

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Les endolysines de *Clostridium difficile*:
Potentiel thérapeutique pour traiter les infections à *C. difficile* (ICD)**

Par
Stéphanie Mauler

Département de Microbiologie et Infectiologie
Laboratoire de Louis-Charles Fortier

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc) en microbiologie

Mai 2010

Évaluateurs (Université de Sherbrooke) :

Dr Louis-Charles Fortier, Microbiologie et infectiologie	Directeur de recherche
Dr Sherif Abou Elela, Microbiologie et infectiologie	Membre de jury interne
Dr Éric Massé, Biochimie	Membre de jury externe



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-79798-3
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-79798-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ANNEXES	X
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
RÉSUMÉ	XIV
1. INTRODUCTION	1
1.1. Généralité sur les antibiotiques et la résistance	1
1.2. <i>Clostridium difficile</i>	Erreur ! Signet non défini.
1.2.1. Pathogénèse des ICD	7
1.2.2. Émergence d'une souche hypervirulente.....	9
1.2.3. Thérapies actuelles	11
1.2.4. Alternatives.....	12
1.3 Les endolysines	14
1.3.1 Structure des endolysines	17
1.3.2 Mode d'action des endolysines	19
1.3.3 Avantages des endolysines face aux antibiotiques.....	22
1.3.4 Les endolysines chez <i>C. difficile</i>	24

1.4 Démarches générales pour l'expression et la purification d'une protéine	
recombinante.....	25
1.4.1. Propriétés de la protéine à considérer.....	26
1.4.2. Choix du vecteur.....	27
1.4.3. Choix de l'hôte	28
1.4.4. Choix de la technique de purification.....	29
1.4.5. Essais d'activité lytique.....	31
1.5 Objectif de ma maîtrise.....	32
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	34
2.1 Souches utilisées et milieux	34
2.2 Plasmides utilisés pour les clonages	35
2.2.1 pBAD/HisB	35
2.2.2 pQE-80L.....	36
2.3 Extraction et purification d'ADN	36
2.4 Extraction d'acides nucléiques en utilisant les endolysines.....	38
2.4.1 Extraction d'ARN à l'aide des endolysines.....	38
2.5 Clonage des endolysines.....	38
2.5.1 Préparation des inserts.....	39
2.5.2 Préparation des vecteurs	41
2.5.3 Ligations des ADNs	42

2.5.4	Transformations d'ADN dans des cellules <i>E. coli</i> chimio-compétentes et obtention des clones	42
2.6	Expression et purification des endolysines.....	43
2.6.1	Expression dans <i>E. coli</i> et détermination de la solubilité des protéines recombinantes	43
2.6.1.1	Induction.....	43
2.6.1.2	Analyse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	44
2.6.1.3	Détermination de la solubilité de la protéine exprimée	45
2.7	Méthode finale pour la préparation des endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2	46
2.7.1	Induction à grande échelle et préparation de l'extrait total des protéines	46
2.7.1.1	Induction à grande échelle.....	46
2.7.1.2	Préparation de l'extrait total des protéines par Freezer/Mill	47
2.7.2	Purification sur colonne au Nickel.....	48
2.7.2.1	Par FPLC.....	48
2.7.2.2	Purification manuelle.....	49
2.7.3	Dosage des protéines totales par le test de Bradford.....	50
2.8	Essais enzymatiques	51
2.8.1	Essais enzymatiques par turbidité	51
2.8.1.1	Méthode générale pour tous les essais.....	51
2.8.1.1.1	Activité en fonction de la concentration de PlyCD52 et PlyCD38-2 ...	52

2.8.1.1.2	Influence de certains cofacteurs sur l'activité enzymatique.....	53
2.8.1.1.3	Influence du pH sur l'activité enzymatique.....	54
2.9	Buvar dage de type Southern pour identifier de nouvelles endolysines.....	54
2.9.1	Préparation des sondes DIG	55
2.9.2	Buvar dage de type Southern.....	56
2.10	Séquençage des ADN.....	57
2.11	Analyses bio-informatiques	58
3.	RÉSULTATS	59
3.1	Tentative de caractérisation de PlyCD630-1.....	59
3.2	Comparaison des séquences protéiques des endolysines	65
3.3	Caractérisation des endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2	68
3.3.1	Clonage des gènes <i>plyCD52</i> et <i>plyCD38-2</i> et expression des protéines	68
3.3.2	Essais enzymatiques	72
3.3.2.1	Essais enzymatiques en turbidité.....	72
3.3.2.1.1	Contrôle de pQE-80L induit.....	72
3.3.2.1.2	Tentatives pour résoudre le problème de solubilité.....	75
3.3.2.1.3	Activité lytique en fonction de la concentration d'endolysine.....	79
3.3.2.1.4	Effet de l'ajout de différents cofacteurs	83
3.3.2.1.5	Effet du pH sur l'activité lytique	85
3.3.2.1.6	Spécificité des endolysines.....	86

3.2 Applications potentielles des endolysines.....	89
3.2.1 Extraction d'acides nucléiques.....	89
3.3 Détection de <i>C. difficile</i> à l'aide d'une endolysine modifiée avec la GFP.....	90
3.4 Buvardage de type Southern pour trouver d'autres endolysines	91
4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	95
4.1 Rappel de la problématique	95
4.2 Le défi de travailler avec <i>C. difficile</i>	96
4.3 L'endolysine PlyCD630-1	97
4.4 Les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2	100
4.4.1. Hypothèse pouvant expliquer la précipitation des endolysines	100
4.4.1.1. Point isoélectrique des protéines.....	100
4.4.1.2. Hydrophobicité des protéines	101
4.4.1.3. Interactions protéines et milieu.....	102
4.4.1.4. Interactions protéines-protéines.....	103
4.4.2. Activité avec différentes concentrations de PlyCD52 et PlyCD38-2	106
4.4.2.1. Optimisation de l'activité de PlyCD52 et PlyCD38-2.....	107
4.4.2.2. Optimisation à l'aide de cofacteurs	107
4.4.2.3. Optimisation à l'aide du pH.....	108
4.4.2.4. Effet de différents substrats	109
4.5. Autres applications des endolysines	110

4.5.1. Extraction d'acides nucléiques.....	110
4.5.2 Outil de diagnostic	111
4.6 Obtention d'autres endolysines.....	112
4.7 Perspectives.....	113
4.8 Conclusion.....	115
ANNEXE 1 :	116
ANNEXE 2:	118
ANNEXE 3:	121
RÉFÉRENCES:	127

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Colite pseudomembraneuse.....	6
Figure 2: Pathogénèse des infections à <i>Clostridium difficile</i>	8
Figure 3:Toxines produites par <i>Clostridium difficile</i>	9
Figure 4: Prévalence en 2008 de la souche NAP1/027	10
Figure 5: Sites de clivage au niveau du peptidoglycane des différentes classes d'endolysines	16
Figure 6: Structure tridimensionnelle de Ply Cpl-1	18
Figure 7: Lyse <i>in vitro</i> de <i>B. cereus</i> par 5 unités de PlyG.	21
Figure 8: Traitement <i>in vivo</i> de <i>S. pneumoniae</i> par PlyCpl-1.....	21
Figure 9: Effet de 100 U/ml de Pal sur différentes bactéries <i>in vitro</i> en 30 secondes	23
Figure 10: Stratégies et facteurs à considérer pour le développement d'un protocole de purification d'une enzyme.	26
Figure 11: Tests d'induction et de solubilité de PlyCD630-1 cloné dans pBAD/HisB.....	60
Figure 12: Chromatogramme de la purification de PlyCD630-1 sur colonne au nickel. ..	61
Figure 13: Purification de PlyCD630-1	62
Figure 14: Coupure à l'entérokinase de PlyCD630-1.....	63
Figure 15: Induction de PlyCD630-1 clonée dans pQE-80L.....	64
Figure 16: Comparaison des séquences protéiques de différentes endolysines.....	67
Figure 17: Constructions plasmidiques de PlyCD52 et PlyCD38-2.....	68
Figure 18: Induction et solubilité de PlyCD38-2 et PlyCD52.....	69
Figure 19: Purification de PlyCD38-2 et PlyCD52	71
Figure 20: Purification contrôle à partir d'une souche contenant pQE-80L vide.....	73

