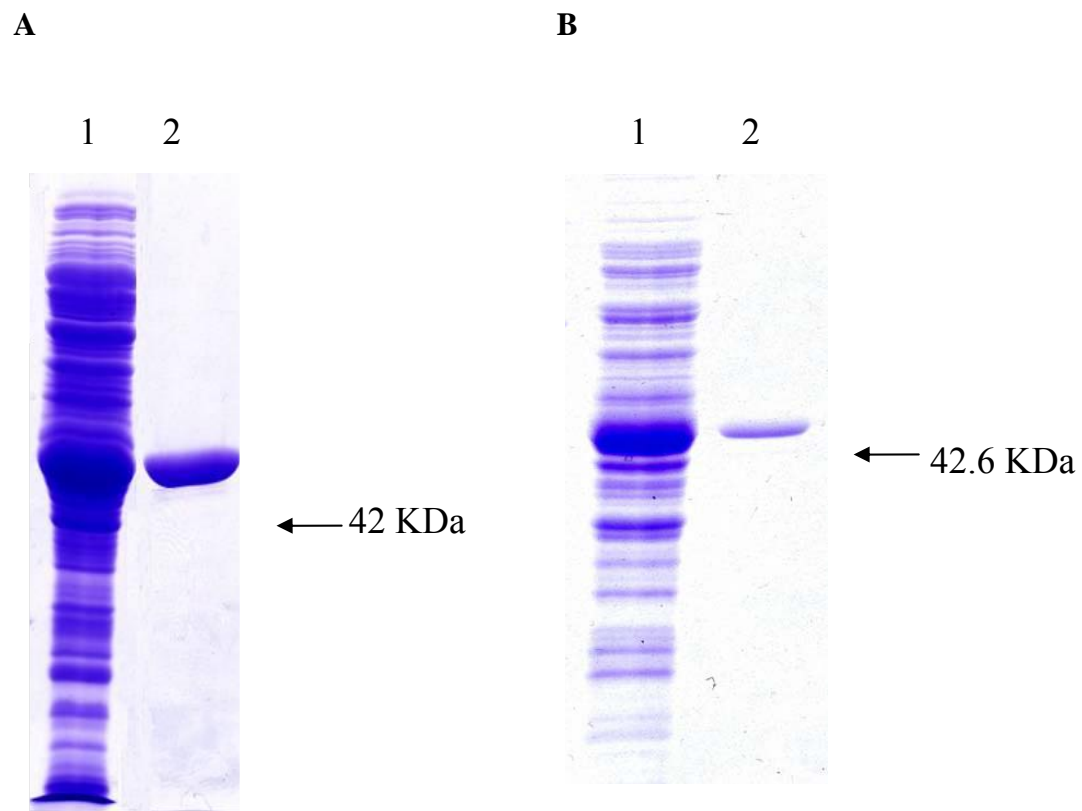


Figure 2

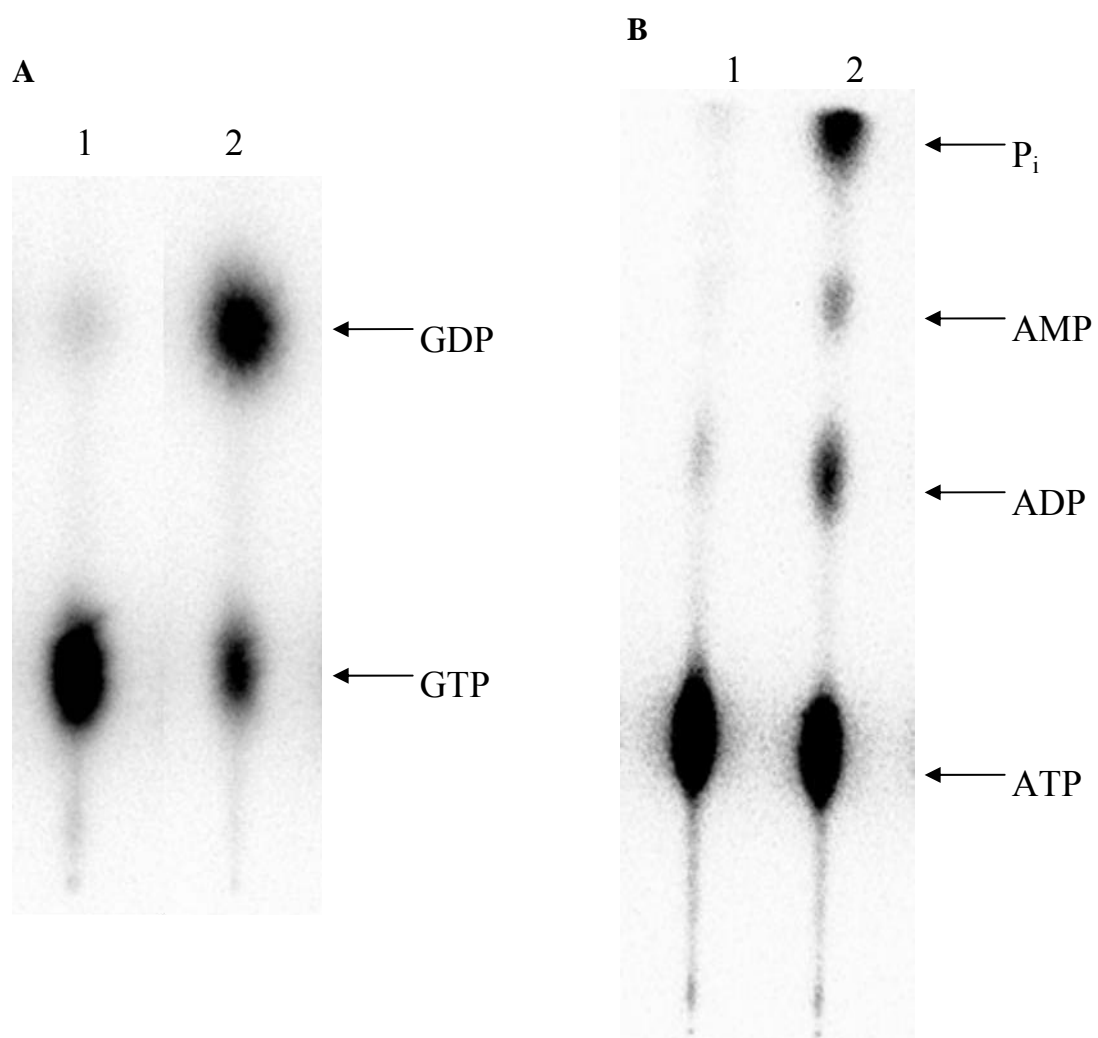