Figure 21: Contrôle de l'activité lytique dans des fractions d' <i>E. coli</i> exprimant seulement le vecteur pQE-80L vide.....	74
Figure 22: Effet du glycérol sur l'intégrité des cellules de <i>C. difficile</i> CD24	76
Figure 23 : Activité de PlyCD52 après induction de 4 h ou 16 h.....	78
Figure 24: Activité lytique des endolysines en fonction de la quantité d'enzyme	82
Figure 25: Activité lytique des endolysines en présence de divers cofacteurs.....	84
Figure 26: Activité lytique des endolysines en fonction du pH.....	86
Figure 27 : Activité lytique de PlyCD52 sur différentes souches.....	88
Figure 28: Construction plasmidique de GFP-CBD	91
Figure 29: Buvardage de type Southern avec des sondes de PlyCD52 et PlyCD38-2	93
Figure 30: Carte du vecteur pBAD/HisB (Invitrogen)	119
Figure 31: Séquence de la région promotrice du vecteur pBAD\HisB.....	119
Figure 32: Carte du vecteur pQE-80L (QIAGEN)	120
Figure 33: Séquence partielle du vecteur pQE-80L montrant le site de clonage multiple	120
Figure 34: Séquence partielle de la région promotrice du vecteur pQE-80L montrant le site des amorces utilisées pour le séquençage	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Mécanismes de résistance développés par les bactéries	2
Tableau 2 : Résistances associées aux différentes classes d'antibiotiques.....	3
Tableau 3 : Principales espèces bactériennes résistantes.....	4
Tableau 4: Principaux mécanismes de résistance chez <i>Clostridium difficile</i>	5
Tableau 5: Caractéristiques des différentes souches d' <i>E. coli</i> BL21.....	29
Tableau 6: Diverses étiquettes utilisées pour la purification de protéines recombinantes.	30
Tableau 7 : Conditions générales de PCR pour l'amplification des différents gènes.....	40
Tableau 8: Températures d'appariement utilisées pour l'amplification des différents gènes et fragments.....	40
Tableau 9: Divers tampons de dialyse pour stabiliser les protéines	77
Tableau 10: Caractéristiques des différentes souches bactériennes utilisées pour la vérification du spectre d'action de PlyCD52.....	87
Tableau 11: Efficacité de l'extraction d'ARN total de <i>C. difficile</i> en présence d'endolysine PlyCD52.....	90
Tableau 12: Amorces utilisées pour les différents clonages ou séquençages.....	117

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 :	116
ANNEXE 2:	118
ANNEXE 3:	121

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
AnO ₂	Anaérobiose
<i>argU</i>	Arginine (gène)
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATB	Antibiotique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cam	Chloramphénicol
CBD	<i>Cell wall Binding Domain</i>
CD	<i>Clostridium difficile</i>
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
DACD	Diarrhée Associée à <i>Clostridium difficile</i>
dNTP	Déoxyribonucléotides
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DO ₆₀₀	Densité Optique à la longueur d'onde 600 nanomètres
DTT	Dithiothréitol
EB	Extrait brut

EC	Extrait clarifié
EDTA	Acide éthylène-diamine-tetraacétique
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FF	FastFlow
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GST	Glutathione S-transferase
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
His	Histidine
ICD	Infection à <i>C. difficile</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodaltons
KoAc	Acétate de potassium
<i>ileY</i>	Isoleucine (gène)
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i>
<i>leuW</i>	Leucine (gène)
M	Molaire
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MES	Acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonic
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
NAP	<i>North America Pulsed-field</i>
NEB	New Englang Biolab
NP40	Nonidet P40
pb	Paires de base

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potentiel hydrogène
<i>ply</i>	Endolysine (gène)
Ply	Endolysine (protéine)
<i>proL</i>	Proline (gène)
REA	<i>Restriction enzyme analysis</i>
RPM	Rotation Par Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Spec	Spectomycine
Strep	Streptomycine
TP	Température pièce (environ 23°C)
V	Volts

RÉSUMÉ

Les endolysines de *Clostridium difficile*: Potentiel thérapeutique pour traiter les infections à *C. difficile* (ICD), Mémoire de maîtrise présenté par Stéphanie Mauler. Département de microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke, Mai 2010.

Clostridium difficile, un bacille à Gram positif anaérobie strict qui forme des spores, est un pathogène opportuniste responsable de simples diarrhées ou de colites pseudomembraneuses qui peuvent provoquer la mort. Le traitement de base réside en l'arrêt des antibiotiques qui ont détruit la flore de l'hôte et provoqué les symptômes, ou en la prescription de vancomycine et/ou de métronidazole. Malheureusement, l'efficacité de ces antibiotiques est variable et le nombre de rechutes est élevé. En outre, de plus en plus de souches deviennent résistantes aux antibiotiques. C'est pour cette raison qu'un besoin d'alternatives thérapeutiques s'est fait ressentir. Une des approches prometteuses est l'utilisation des endolysines, qui sont des enzymes hydrolytiques encodées par les bactériophages et qui se sont déjà révélées être efficaces contre plusieurs bactéries à Gram positif.

Dans cette étude, nous avons démontré l'activité lytique d'endolysines encodées par des phages de *Clostridium difficile* sur des cellules vivantes. Différentes endolysines ont été clonées dans *E. coli*, exprimées et purifiées, puis leur activité a été vérifiée de plusieurs manières. Certains facteurs biochimiques propres à ces enzymes ont été étudiés, tels que les cofacteurs nécessaires pour une meilleure activité lytique, le pH optimal et le

spectre d'efficacité sur différentes souches bactériennes. Finalement, l'étude de ces enzymes comme outil de diagnostic ou de biologie moléculaire est abordée.

Les résultats de nos travaux indiquent que les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2 de *C. difficile* possèdent une faible activité lytique. L'activité des endolysines n'est pas influencée par les cofacteurs Tween 0,5%, Triton 0,1%, MgCl₂ contrairement à l'EDTA qui inhibe celle-ci. Le pH optimum semble être compris entre 7 et 8,5 et ces enzymes agissent sur différentes souches de *C. difficile* à l'exception de la souche CD630. Malgré ces résultats encourageants, des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de stabiliser les enzymes qui ont une forte tendance à précipiter et d'obtenir une meilleure activité.

MOTS CLÉS : *Clostridium difficile*, endolysines, alternative aux antibiotiques, résistance aux antibiotiques, infection.

1. INTRODUCTION

1.1. Généralité sur les antibiotiques et la résistance

Les antibiotiques sont des molécules naturelles ou synthétiques qui ont la capacité d'inhiber la croissance ou de détruire les bactéries (BENTLEY et BENNETT, 2003). C'est en 1928 que le médecin Sir Alexander Fleming a découvert l'absence de croissance des bactéries sur la moisissure *Penicillium* (STEFFEE, 1992). Or, ce n'est qu'à la fin de la Seconde Guerre mondiale que la pénicilline est devenue le premier antibiotique à être utilisé de façon répandue suivi très rapidement par d'autres antibiotiques.

De nos jours, la résistance de certains organismes face aux agents antimicrobiens provoque une inquiétude grandissante au sein de la population mondiale. En outre, l'émergence de plus en plus fréquente de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques compromet l'efficacité de ces traitements (COWEN, 2008). Le développement de cette résistance est favorisé par une consommation élevée d'antibiotiques (GOOSSENS *et al.*, 2005), un mauvais diagnostic d'une infection qui résulte en une prescription inadéquate ou l'arrêt prématuré du traitement par le patient. Ainsi, les bactéries ont développé de nombreux mécanismes de résistance (NIKAIDO, 1994; VAN VEEN et KONINGS, 1997) et la pression de sélection des antibiotiques favorise l'émergence de souches résistantes (LEVY, 1994). Il n'est pas non plus rare qu'une bactérie résistante à un antibiotique le devienne pour un second et même plusieurs autres (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006). L'acquisition de la résistance se fait par différents mécanismes. Tout d'abord, une mutation naturelle au niveau du chromosome bactérien

peut modifier un gène codant pour une protéine ciblée par un antibiotique qui ne sera ensuite plus reconnue. Certaines bactéries sont capables de produire des enzymes qui inactivent les antibiotiques. Par exemple, certaines souches de *Staphylococcus aureus* sont capables de produire une enzyme qui inactive la pénicilline (KIRBY, 1944). Le tableau 1 relate différents mécanismes de résistance développés par les bactéries.

Tableau 1: Mécanismes de résistance développés par les bactéries

Mécanismes de résistance	Conséquences
Inhibition enzymatique	• Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique (mécanisme de résistance le plus répandu)
Réduction de la perméabilité cellulaire	• Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant la molécule d'atteindre sa cible
Altération des sites de liaison ciblés	• Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action
Pompes à efflux	• Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devient inaccessible

Adapté de (CARLE, 2009)

La résistance est propagée par transmission verticale de génération en génération. Les bactéries sont également capables d'acquérir une résistance par transmission horizontale à l'aide d'un ADN extra-chromosomique. Ainsi, une bactérie donneuse transfère son plasmide ou son transposon qui porte le gène de résistance à une bactérie receveuse. Cette bactérie devient résistante à son tour et transmettra cette même résistance à sa progéniture (WITTE, 2004; ALEKSHUN et LEVY, 2007). Le tableau 2 relate différentes résistances chromosomiques et extra-chromosomiques qui existent en fonction de la classe d'antibiotique.

Tableau 2 : Résistances associées aux différentes classes d'antibiotiques

Antibiotiques	Résistance chromosomique	Résistance extra-chromosomique
Aminosides	<ul style="list-style-type: none"> •Diminue perméabilité •Modification de la cible 	<ul style="list-style-type: none"> •Inactivation par acétyltransférases •Nucléotidyltransférases et phosphotransférases
Beta-lactamines	<ul style="list-style-type: none"> •Diminue perméabilité •Diminue affinité des PLP •Diminue synthèse des PLP •Synthèse de nouvelles PLP •Inactivation enzymatique par des céphalosporinases 	<ul style="list-style-type: none"> •Inactivation de divers beta-lactamases ou carbapénémases
Beta-lactamines et inhibiteurs de beta-lactamases	<ul style="list-style-type: none"> •Inactivation par des céphalosporinases chromosomiques 	<ul style="list-style-type: none"> •Inactivation par beta-lactamases hyperproductrices et beta-lactamases résistantes aux inhibiteurs
Glycopeptides		<ul style="list-style-type: none"> •Modification de la cible •Diminue l'affinité •ERV (6 gènes de résistances identifiés)
Macrolides		<ul style="list-style-type: none"> •Méthylation du ribosome bactérien (ARN 23S)
Chloramphénicol	<ul style="list-style-type: none"> •Diminue perméabilité 	<ul style="list-style-type: none"> •Efflux actif, inactivation par acétyltransférases
Quinolones	<ul style="list-style-type: none"> •Modification de la cible par ADN gyrase ou topoisomérase IV (gène <i>gyrA</i> <i>gyrB</i> ou <i>parC</i>) par mutation spontanée •Diminue perméabilité 	
Rifampicine	<ul style="list-style-type: none"> •Modification de la cible (ARN polymérase ADN dépendante) 	
Sulfamidés	<ul style="list-style-type: none"> •Diminue perméabilité •Modification par mutation de la dihydroptéroate synthétase 	<ul style="list-style-type: none"> •dihydroptéroate synthétase additionnelle sans affinité pour les sulfamidés
Tétracyclines	<ul style="list-style-type: none"> •Diminue perméabilité 	<ul style="list-style-type: none"> •Efflux actif spécifique
Triméthoprime	<ul style="list-style-type: none"> •Diminue perméabilité •Mutation de dihydrofolate réductase 	<ul style="list-style-type: none"> •dihydrofolate réductase additionnelle insensible au triméthoprime

Adapté de (CARLE, 2009) PLP= protéine liant la pénicilline, ERV= entérocoques résistant à la vancomycine.

Enfin, le développement de résistances bactériennes chez les humains est parfois lié aux animaux. En effet, les animaux de ferme reçoivent régulièrement des antibiotiques pour prévenir ou traiter une infection, ou encore comme facteur de croissance, antibiotiques qui provoquent le développement de bactéries résistantes qui sont ingérées par les humains (LARSON, 2007).

Par ailleurs, un plasmide peut porter plusieurs gènes de résistance conférant à la bactérie la résistance à ces antibiotiques (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006) ; ces bactéries sont alors appelées *Multiple Drug Resistant* ou MDR et sont particulièrement présentes en milieu hospitalier. Les personnes hospitalisées sont souvent vulnérables à la transmission de ces bactéries résistantes. Parmi ces MDR sont retrouvés le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et le *Clostridium difficile*. Les types de bactéries résistantes qui sont problématiques en milieu hospitalier sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Principales espèces bactériennes résistantes

Espèce bactérienne	Classe antibiotiques	Source
<i>S. aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM)	Beta-lactames	(Okuma, Iwakawa et al. 2002)
Espèces de <i>Klebsiella</i> (<i>K. pneumoniae</i> ...)	Beta-lactames	(Wiener, Quinn et al. 1999)
<i>Escherichia coli</i>	Beta-lactames	(Wiener, Quinn et al. 1999)
Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)	Vancomycine	(Dixson, Brunfitt et al. 1985)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Beta-lactames	(Vettoretti Floret et al. 2009)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> résistant à Penicilline	Beta-lactames	(Goldstein and Garau 1997)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> résistant aux macrolides	Macrolides	(Hyde Gay et al. 2001)
<i>Clostridium difficile</i> résistant à la clindamycine	Macrolides	(Johnson, Samore et al. 1999)
<i>Clostridium difficile</i> résistant aux fluoroquinolones	Fluoroquinolones	(Razavi, Apsarathanarak et al. 2007)
<i>Clostridium difficile</i> résistant aux céphalosporines	Beta-lactames	(Gerding 2004)

(DIXSON *et al.*, 1985; GOLDSTEIN et GARAU, 1997; OKUMA *et al.*, 2002), (HYDE *et al.*, 2001), (JOHNSON *et al.*, 1999; GERDING, 2004; RAZAVI *et al.*, 2007).(WIENER *et al.*, 1999; VETTORETTI *et al.*, 2009).

Chez *C. difficile*, la résistance peut être apportée par une mutation au niveau du chromosome ou par l'acquisition d'un transposon. Le tableau 4 présente les différents mécanismes de résistance chez *C. difficile*.

Tableau 4: Principaux mécanismes de résistance chez *Clostridium difficile* adapté de (HUANG *et al.*, 2009).