Figure 4

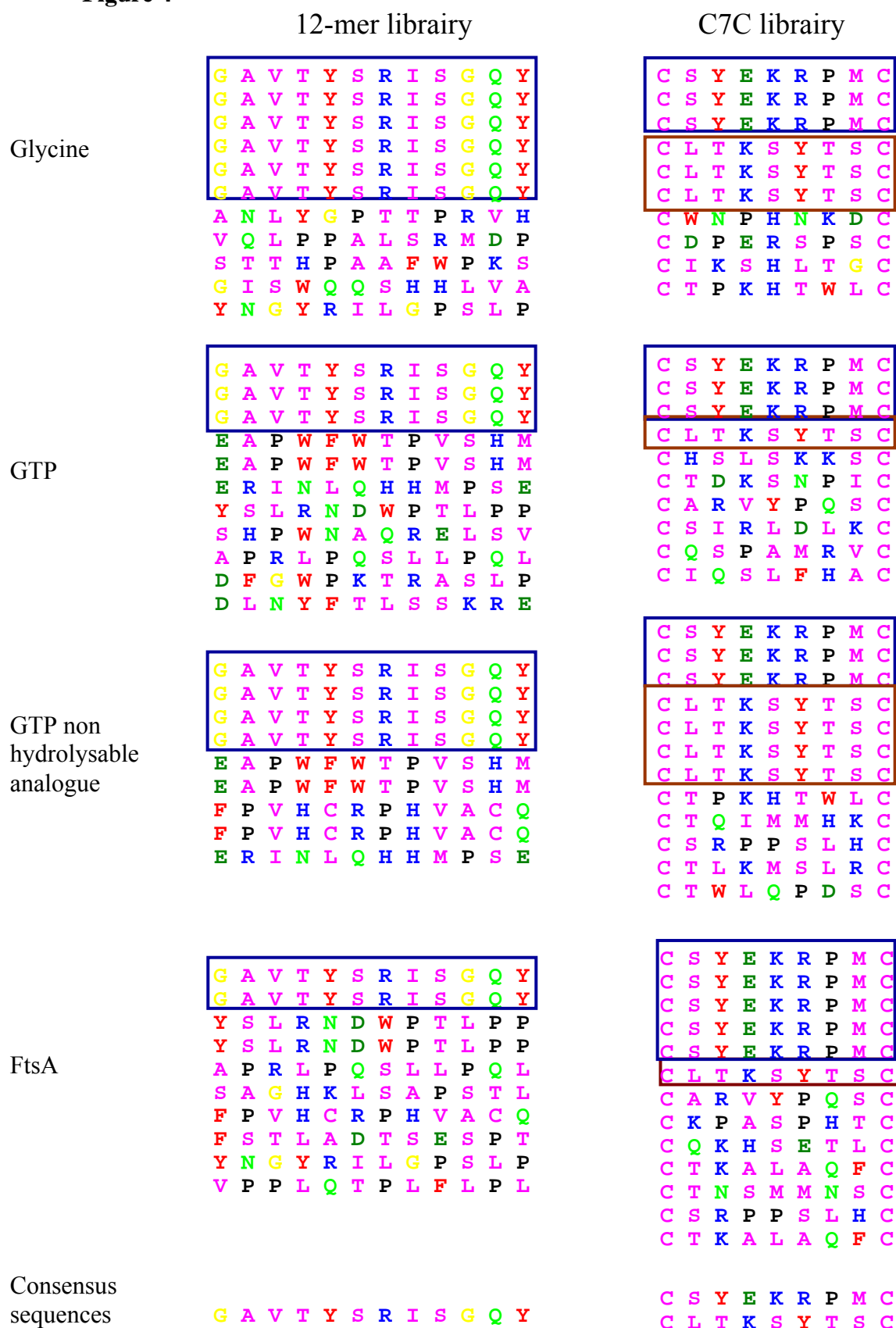


Figure 5

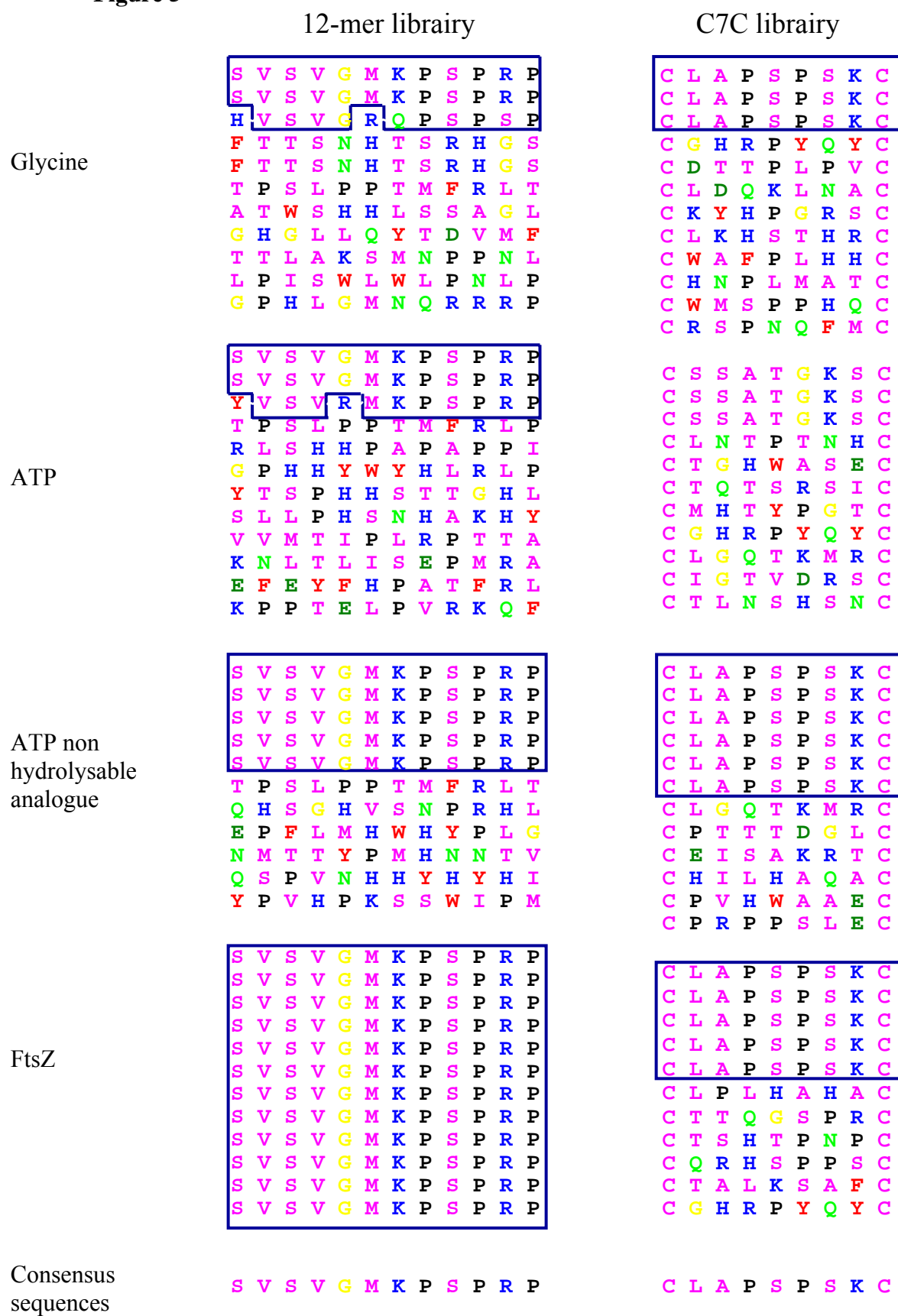


Figure 6

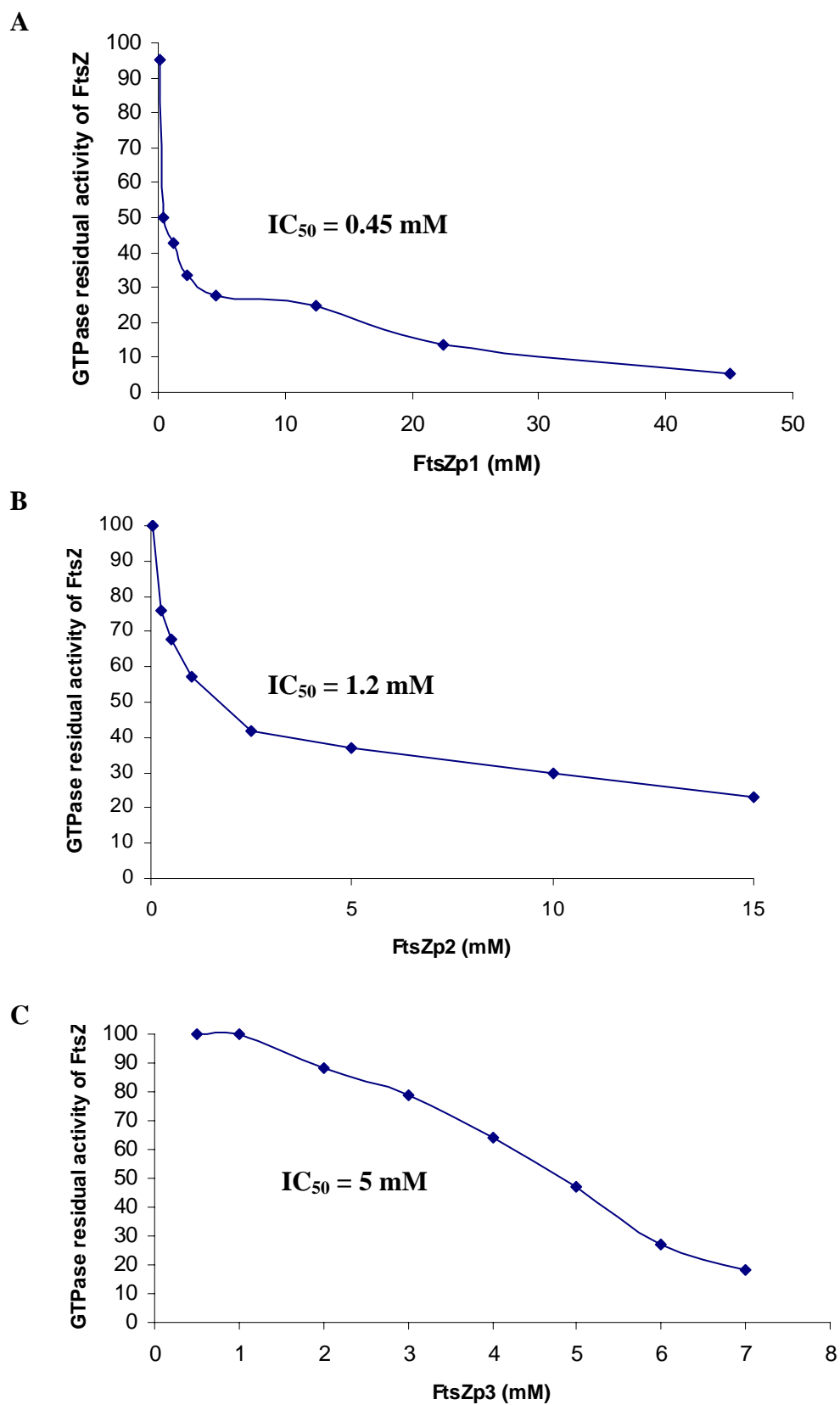
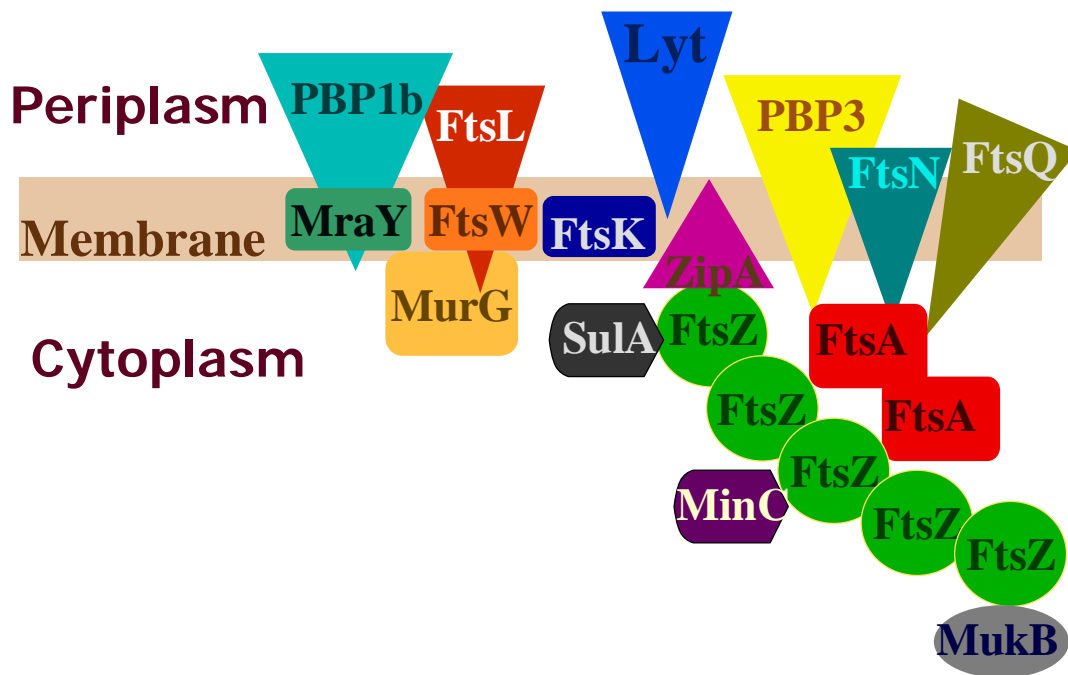