Agent antimicrobien	Mécanisme de résistance	Locus	Exemple (gène/mutation)
Erythromycine et clindamycine	Modification de la cible (méthylation ribosomale)	Transposon	Gènes <i>eimB</i>
Tétracycline	Modification de la cible (protection ribosomale)	Transposon	<i>tetM</i>
Moxifloxime	Modification de la cible (mutation dans QRDR)	Chromosome	Thr82 → Ile substitution dans <i>gyrA</i>
Rifampicine	Modification de la cible (mutation qui amène une réduction de liaison à l'ARN polymérase)	Chromosome	Arg505 → Lys substitution dans <i>rpoB</i>
Acide fusidique	Modification de la cible (mutation)	Chromosome	Ala374 → Val substitution dans <i>fusA</i>

QRDR : quinolone-resistance-determining region

Le nombre de bactéries résistantes étant de plus en plus élevé, plusieurs organismes en Europe et en Amérique mettent en garde contre leur progression et font en sorte que la consommation des antibiotiques soit réduite (ECDC, 2009). De plus, de nombreux chercheurs essaient de prévoir l'acquisition de résistance lors du développement de nouvelles molécules ou d'utiliser des molécules alternatives qui auront moins d'impact sur la résistance (ECDC, 2009).

1.2. *Clostridium difficile*

De nos jours, la bactérie *C. difficile* est considérée comme une des causes les plus importantes liées aux infections hospitalières, mais on la retrouve également au sein de la communauté et chez les animaux (BIGNARDI et SETTLE, 2008). Depuis 2001, la prévalence et la sévérité des infections liées à *C. difficile* ont significativement augmenté

(PEPIN *et al.*, 2005). *C. difficile* a été découvert en 1935 mais ce n'est qu'en 1978 qu'elle a officiellement été reliée aux colites pseudomembraneuses observées depuis 1893 (GEORGE *et al.*, 1978; BARTLETT, 1994). Même si 25% des souches sont non-pathogènes, les infections à *C. difficile* (ICD) sont des maladies intestinales provoquées par la production de toxines présentes chez certaines souches toxigènes (FEKETY et SHAH, 1993). Les symptômes incluent de simples diarrhées et des symptômes plus sévères qui comprennent des crampes abdominales et de la fièvre. À des degrés extrêmes, certaines ICD peuvent aller jusqu'à la formation de pseudomembranes au niveau du colon, au développement d'un choc toxique et provoquer la mort (voir figure 1) (KELLY *et al.*, 1994; MYLONAKIS *et al.*, 2001). La sévérité des symptômes est associée à un grand nombre de facteurs tels que l'état du patient ou la souche toxigène de *C. difficile* (WILSON, 1993; SHIM *et al.*, 1998). Par ailleurs, certaines personnes peuvent être des porteurs sains et posséder la bactérie dans leur flore normale. Ils présenteront des symptômes seulement lorsque leur flore intestinale sera altérée par la prise d'antibiotiques tels que la clindamycine, les céphalosporines et les fluoroquinolones (WILSON, 1993; BIGNARDI, 1998).

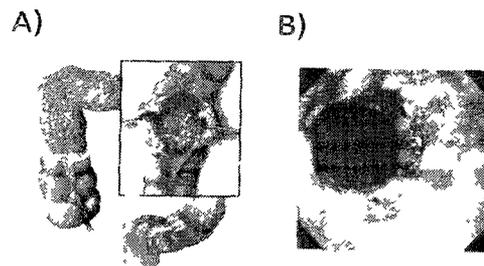


Figure 1 Colite pseudomembraneuse.

A) Représentation schématique de pseudomembranes au niveau du colon.

B) Visualisation par endoscopie de colites pseudomembraneuses. Les pseudomembranes sont visibles sous forme de plaques jaunes et sont présentes partout sur la muqueuse colorectale.

1.2.1. Pathogénèse des ICD

C. difficile est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, formant des spores qui persistent pour une longue période dans l'environnement ou chez le patient. Les spores facilitent également la transmission par voie fécale-orale (KRAMER *et al.*, 2006). La pathogénèse des ICD est illustrée dans la figure 2. Les cellules végétatives (ou les spores) sont ingérées et seulement 1% des cellules survivent étant donné que la plupart sont détruites par les acides présents dans l'estomac (WILSON *et al.*, 1985). Les spores, quant à elles, résistent et passent directement dans le petit intestin où elles vont germer au contact des acides biliaires. Les bactéries possèdent plusieurs facteurs de virulence qui contribuent au développement des symptômes, tels que la présence de flagelles qui vont permettre la mobilité et l'adhésion de la bactérie, des protéines de surface (e.g. Cwp66) également pour l'adhésion, la présence d'une capsule qui permet de résister à la phagocytose ou la production d'enzyme hydrolytiques et protéolytiques (SEDDON *et al.*, 1990; BONGAERTS et LYERLY, 1994; WALIGORA *et al.*, 2001). Les cellules se multiplient ensuite dans le colon où elles vont produire deux exotoxines, TcdA et TcdB, et des enzymes hydrolytiques (BARBUT *et al.*, 2002). Les toxines principales sont situées sur le locus de pathogénicité appelé le PaLoc (figure 3) et sont cytotoxiques pour différentes cellules. Ainsi, elles augmentent la perméabilité des vaisseaux sanguins et stimulent la relâche de médiateurs et cytokines qui contribuent à la réponse inflammatoire, elles mènent à l'apoptose des cellules épithéliales et éventuellement à la formation des pseudomembranes (POXTON *et al.*, 2001). Enfin, 5 à 6% des souches possèdent également une toxine binaire CDT dont les gènes codants sont situés en dehors du PaLoc, mais son rôle n'est pas encore bien défini (GERIC *et al.*, 2004; GONCALVES *et al.*,

2004). Une étude récente suggère toutefois que cette toxine permettrait une meilleure adhérence aux cellules épithéliales (SCHWAN *et al.*, 2009).

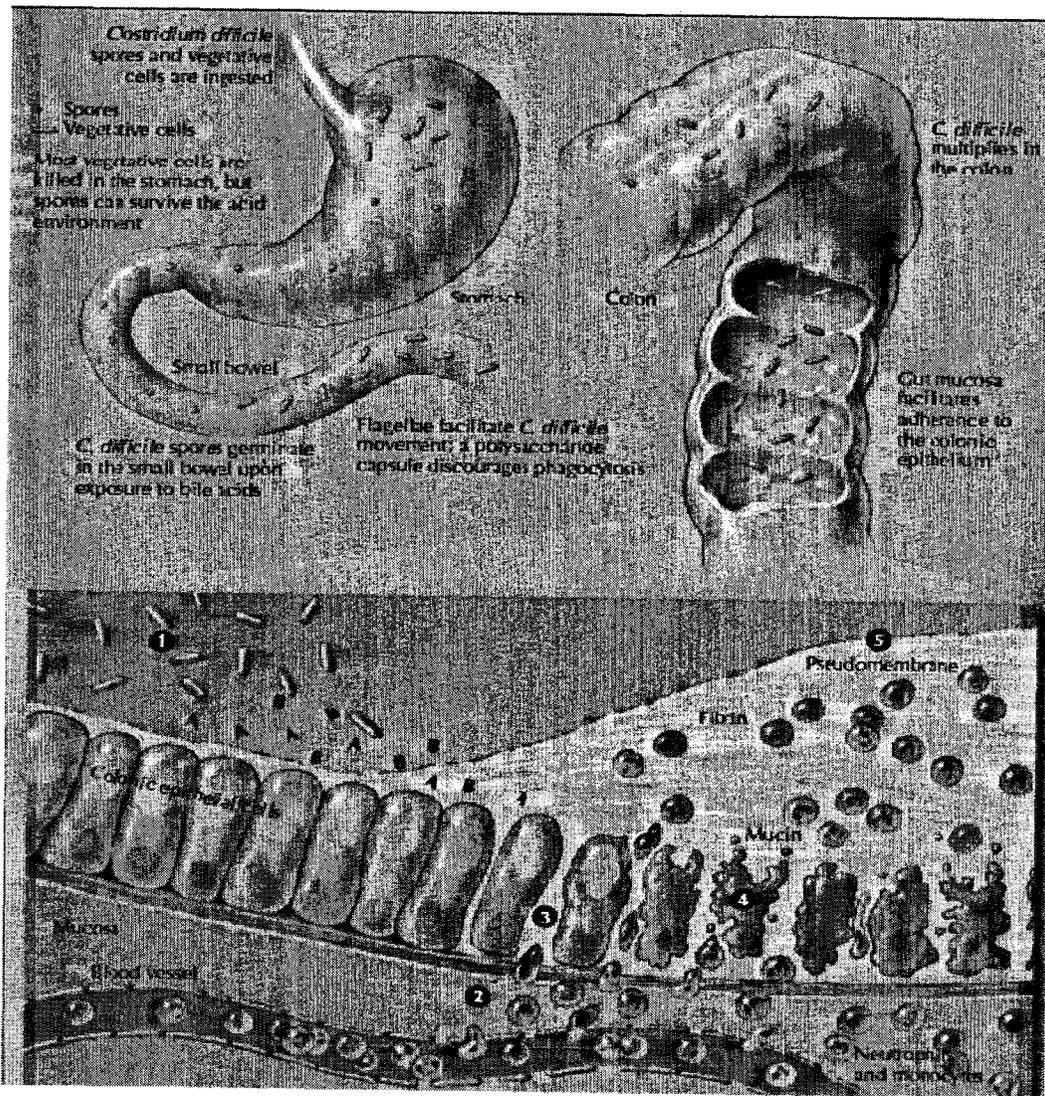


Figure 2: Pathogénèse des infections à *Clostridium difficile*.

La pathogénèse est expliquée en détail dans le texte.

1) Les cellules végétatives produisent des toxines A et B et des enzymes hydrolytiques 2) La production locale de toxines A et B mène à la production d'interleukines pro-inflammatoires, de TNF-alpha, à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et au recrutement des neutrophiles et monocytes. 3) Ouverture des jonctions épithéliales 4) Apoptose cellulaire 5) Effet des enzymes hydrolytiques qui mènent à la dégradation des tissus puis à la diarrhée et à la formation des pseudomembranes (POUTANEN et SIMOR, 2004).

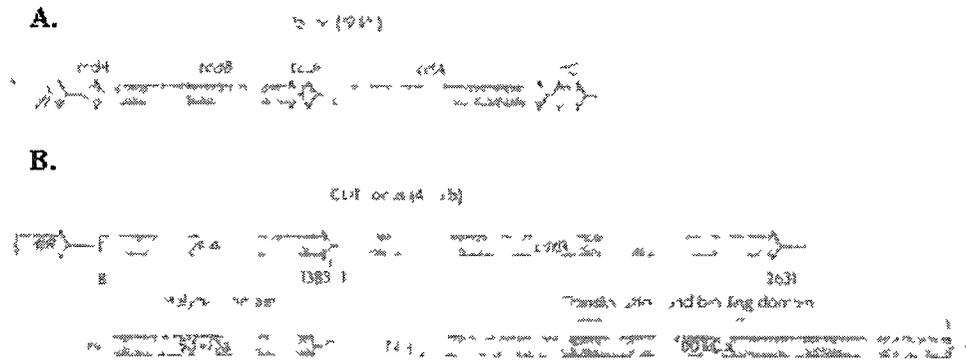


Figure 3:Toxines produites par *Clostridium difficile*

A. Le locus de pathogénicité (PaLoc) comprend 5 gènes codant pour TcdR : un régulateur positif des toxines (facteur sigma alternatif); TcdB : une cytotoxine; TcdE : fonction de holine pour la sécrétion des toxines ; TcdA : une entérotoxine; TcdC : un répresseur de l’expression des toxines.

B. La toxine binaire CDT est encodée par une région différente du chromosome le CdtLoc et est constituée de 3 gènes, *cdtR* : codant pour un régulateur ; *cdtB* : codant pour le domaine de liaison CdtB et *cdtA* : codant pour le domaine catalytique CdtA (RUPNIK *et al.*, 2009).

1.2.2. Émergence d’une souche hypervirulente

En 2001, l’émergence d’une nouvelle souche hypervirulente au Canada, aux États-Unis et en Europe met aux aguets le personnel hospitalier et les chercheurs (O’CONNOR *et al.*, 2009). Cette souche est identifiée comme étant responsable d’un large nombre d’ICD et est caractérisée par différentes techniques comme étant la souche *North American* PFGE type 1 de ribotype PCR 027 (NAP1/027) (MCDONALD *et al.*, 2005). Depuis cette découverte, la souche NAP1/027 a été recensée dans toutes les provinces du Canada, dans de nombreux pays d’Europe et dans un grand nombre d’états des États-Unis. La figure 4 représente les différents pays d’Europe et les différents états des É-U touchés par cette souche (données de 2008).

A)



B)

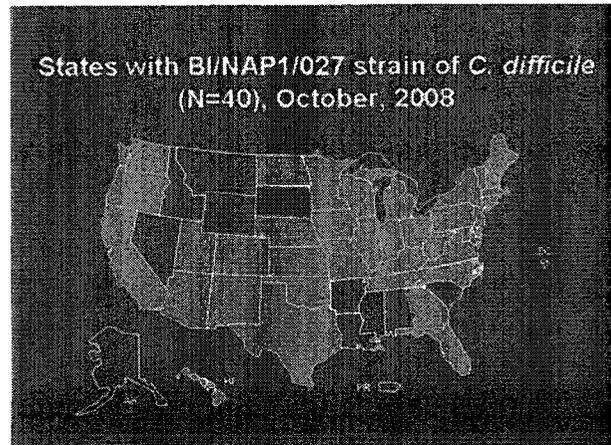


Figure 4: Prévalence en 2008 de la souche NAP1/027 en Europe A) et aux États-Unis B).

Les étoiles représentent des épidémies dues à la NAP1/027 ; les ronds représentent des cas sporadiques causés par NAP1/027. Les 40 états des États-Unis qui sont touchés par la souche hypervirulente sont colorés en rose (CDC, 2008; KUIJPER *et al.*, 2008).

Cette souche a plusieurs particularités. Elle produit une plus grande quantité de toxines TcdA et TcdB *in vitro*, elle possède la toxine binaire CDT et une délétion en position 117 dans le gène répresseur *tcdC* qui cause une troncature de la protéine et donc engendre une perte importante de l'activité du répresseur des toxines (MCDONALD *et al.*, 2005; WARNY *et al.*, 2005; AKERLUND *et al.*, 2006; CURRY *et al.*, 2007; MATAMOUROS *et al.*, 2007; DUPUY *et al.*, 2008). Enfin, elle est plus résistante aux céphalosporines et fluoroquinolones (ACKERMANN *et al.*, 2001; ZAISS *et al.*, 2010).

Le taux d'ICD a largement été attribué à la présence de la souche NAP1/027 mais n'est pas limité à la dissémination de cette souche. En effet, d'autres souches incluant les ribotypes 001, 053 et 106 peuvent également être associées à des épidémies ou des cas sévères d'ICD (BORGSMANN *et al.*, 2008). De plus, la prévalence de la souche *C.*

difficile ribotype 078, historiquement retrouvée majoritairement chez les animaux, est passée de 3% à 13% chez l'humain dans plusieurs pays d'Europe (GOORHUIS *et al.*, 2008; RUPNIK *et al.*, 2008). Ces souches augmentent la complexité des traitements des ICD.