Figure 7



Chapitre 3

Conclusion

L'émergence et la réémergence des infections bactériennes représentent une problématique d'intérêt majeur en santé publique (Cohen 2000). L'évolution rapide et incessante des mécanismes de résistance aux antibiotiques ajoute une dimension critique à cette problématique (Normark and Normark 2002). Parmi les maladies infectieuses en émergence et réémergence, les infections bactériennes nosocomiales occupent une place prédominante. D'ailleurs, la résistance du pathogène opportuniste *P. aeruginosa* envers la majorité des antibiotiques utilisés à ce jour (Salysers and Whitt 2002) diminue l'efficacité de traitement et met en danger la vie des personnes infectées. Ainsi, le besoin de nouvelles classes d'agents antibactériens se fait de plus en plus pressant. Les méthodes traditionnelles et la chimie combinatoire occupent une place prédominante dans le développement des nouveaux agents pharmaceutiques. Cependant, l'avenue favorisée dans le cadre de ce projet met à profit la recherche de cibles bactériennes inusitées. Dans le but d'identifier de nouveaux agents antimicrobiens, nous exploitons la machinerie de division cellulaire bactérienne en tant que cible. Ce processus essentiel et hautement conservé dans l'évolution est absent du règne animal et il s'avère extrêmement sensible aux altérations (Breithaupt 1999). De plus, aucun antimicrobien connu ne s'attaque spécifiquement à la division cellulaire et les espèces bactériennes ne devraient pas avoir développé de mécanismes de résistance envers cette classe potentielle d'inhibiteurs. Parmi les protéines de division cellulaire, nous avons choisi les deux protéines les plus importantes et conservées en tant que cibles spécifiques; FtsZ et FtsA (Dai and Lutkenhaus 1992; van den Ent, Amos et al. 2001). Ces deux protéines possèdent une activité enzymatique pouvant être exploitée afin de cribler des inhibiteurs. Afin d'identifier de potentiels inhibiteurs, nous utilisons la technique de présentation phagique qui exploite la diversité génétique en permettant une sélection rapide et efficace de petits ligands peptidiques interagissant avec une cible thérapeutique déterminée (Christensen, Gottlin et al. 2001).

Au titre expérimental, les gènes *ftsZ* and *ftsA* ont tout d'abord été clonés et les protéines ont été respectivement purifiées par chromatographie et par renaturation de corps d'inclusion purifiés. Le séquençage en N-terminal a confirmé l'identité des protéines et un essai de chromatographie sur couche mince a également confirmé l'activité enzymatique respective de FtsZ et FtsA. Un essai de fixation aux UV a démontré que FtsZ lie préférentiellement le GTP et que FtsA fixe préférentiellement l'ATP parmi les 4 nucléotides marqués. Les

enzymes purifiées ont ensuite été utilisées pour identifier des peptides inhibiteurs avec la technique de présentation phagique. Les phages possédant une affinité spécifique pour FtsZ ou FtsA ont été élués selon quatre conditions spécifiques; la glycine à pH acide, le substrat de l'enzyme, un analogue non-hydrolysable du substrat et avec FtsA pour FtsZ et vice-versa. Nous avons identifié trois consensus peptidiques contre FtsZ et deux contre FtsA. La spécificité de l'interaction entre les peptides sélectionnés et FtsZ ou FtsA a été évaluée par ELISA et cela a permis d'identifier les peptides les plus affins. Les 3 consensus peptidiques sélectionnés contre FtsZ ont été synthétisés et testés sur l'activité GTPase de FtsZ. Les 2 peptides C7C inhibent l'activité enzymatique de FtsZ avec des valeurs de CI_{50} de 0,45 mM et 1,2 mM alors que le peptide 12-mer montre une CI_{50} de 5 mM.

En conclusion, ce projet de maîtrise a permis la caractérisation de trois inhibiteurs spécifiques de l'activité enzymatique essentielle de FtsZ et l'identification de plusieurs séquences peptidiques prometteuses contre FtsZ, FtsA et l'interaction protéine-protéine essentielle FtsZ-FtsA. Ces peptides constituent les premiers inhibiteurs de protéines essentielles à la division cellulaire bactérienne outre les inhibiteurs endogènes. Ainsi, les résultats de ce projet de maîtrise contribuent de façon significative à l'avancée de la science en apportant de nouvelles précisions sur la machinerie de division cellulaire bactérienne puis en fournissant une piste en vue du développement d'une nouvelle classe d'agents antibactériens.

En perspective, il serait utile de caractériser le mécanisme d'inhibition des peptides inhibiteurs et de déterminer leur constante d'inhibition. Il serait également nécessaire d'étudier leur pouvoir inhibiteur sur d'autres GTPase bactériennes afin d'évaluer leur spécificité en tant qu'agents antimicrobiens. L'usage thérapeutique des peptides ne s'avère pas avantageux étant donné le risque élevé de dégradation enzymatique puis leurs faibles perméabilité et biodisponibilité. Le peptidomimétisme devrait être utilisé afin de mettre à jour des structures non peptidiques apparentées qui contournent les désavantages des peptides et améliorent leurs propriétés pharmacologiques (Bursavich and Rich 2002). La problématique principale associée à la division cellulaire bactérienne en tant que cible provient de sa localisation cytoplasmique. Les inhibiteurs doivent donc atteindre des

concentrations inhibitrices dans le cytoplasme bactérien lors d'une infection dans l'hôte. Les modifications chimiques devront prendre ce fait en considération afin d'augmenter considérablement la perméabilité des molécules inhibitrices pour les cellules bactériennes. Cela devrait permettre la mise en marché d'une nouvelle classe d'agents antibactériens s'attaquant à une cible bactérienne inusitée.