1.2.3. Thérapies actuelles

Le traitement de base des ICD réside en l'arrêt des antibiotiques qui ont altéré la flore normale de l'hôte et provoqué les symptômes. Si ce n'est pas suffisant ou si la souche hypervirulente est suspectée, la prescription de métronidazole et/ou de vancomycine est requise (MCFARLAND, 2005; GERDING *et al.*, 2008). Malheureusement, l'efficacité de ces antibiotiques est variable et le nombre de rechutes est élevé, car la flore intestinale ne se rétablit pas rapidement et les spores ne sont pas affectées par le traitement aux antibiotiques. En effet, 12-24% des patients développent un second épisode d'ICD en moins de 2 mois. Cet épisode peut être dû à une rechute causée par la même souche. En effet, les spores, qui n'ont pas été éliminées par les antibiotiques, germent à nouveau une fois les traitements antibiotiques terminés et *C. difficile* colonise à nouveau l'intestin dont la flore n'est pas rétablie. Ce second épisode peut également être dû à une réinfection par une souche différente (MCFARLAND, 2005; GERDING *et al.*, 2008). De plus, le traitement à la vancomycine peut favoriser la croissance d'autres bactéries pathogènes telles que les ERV mentionnées dans la section 1.1. Par conséquent, il est primordial de trouver des alternatives au traitement des ICD afin de remplacer ou compléter les traitements courants.

1.2.4. Alternatives

Plusieurs stratégies sont actuellement étudiées pour traiter les infections à *C. difficile*. En premier lieu, de nouveaux antibiotiques sont à l'essai tel que le nitazoxanide, la rifampine, la rifaximin ou la fidaxomicin (OPT-80). Ce dernier semble prometteur puisqu'il est aussi efficace que la vancomycine sur *C. difficile* et il y a également moins de rechutes observées après la prise de cet antibiotique. (ASLAM *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2009; YANGCO *et al.*, 2009; GOLDSTEIN *et al.*, 2010; SULLIVAN et SPOONER, 2010).

Étant donné l'augmentation de souches résistantes et l'efficacité parfois variable des antibiotiques, d'autres approches qui n'impliquent pas l'utilisation d'antibiotiques sont étudiées. Tout d'abord, l'utilisation de probiotiques pour rétablir la flore normale est évaluée par différents scientifiques. Malgré la controverse entourant leur efficacité réelle ou non, ces probiotiques sécrèteraient entre autres des enzymes qui pourraient jouer un rôle protecteur en dégradant, par exemple, les toxines de *C. difficile* (MILLER, 2008; TUNG *et al.*, 2009; YANGCO *et al.*, 2009). Une étude a démontré le potentiel des probiotiques *Saccharomyces boulardii* et *Lactobacillus GG* pour éviter les rechutes liées à une récurrence (POCHAPIN, 2000). De plus, une étude récente effectuée par le groupe de Yangco, illustre le succès des probiotiques lorsqu'ils ont été administrés en combinaison avec la rifaximine afin de traiter des patients ayant eu plusieurs récurrences d'ICD (YANGCO *et al.*, 2009).

Une autre technique est d'utiliser des polymères qui lient les toxines. Le Tolevamer est un polymère qui se lie aux toxines de *C. difficile in vitro* et qui est efficace *in vivo* chez le hamster, modèle utilisé pour étudier les ICD. Cette molécule est passée en essais cliniques de phase II et III (LOUIE *et al.*, 2006). De plus, elle a été reconnue pour neutraliser *in vitro* les toxines de la souche NAP1/027 (HINKSON *et al.*, 2008). Malgré des résultats prometteurs, les dernières études ont révélé l'inefficacité de cette molécule contre la cytotoxicité de *C. difficile in vivo* (BAINES *et al.*, 2009).

La transplantation fécale est une autre approche qui vise à rétablir la flore intestinale du patient par l'introduction dans le tube digestif d'une suspension de fèces d'une personne saine (habituellement un proche de la famille) (JORUP-RONSTROM *et al.*, 2006; BAKKEN, 2009; SILVERMAN *et al.*, 2010). Cette méthode a été utilisée au Québec pendant l'épidémie de 2003 et est utilisée par plusieurs pays scandinaves et suggère que la transplantation fécale est efficace pour réduire les symptômes et prévenir une récurrence (LUND-TONNESEN *et al.*, 1998; NIEUWDORP *et al.*, 2008; VAN NOOD *et al.*, 2009). Malgré ces résultats, la transplantation fécale est très peu utilisée et soulève certaines questions d'éthique.

L'immunothérapie passive est une autre alternative utilisant des anticorps anti-toxines de *C. difficile* (BEALES, 2002; WILCOX, 2004). Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique de l'utilisation de gammaglobulines (VISCIDI *et al.*, 1983; MCPHERSON *et al.*, 2006). Il a aussi été montré que du lait de vache enrichi en anticorps anti-toxines aide à prévenir les rechutes liées à la présence de *C. difficile* et que ces anticorps neutralisent l'effet cytotoxique de la toxine B chez les rongeurs et prévient et traite les ICD (LYERLY *et al.*, 1991; NUMAN *et al.*, 2007). Deux autres anticorps

monoclonaux contre TcdA et TcdB sont étudiés et montrent leur efficacité à réduire la récurrence chez des patients traités à la vancomycine et au métronidazole (LOWY *et al.*, 2010). Enfin, un vaccin à ADN a récemment été créé dans le but de cibler les domaines de liaisons de toxine A contre *C. difficile* (GARDINER *et al.*, 2009).

De manière plus fondamentale, les riboswitches représenteraient d'excellentes cibles pour les antibiotiques (OTT *et al.*, 2009). Le groupe de Daniel Lafontaine étudie le mécanisme des riboswitches guanine sur *C. difficile* qui pourront servir de futures cibles pour les antibiotiques (MULHBACHER *et al.*, 2010).

Ces approches apportent de nouvelles idées et de nouveaux espoirs, mais leur efficacité réelle pour traiter les infections à *C. difficile* reste encore à démontrer dans plusieurs cas. Ainsi, il est important de poursuivre la recherche de nouvelles stratégies antibactériennes. Une des approches prometteuses est l'utilisation des endolysines comme alternative aux antibiotiques. Celle-ci s'est déjà révélée être efficace contre plusieurs bactéries à Gram positifs mais il est encore impossible de dire si cette approche fonctionnerait dans le cadre de traitements préventifs ou curatifs contre *C. difficile*.

1.3 Les endolysines

Les phages ont développé divers moyens pour relâcher la nouvelle progéniture à la fin du cycle de réplication. Par exemple, les phages filamenteux continuent de relâcher leur progéniture constamment sans tuer la bactérie hôte alors que les phages lytiques

produisent une endolysine leur permettant de sortir de la bactérie après lyse de la bactérie hôte (BORYSOWSKI *et al.*, 2006).

Les endolysines sont des protéines de phages de 30 à 50 kDa qui ont évolué depuis des millions d'années dans le but d'attaquer de manière spécifique le peptidoglycane de la paroi bactérienne à la fin du cycle infectieux (HERMOSO *et al.*, 2007; FISCHETTI, 2008). Les endolysines peuvent être classées en 6 principales catégories dépendamment du site de clivage au niveau du peptidoglycane. Ainsi, il existe les N-acétylmuramidases, classe dans laquelle se situe le lysozyme, les N-acétylmuramoyl-L-alanine amidases, qui représentent 85% de toutes les endolysines caractérisées, les endopeptidases qui comprennent la classe des L-alanoyl-D-glutamate endopeptidases et les D-glutamyl-*meso*DAP endopeptidases, et les transglycosilases. Le site de clivage est représenté dans la figure 5 (LOESSNER, 2005; NELSON *et al.*, 2006). En général elles possèdent un seul type d'activité hydrolytique. Par contre, au moins quatre enzymes ont la propriété de posséder deux activités lytiques indépendantes: les endolysines des phages B30 et NCTC 11261 de *Streptococcus agalactiae* possèdent une activité endopeptidase et lysozyme, le phage ϕ 11 de *Staphylococcus aureus* possède une activité endopeptidase et NAM-amidase, et l'endolysine du prophage ϕ WMY de *Staphylococcus warneri* M possède une activité endopeptidase et NAM-amidase (LOESSNER, 2005) (RIGDEN *et al.*, 2003). En 2007, une enzyme avec une activité γ -D-glutaminyl-L-lysine endopeptidase a été découverte (PRITCHARD *et al.*, 2007).