Bibliographie

- Acar, J. et Courvalin, P. (1998). "La fin de l'âge d'or des antibiotiques." La Recherche **314**: 50-52.
- Axelsen, P. H. (2002). Essentials of antimicrobial pharmacology : a guide to fundamentals for practice. Totowa, NJ, Humana Press.
- Begg, K., Y. Nikolaichik, N. Crossland and W. D. Donachie (1998). "Roles of FtsA and FtsZ in activation of division sites." J Bacteriol **180**(4): 881-4.
- Breithaupt, H. (1999). "The new antibiotics." Nat Biotechnol **17**(12): 1165-9.
- Bursavich, M. G. and D. H. Rich (2002). "Designing non-peptide peptidomimetics in the 21st century: inhibitors targeting conformational ensembles." J Med Chem **45**(3): 541-58.
- Carettoni, D., P. Gomez-Puertas, L. Yim, J. Mingorance, O. Massidda, M. Vicente, A. Valencia, E. Domenici and D. Anderluzzi (2003). "Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of *Escherichia coli* FtsA." Proteins **50**(2): 192-206.
- Christensen, D. J., E. B. Gottlin, R. E. Benson and P. T. Hamilton (2001). "Phage display for target-based antibacterial drug discovery." Drug Discov Today **6**(14): 721-727.
- Cohen, M. L. (2000). "Changing patterns of infectious disease." Nature **406**(6797): 762-7.
- Cordell, S. C., E. J. Robinson and J. Lowe (2003). "Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7889-94.
- Cunha, B. A. (2001). "Effective antibiotic-resistance control strategies." Lancet **357**(9265): 1307-8.
- Dai, K. and J. Lutkenhaus (1992). "The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(19): 6145-51.
- Davies, J. C. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence." Paediatr Respir Rev **3**(2): 128-34.
- Den Blaauwen, T., N. Buddelmeijer, M. E. Aarsman, C. M. Hameete and N. Nanninga (1999). "Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*." J Bacteriol **181**(17): 5167-75.

- Diaz, J. F., A. Kralicek, J. Mingorance, J. M. Palacios, M. Vicente and J. M. Andreu (2001). "Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate." J Biol Chem **276**(20): 17307-15.
- Errington, J., R. A. Daniel and D. J. Scheffers (2003). "Cytokinesis in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **67**(1): 52-65, table of contents.
- Fauci, A. S. (2001). "Infectious diseases: considerations for the 21st century." Clin Infect Dis **32**(5): 675-85.
- Feucht, A., I. Lucet, M. D. Yudkin and J. Errington (2001). "Cytological and biochemical characterization of the FtsA cell division protein of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **40**(1): 115-25.
- Franklin, T. J. and G. A. Snow (1989). Biochemistry of antimicrobial action. London ; New York, Chapman and Hall.
- Galli, E., S. Silver, B. Witholt and Federation of European Microbiological Societies. (1992). Pseudomonas : molecular biology and biotechnology. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Geissler, B., D. Elraheb and W. Margolin (2003). "A gain-of-function mutation in *ftsA* bypasses the requirement for the essential cell division gene *zipA* in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4197-202.
- Geysen, H. M., F. Schoenen, D. Wagner and R. Wagner (2003). "Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge." Nat Rev Drug Discov **2**(3): 222-30.
- Goldberg, J. B. and G. B. Pier (2000). "The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis." Trends Microbiol **8**(11): 514-20.
- Hancock, R. E. and F. S. Brinkman (2002). "Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux." Annu Rev Microbiol **56**: 17-38.
- Haney, S. A., E. Glasfeld, C. Hale, D. Keeney, Z. He and P. de Boer (2001). "Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ.ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA." J Biol Chem **276**(15): 11980-7.
- Hoess, R. H. (2001). "Protein design and phage display." Chem Rev **101**(10): 3205-18.
- Hughes, D. (2003). "Microbial genetics: Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance." Nat Rev Genet **4**(6): 432-41.

- Hyde-DeRuyscher, R., L. A. Paige, D. J. Christensen, N. Hyde-DeRuyscher, A. Lim, Z. L. Fredericks, J. Kranz, P. Gallant, J. Zhang, S. M. Rocklage, D. M. Fowlkes, P. A. Wendler and P. T. Hamilton (2000). "Detection of small-molecule enzyme inhibitors with peptides isolated from phage-displayed combinatorial peptide libraries." Chem Biol **7**(1): 17-25.
- Kaplan, J. E., K. Sepkowitz, H. Masur, T. Sirisanthana, M. Russo and L. Chapman (2001). "Opportunistic infections in persons with HIV or other immunocompromising conditions." Emerg Infect Dis **7**(3 Suppl): 541.
- Kay, B. K., J. Kasanov and M. Yamabhai (2001). "Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries." Methods **24**(3): 240-6.
- Lackner, L. L., D. M. Raskin and P. A. de Boer (2003). "ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane *in vitro*." J Bacteriol **185**(3): 735-49.
- Lee, K. H. and J. E. Oh (2000). "Design and synthesis of novel antimicrobial pseudopeptides with selective membrane-perturbation activity." Bioorg Med Chem **8**(4): 833-9.
- Lehn, J. M. and A. V. Eliseev (2001). "Dynamic combinatorial chemistry." Science **291**(5512): 2331-2.
- Lehoux, D. E., F. Sanschagrín and R. C. Levesque (2002). "Identification of *in vivo* essential genes from *Pseudomonas aeruginosa* by PCR-based signature-tagged mutagenesis." FEMS Microbiol Lett **210**(1): 73-80.
- Lowe, J. and L. A. Amos (1998). "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ." Nature **391**(6663): 203-6.
- Lutkenhaus, J. and S. G. Addinall (1997). "Bacterial cell division and the Z ring." Annu Rev Biochem **66**: 93-116.
- Ma, X., D. W. Ehrhardt and W. Margolin (1996). "Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12998-3003.
- Ma, X., Q. Sun, R. Wang, G. Singh, E. L. Jonietz and W. Margolin (1997). "Interactions between heterologous FtsA and FtsZ proteins at the FtsZ ring." J Bacteriol **179**(21): 6788-97.
- Margolin, W. (1999). "The Bacterial Cell Division Machine." ASM News **65**(3): 137-143.
- May, T. B., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, R. K. Rothmel and et al. (1991). "Alginate synthesis by

- Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients." Clin Microbiol Rev **4**(2): 191-206.
- Nanninga, N. (1998). "Morphogenesis of *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 110-29.
- Nefzi, A., C. Dooley, J. M. Ostresh and R. A. Houghten (1998). "Combinatorial chemistry: from peptides and peptidomimetics to small organic and heterocyclic compounds." Bioorg Med Chem Lett **8**(17): 2273-8.
- Normark, B. H. and S. Normark (2002). "Evolution and spread of antibiotic resistance." J Intern Med **252**(2): 91-106.
- Peczuh, M. W. and A. D. Hamilton (2000). "Peptide and protein recognition by designed molecules." Chem Rev **100**(7): 2479-94.
- Pichoff, S. and J. Lutkenhaus (2001). "*Escherichia coli* division inhibitor MinCD blocks septation by preventing Z-ring formation." J Bacteriol **183**(22): 6630-5.
- Pichoff, S. and J. Lutkenhaus (2002). "Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*." EMBO J **21**(4): 685-93.
- Pitt, T. L. (2002). "Cross infection of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa*." Thorax **57**(11): 921.
- Prentice, T., Ed. (2000). Rapport sur la santé dans le monde. Genève, Organisation mondiale de la santé.
- Projan, S. J. (2002). "New (and not so new) antibacterial targets - from where and when will the novel drugs come?" Curr Opin Pharmacol **2**(5): 513-22.
- Romberg, L., M. Simon and H. P. Erickson (2001). "Polymerization of Ftsz, a bacterial homolog of tubulin. is assembly cooperative?" J Biol Chem **276**(15): 11743-53.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002). Bacterial pathogenesis : a molecular approach. Washington, D.C., ASM Press.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scheffers, D. J., J. G. de Wit, T. den Blaauwen and A. J. Driessen (2002). "GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers." Biochemistry **41**(2): 521-9.
- Scheffers, D. J. and A. J. Driessen (2002). "Immediate GTP hydrolysis upon FtsZ polymerization." Mol Microbiol **43**(6): 1517-21.

- Sidhu, S. S. (2000). "Phage display in pharmaceutical biotechnology." Curr Opin Biotechnol **11**(6): 610-6.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory and M. V. Olson (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-64.
- Stricker, J., P. Maddox, E. D. Salmon and H. P. Erickson (2002). "Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3171-5.
- Thompson, L. A. and J. A. Ellman (1996). "Synthesis and applications of small molecule libraries." Chem Rev **96**(1): 555-600.
- van den Ent, F., L. Amos and J. Lowe (2001). "Bacterial ancestry of actin and tubulin." Curr Opin Microbiol **4**(6): 634-8.
- van den Ent, F. and J. Lowe (2000). "Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*." EMBO J **19**(20): 5300-7.
- Walsh, C. (2003). Antibiotics : actions, origins, resistance. Washington, D.C., ASM Press.
- Weiss, D. S., J. C. Chen, J. M. Ghigo, D. Boyd and J. Beckwith (1999). "Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL." J Bacteriol **181**(2): 508-20.
- Witte, W. (1997). "Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans." Ciba Found Symp **207**: 61-71; discussion 71-5.
- Yan, K., K. H. Pearce and D. J. Payne (2000). "A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*." Biochem Biophys Res Commun **270**(2): 387-92.
- Yim, L., G. Vandenbussche, J. Mingorance, S. Rueda, M. Casanova, J. M. Ruyschaert and M. Vicente (2000). "Role of the carboxy terminus of *Escherichia coli* FtsA in self-interaction and cell division." J Bacteriol **182**(22): 6366-73.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-95.
- Zhulanova, E. and K. Mikulik (1998). "Characterization of *ftsZ* gene and its protein product from *Streptomyces collinus* producing kirromycin." Biochem Biophys Res Commun **249**(2): 556-61.

Annexe A

Présentation sous forme d'affiche au congrès CBDN (Canadian Bacterial Diseases Network) à Calgary le 25 avril 2003.

Strategy for Screening and Identification of Inhibitor Peptides of the Bacterial Divisome and Peptidoglycan Synthesis. Paradis-Bleau Catherine, El Zoeiby Ahmed, Beaumont Mélanie, Boudreault Lydia, Sanschagrin François, Loyd Adrian and Levesque Roger C. Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Dept. Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Ste-Foy, Québec, G1K 7P4.

With the objective of developing new classes of antimicrobial agents and inhibitors, we exploited the phage display technology against essential bacterial divisome proteins. The FtsZ-FtsA protein complex is responsible for septation of daughter cells; while the MurD, E and F enzymes are essential for the synthesis of the peptidoglycan precursor. *Pseudomonas aeruginosa* genes encoding FtsZ, FtsA, MurD, MurE and MurF were cloned into pET expression vectors with His-tag fusions and proteins were expressed in *E. coli* BL21 (λ DE3) and purified. Enzyme purity was estimated at >99% homogeneity and their identities were confirmed by N-terminal sequencing. The ATPase activity of FtsZ and MurD along with the GTPase activity of FtsZ was confirmed by thin layer chromatography and by development of an HTS microtiter plate coupled enzyme assay. We used FtsZ, FtsA, MurD, MurE and MurF purified proteins to screen C-7-C and 12-mers libraries containing 10^9 peptides fused to the phage M13 pIII minor coat protein. Screening was done using 3 rounds of biopanning with stringent washes; competitive elution was done using specific substrates synthesized *in vitro*, analogues and with FtsA known to bind FtsZ. Phages were selected from each biopanning step and DNA encoding peptides sequenced. Bioinformatics analysis identified consensus peptide sequences for the 5 enzymes studied. A collection of peptides were synthesized, purified and used to determine specific inhibition of ATPase and GTPase activity. Peptide/protein interactions were analysed by ELISA. The peptides FtsZp1 and FtsZp2 showed inhibition of FtsZ GTPase activity with an IC_{50} value of 450 μ M and of 1 mM for FtsZp3. Studies done with MurD identified a

peptide with an IC_{50} of $<10 \mu\text{M}$. Peptides identified will be used for HTS screening of a combinatorial library of peptidomimetic molecules.

Annexe B

Présentation sous forme d'affiche au congrès CBDN (Canadian Bacterial Diseases Network) à Calgary le 25 avril 2003.