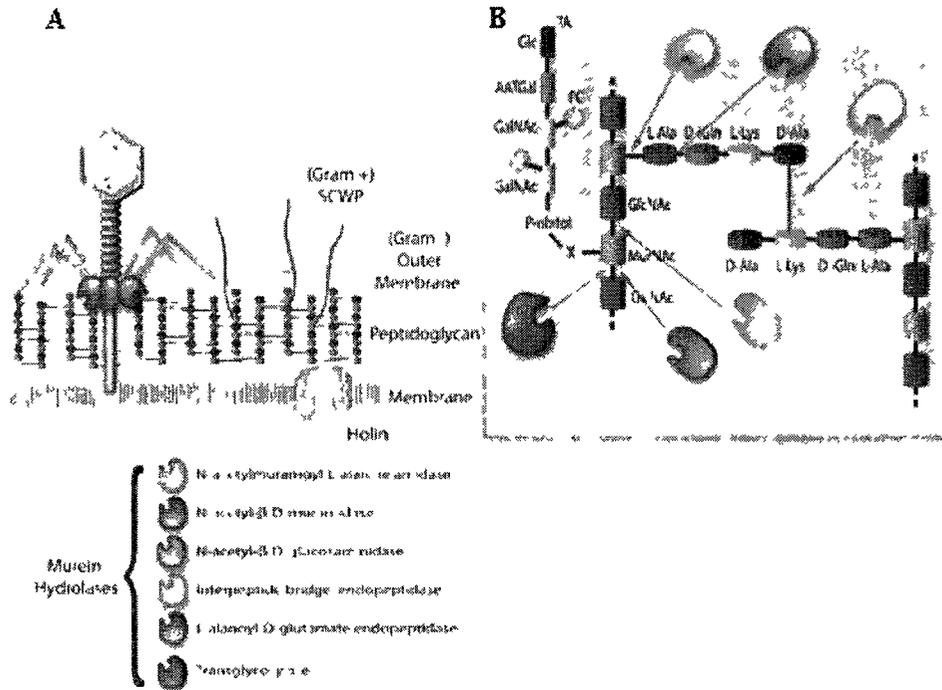


Figure 5: Sites de clivage au niveau du peptidoglycane des différentes classes d'endolysines

A. Représentation schématique du peptidoglycane ; la membrane externe est présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif alors que chez les Gram positifs elle est appelée seconds polymères de peptidoglycane (SCWP). La holine forme un pore dans la membrane interne.

B. Le peptidoglycane est constitué d'un enchaînement de résidus N-acetylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acetylmuramique (MurNAc). Chaque chaîne est reliée par de courts peptides. Le site de clivage des endolysines est indiqué par une flèche. (HERMOSO *et al.*, 2007)

Les endolysines sont généralement encodées au niveau du module de lyse dans le génome des phages et, sauf pour quelques exceptions, ne possèdent pas de peptides signal. Leur transport au travers de la membrane cytoplasmique est contrôlé par le produit d'un second gène situé au niveau du module de lyse, la holine. Ainsi, pendant le cycle lytique du phage, les endolysines s'accumulent dans le cytoplasme. À un moment précis, les molécules de holines forment un pore dans la membrane qui ouvre l'accès au

peptidoglycane. Ensuite, les endolysines créées des lésions qui provoquent la lyse de la bactérie et libèrent de nouveaux virions (WANG *et al.*, 2003).

1.3.1 Structure des endolysines

Ces endolysines sont produites comme un simple polypeptide, mais contiennent deux domaines différents reliés entre eux par un pont. Le domaine catalytique N-terminal clive les liens de peptidoglycane et le domaine de liaison C-terminal CBD (pour *cell wall binding domain*) se lie au peptidoglycane, généralement de façon spécifique à l'espèce (LOESSNER, 2005). Par contre, l'enzyme PlyC, qui provient du phage C1 de *Streptococcus*, est unique car elle est composée de deux produits de gènes séparés PlyCA et PlyCB. Ainsi, PlyC active est constituée de 8 sous unités PlyCB pour une sous unité PlyCA et fait 114 kDa (NELSON *et al.*, 2006). Il peut également arriver que deux ou même trois domaines catalytiques soient combinés à un seul domaine de liaison, en particulier les endolysines de *Staphylococcus* (NAVARRE *et al.*, 1999). Le domaine C-terminal se lie de manière spécifique au peptidoglycane de la cellule hôte (LOPEZ *et al.*, 1992; LOPEZ *et al.*, 1997). La première structure cristallisée a été réalisée sur l'enzyme Cpl-1 qui provoque la lyse de *S. pneumoniae*. Celle-ci suggère que la reconnaissance se fait par le domaine de liaison à la choline et que cette liaison permet le bon positionnement de l'enzyme pour le clivage (HERMOSO *et al.*, 2003). Quand les séquences en acides aminés entre les différentes enzymes sont comparées entre-elles, les régions N-terminales sont en général homologues contrairement aux régions C-terminales. Ceci montre que les enzymes ont évolué pour se lier au peptidoglycane de

façon hautement spécifique et avec une grande affinité (LOESSNER *et al.*, 2002). La figure 6 présente la structure de l'endolysine Cpl-1 et une comparaison des domaines des endolysines PlyB de *Bacillus anthracis* et Cpl-1 de *S. pneumoniae*.

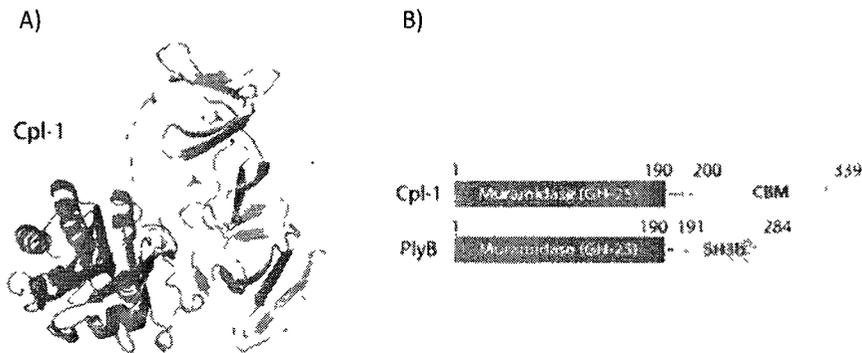


Figure 6: Structure tridimensionnelle de Ply Cpl-1

A) Schématisation de la structure de l'enzyme Cpl-1, le domaine catalytique est coloré en violet et le domaine de liaison en doré. B) Les domaines de PlyB et Cpl-1 sont comparés et sont très homologues (HERMOSO *et al.*, 2007).

À cause de leur structure, il est possible que les différents domaines se soient interchangés au fil du temps créant des endolysines avec des activités catalytiques et des spécificités différentes. Le groupe de Garcia a étudié ce phénomène en changeant les domaines catalytiques des enzymes lytiques des phages de *S. pneumoniae* et créé une nouvelle enzyme capable de lier les pneumocoques (GARCIA *et al.*, 1990; WEISS *et al.*, 1999).