Combinatorial Enzymatic Assay for the HTS Screening of a New Class of Small Molecule Inhibitors of Bacterial Cell Division Paradis-Bleau Catherine, Beaumont Mélanie, Sanschagrin François, Levesque Roger C., Pavillon Charles-Eugène-Marchand, Dept. Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Ste-Foy, Québec, G1K 7P4

As a model system for designing inhibitors of prokaryotic cell division, we studied the essential and highly conserved FtsZ divisosome protein from *P. aeruginosa* against a collection of substrate analogues synthesized by combinatorial chemistry. The *ftsZ* gene cloned into pET30a was expressed; conditions were optimized with a yield of 20 mg/L of FtsZ and purified with more than 99% homogeneity. A series of assays was used to study and identify FtsZ preferred substrate and specificity. Substrate specificity and hydrolysis was used as a tool to measure FtsZ activity and develop an enzyme assay where the decrease in absorbance was confirmed to proportionally follow FtsZ activity. The enzyme assay was optimized for specificity and for several parameters including substrate, reaction buffer and additives. A high throughput assay was thus developed and optimized. For a preliminary analysis in combinatorial chemistry and HTS screening of FtsZ, we synthesized a family of small molecule substrate analogues. HTS screening identified 10 compounds inhibiting FtsZ activity and with IC₅₀ values between 450 µM and 2.8 mM. Antibacterial activity was tested against *E. coli* and *S. aureus* whole cells and 2 compounds inhibited *S. aureus* growth. The HTS assay developed for future screening of compound libraries and for the screening of families of analogues synthesized from lead compounds identified is the first step in identification of a bacterial cell division inhibitor.

Annexe C

Présentation sous forme d'affiche au congrès CREFSIP (Centre de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines) à Québec le 2 mai 2003.

Sélection de peptides inhibiteurs de la fonction GTPase de l'enzyme FtsZ essentielle à la division cellulaire procaryote

Paradis-Bleau Catherine, Boudreault Lydia, Sanschagrín François, Levesque Roger C.
Centre de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (CREFSIP), Université Laval, 4142 Pav. Charles-Eugène-Marchand, département de Biologie Médicale, Faculté de Médecine, Université Laval, Ste-Foy, Québec, G1K 7P4.

Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* hautement résistant aux antibiotiques infecte 90 % des patients atteints de fibrose kystique ainsi que les personnes immunodéprimées. Afin d'identifier de nouveaux antimicrobiens, nous exploitons la machinerie de division cellulaire procaryote en tant que cible. Tout d'abord, le gène *ftsZ* de *P. aeruginosa* a été cloné dans le vecteur de surexpression pET30a et fusionné avec une étiquette histidine en C-terminal. L'enzyme essentielle et hautement conservée FtsZ a été surexprimée dans *E. coli* BL21 (λ DE3) puis purifiée à plus de 99% par chromatographie d'affinité au nickel. L'activité GTPase de FtsZ a été démontrée par TLC puis son identité a été confirmée par séquençage en N-terminal. Nous avons criblé les banques de bactériophages C-7-C et 12-mers avec l'enzyme active. Ces banques contiennent 10^9 peptides différents fusionnés à la protéine mineur pIII de la capsid du phage M13. La spécificité de la technique de présentation phagique a été maximisée et effectuant 3 rondes de biocriblage au cours desquelles la rigueur des lavages a été augmentée puis le temps de contact des phages avec FtsZ a été diminué. Les phages adhérents ont été élués avec de la glycine à pH acide puis de façon compétitive avec le GTP, un analogue non hydrolysable du substrat (5'-guanylylimidodiphosphate) et avec la protéine FtsA qui stabilise l'anneau FtsZ. Ces phages ont été purifiés et l'ADN phagique a été extrait et séquencé. La bioinformatique nous a permis d'identifier trois consensus peptidiques prometteurs contre

FtsZ soit deux peptides C7C FtsZp1 et FtsZp2 ainsi qu'un 12 mers FtsZp3. La spécificité de l'interaction entre chacun de ces peptides et FtsZ a été analysée par ELISA. Les peptides synthétisés inhibent l'activité GTPase de FtsZ avec une CI_{50} de 1,5mM pour les deux peptides C7C et de 5mM pour FtsZp3. Le DTT, un agent réducteur, diminue l'inhibition par FtsZp2 et indique que la conformation du peptide C7C avec son pont disulfure apporte beaucoup à son activité inhibitrice. L'inhibition de FtsZ est d'un intérêt majeur car elle mène à un phénotype létal permettant d'envisager la production de nouveaux antimicrobiens.

Annexe D

Présentation sous forme d'affiche à la journée de la recherche de la Faculté de médecine de l'université Laval à Québec le 8 mai 2003.

IDENTIFICATION DE PEPTIDES INHIBITEURS DES PROTÉINES BACTÉRIENNES FTSA ET FTSZ CONTRÔLANT LA DIVISION CELLULAIRE.

Paradis-Bleau Catherine, Boudreault Lydia, El Zoeiby Ahmed, Sanschagrín François, Levesque Roger C.

Centre de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (CREFSIP).

Objectifs : Le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* hautement résistant aux antibiotiques infecte 90 % des patients atteints de fibrose kystique. Afin d'identifier de nouveaux antimicrobiens, nous exploitons la machinerie de division cellulaire procaryote en tant que cible. **Méthodes:** FtsA et FtsZ, deux enzymes essentielles hautement conservées, ont été surexprimées dans *E. coli* puis purifiées. L'activité ATPase de FtsA et GTPase de FtsZ ont été démontrées par TLC puis leur identité a été confirmée par séquençage. Nous avons criblé les banques de bactériophages C-7-C et 12-mers contenant chacune 10^9 fusions peptidiques différentes avec les enzymes actives. Les phages adhérents aux protéines ont été élués avec de la glycine à pH acide puis de façon compétitive avec le substrat de l'enzyme, un analogue non hydrolysable du substrat ainsi qu'avec FtsZ pour FtsA et vice-versa. L'ADN a été extrait des phages et les peptides ont été identifiés. La spécificité de l'interaction entre les peptides et FtsA ou FtsZ a été analysée par ELISA. **Résultats :** Nous avons identifié trois consensus peptidiques contre FtsZ ainsi que plusieurs séquences peptidiques contre FtsA. De plus, l'éluion compétitive FtsA-FtsZ a mené à l'identification d'un fort consensus peptidique. La spécificité de l'interaction entre chacun des peptides mentionnés et FtsA ou FtsZ a été analysée. **Conclusion :** Les peptides synthétisés pourraient inhiber l'activité ATPase, GTPase et l'interaction cruciale entre FtsA et FtsZ. L'inhibition de ces enzymes est d'un intérêt majeur car elle mène à un phénotype létal permettant d'envisager la production de nouveaux antimicrobiens.

Annexe E

Présentation sous forme d'affiche au congrès CSM (Canadian Society of Microbiology) à Laval le 26 mai 2003.

Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. 2003. Molecular genomics and biochemical characterization of the FtsA and FtsZ cell division proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. 53rd Annual Meeting of the Canadian Society for Microbiologists, Laval, Quebec. May 25 to 28, 2003.

The revolutionary era of antibiotics has been surpassed by the evolutionary capacity of microorganisms to develop resistance. The acute resistance of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* to most classes of antibiotics is a good example. With the objective of developing new classes of antimicrobial agents, we must have a better understanding of essential prokaryotic mechanisms such as bacterial cell division. We studied FtsA and FtsZ, two essential and highly conserved proteins in bacteria. FtsA and FtsZ from *P. aeruginosa* were cloned in the pET30a overexpression vector and fused with a his tag at the C terminus. Overexpression of FtsA in *E. coli* BL21-(λ DE3) led to the accumulation of the protein in inclusion bodies. To overcome this frequent problem, we developed a protocol permitting the isolation, refolding and production of a biologically active FtsA. We obtained 5 mg of 99% pure FtsA with a concentration of 0.5 mg/mL and N-terminal sequencing confirmed the identity of the protein. Overexpression of FtsZ permitted the accumulation of soluble proteins in the cytoplasm of *E. coli* BL21-(λ DE3) and FtsZ was purified on a nickel affinity chromatography. We obtained 20 mg of 99% pure FtsZ with a concentration of 13.5 mg/mL with an identity confirmed by N-terminal sequencing. A UV cross-linking assay was used to study the FtsA binding of ATP and showed that FtsZ binds preferentially GTP among the 4 nucleotides used as substrates. We characterized the specificity of enzymatic activity of each enzyme through a TLC assay. Hydrolysis of nucleotide substrates was measured using P³²-labelled nucleotides. We noted that FtsA hydrolyses predominantly ATP and weakly GTP, CTP and TTP. It was also noted that FtsZ hydrolyses predominantly ATP and weakly GTP, CTP and TTP. This information

could be useful for the development of screening assays for analysis new inhibitors of prokaryotic cell division.

Annexe F

Présentation sous forme d'affiche au congrès CSM (Canadian Society of Microbiology) à Laval le 26 mai 2003.

Paradis-Bleau, C., Boudreault, L., Zoeiby, A., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. 2003. Identification of peptide inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* FtsZ GTPase activity using phage display. 53rd Annual Meeting of the Canadian Society for Microbiologists, Laval, Quebec. May 25 to 28, 2003.

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* frequently infects cystic fibrosis patients and immuno-compromised individuals. The acute resistance of *P. aeruginosa* to most classes of antibiotics lowers the efficacy of treatment. We are using the bacterial cell division machinery as a tool to identify new antimicrobial agents. The essential and highly conserved protein FtsZ from *P. aeruginosa* was used to screen for GTPase peptide inhibitors with the phage display technique. We used a C-7-C and a 12-mer libraries containing 10^9 different peptide fusions. The specificity of the screening was done by 3 rounds of biopanning and each round specificity was raised by increasing the stringency of the wash and by decreasing the time of contact between the phage and FtsZ. A competitive elution was done with 1 mM GTP and 5'-guanylylimidodiphosphate (a non-hydrolysable analogue of GTP). Peptides were isolated as phages and DNA of 20 phages per screening were sequenced. We identified 3 interesting consensus peptides which could be GTPase peptide inhibitors of FtsZ. The specificity of the interaction between each peptide and FtsZ was analysed by ELISA. FtsZ was coated in a microplate well and the phage clone containing the corresponding peptide fusion was added. Biotinylated anti-fd rabbit polyclonal antibodies, HRP-streptavidine and its substrate ABTS were used to estimate protein-protein interaction. The 3 promising peptides have been synthesized and were tested on the GTPase activity of FtsZ. The inhibition of FtsZ represents a crucial target because the constriction of the Z-ring is the most important step in prokaryotic cell division. The phage display technique was helpful in the discovery of new promising peptides for the development of new antimicrobial agents.

Annexe G

Présentation sous forme d'affiche au congrès CSM (Canadian Society of Microbiology) à Laval le 26 mai 2003.

Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F. and Levesque, R.C. 2003. Molecular studies of *Pseudomonas aeruginosa* FtsA and FtsZ interactions and screening for ATPase peptide inhibitors of FtsA by phage display. 53rd Annual Meeting of the Canadian Society for Microbiologists, Laval, Quebec. May 25 to 28, 2003.

The complete 6.3 Mpb genome sequence and the resistance of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* to most classes of antibiotics represent a genomics tool for identification of novel targets for new antibacterials. With the prospect of finding new inhibitors of prokaryotic cell division, we screened for ATPase peptide inhibitors of FtsA and studied the interaction of two essential proteins: FtsA and FtsZ. As a first step, purified FtsA from *P. aeruginosa* was used to carry out each of the 3 rounds of phage display with the C-7-C and the 12-mers libraries containing 10^9 different peptides. The specificity of the 3 rounds of biopanning was raised by increasing the stringency of the wash and by decreasing the time of contact between the peptide and the protein. A competitive elution was done with 1 mM ATP and 5'-adenylylimidodiphosphate (a non-hydrolysable analogue of ATP). Peptides were isolated as phages and DNA of 20 phages per screening were sequenced. We identified many peptide sequences which could be ATPase peptide inhibitors of FtsA. A competitive elution with FtsZ gave us 2 consensus peptide sequences. These promising peptides were synthesised as they could also be inhibitors of the FtsA-FtsZ interaction. To characterize the effect of these peptides, we developed a new protein-protein interaction assay. FtsA was coated in a microplate well and biotinylated FtsZ was added. HRP-streptavidine and its substrate ABTS were used to quantify the FtsA-FtsZ interaction. This interaction is essential for the constriction of the Z-ring and is sensitive to this specific alteration which can be quantified *in vitro*. Analysis technique coupled to *in vivo* whole bacteria cell monitoring is a promising approach for the identification of new antimicrobial agents via high throughput screening *in vivo*.