1.3.2 Mode d'action des endolysines

Depuis longtemps, l'utilisation des phages entiers pour contrôler les infections bactériennes (phagothérapie) semble prometteuse mais cette approche n'est toujours pas approuvée pour le traitement des infections (MATSUZAKI *et al.*, 2005). Par contre, ce n'est que récemment que les endolysines ont été exploitées dans ce même but afin de contrer les inconvénients reliés à l'utilisation de phages entiers tels que la nécessité d'avoir des phages virulents strictement lytiques ou encore un spectre d'hôte trop restreint. De plus, les bactéries ont aussi la possibilité de développer des résistances aux phages (O'FLAHERTY *et al.*, 2009).

Les endolysines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif étant donné que, lorsqu'ajoutées de manière externe, elles sont capables d'entrer en contact direct avec le peptidoglycane, contrairement aux bactéries à Gram négatif qui possèdent une membrane externe qui bloque l'accès au peptidoglycane. Des coupes fines observées en microscopie révèlent que les endolysines exercent leur effet létal en formant des trous dans la paroi par digestion du peptidoglycane. Or la pression interne des bactéries est maintenue par une paroi bien formée et la moindre rupture provoque l'extrusion de la membrane cytoplasmique et une lyse hypotonique (voir figure 7).

L'activité des endolysines sur plusieurs espèces à Gram positif a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. L'activité *in vitro* a été démontrée sur des Streptocoques de groupe A (NELSON *et al.*, 2001), des Streptocoques de groupe B (GBS) (CHENG *et al.*, 2005), *Bacillus cereus* (et *B. anthracis*) (SCHUCH *et al.*, 2002), *Staphylococcus aureus* (DONOVAN *et al.*, 2006), *Clostridium perfringens* (ZIMMER *et al.*, 2002). Certaines

endolysines agissent de manière beaucoup plus drastique que d'autres. Par exemple, 10 ng d'endolysine PlyC1 est capable de lyser 10^7 Streptocoques des groupes A et C en 5 secondes alors que 100 μ g d'endolysine CD27L est capable de lyser 1 log d'une suspension de 10^8 *Clostridium difficile* en 2 h (NELSON *et al.*, 2001; MAYER *et al.*, 2008). De plus, 100 μ g/ml d'endolysine PlyG purifiée est capable de tuer une suspension de 10^7 *B. anthracis* en 3 secondes. Elle est également capable de tuer différentes souches de *B. anthracis* provenant de différents endroits dans le monde en plus de souches auxquelles il manque la capsule (SCHUCH *et al.*, 2002). La figure 7 illustre l'effet de 5 unités de PlyG sur une suspension de *B. cereus* RSVF1 (qui est très proche de *B. anthracis*).

L'activité *in vivo* a été testée sur différentes bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* qui est responsable d'otites moyennes. Une souche de *S. pneumoniae* qui exprime la luciférase bioluminescente a été inoculée dans le nez de souris. Après 72 heures les souris étaient colonisées. Or une injection intranasale de 1 mg d'endolysine Cpl-1 a guéri 100% des souris infectées. La figure 8 montre les souris avant et après traitement (HERMOSO *et al.*, 2007; MCCULLERS *et al.*, 2007).

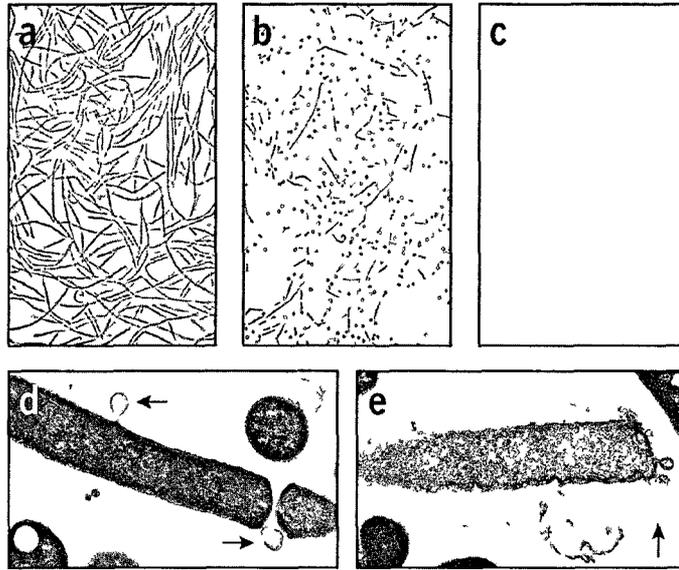


Figure 7: Lyse *in vitro* de *B. cereus* par 5 unités de PlyG.

PlyG cause de profonds changements morphologiques et lyse *B. cereus* RSVF1. **a-c** traitement de PlyG selon le temps **a)** avant traitement **b)** après 1 minute **c)** après 15 minutes. **d-e** microscopie électronique à transmission après **d)** 1 minute et **e)** 10 minutes de traitement avec 5 U PlyG. Les flèches indiquent l'extrusion des membranes. (SCHUCH *et al.*, 2002).

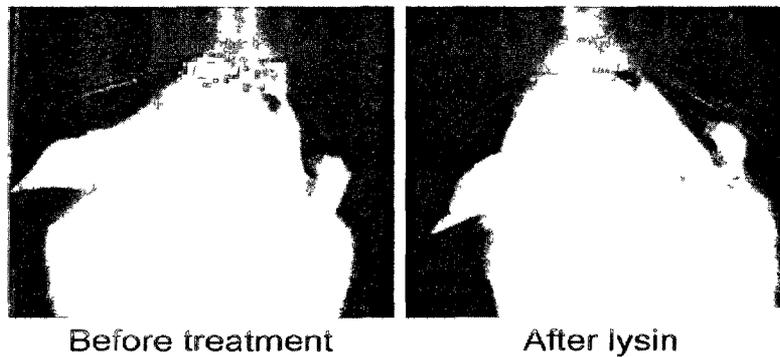


Figure 8: Traitement *in vivo* de *S. pneumoniae* par PlyCpl-1.

La première souris possède au niveau du nez des souches de *S. pneumoniae* qui expriment la luciférase, ensuite, 1 mg de PlyCpl-1 est ajouté et au bout de 72 h il y a élimination complète des bactéries (MCCULLERS *et al.*, 2007).

Des modèles animaux pour la colonisation des muqueuses ont été utilisés pour tester la capacité des endolysines à tuer des bactéries sur la surface des membranes. Un modèle de colonisation des voies respiratoires supérieures par *S. pyogenes* (NELSON *et al.*, 2001) et les pneumocoques (LOEFFLER *et al.*, 2001) a été développé, de même qu'un modèle d'infection vaginale par les streptocoques du groupe B (CHENG *et al.*, 2005). Dans tous les cas, les animaux colonisés ont été traités avec une simple dose d'endolysine et la charge bactérienne a été réduite de plusieurs logs après 2 à 4 h de traitement.

1.3.3 Avantages des endolysines face aux antibiotiques

Les endolysines sont des enzymes très spécifiques et tuent en général uniquement les espèces bactériennes dont proviennent les phages qui encodent ces endolysines. Par conséquent, les enzymes produites par des phages de streptocoques tuent des Streptocoques et celles produites par des phages de pneumocoques tuent des pneumocoques (LOEFFLER *et al.*, 2001). Ainsi, contrairement aux antibiotiques qui ont un spectre d'action plutôt large détruisant une vaste gamme de bactéries de genre et d'espèce différents trouvées dans le corps humain, les endolysines ont peu d'effets sur la flore normale de l'homme et agissent seulement sur les bactéries ciblées. La figure 9 illustre la spécificité de l'endolysine Pal spécifique pour *S. pneumoniae* et son activité sur d'autres espèces de streptocoques. Or, il existe une exception à cette spécificité étant donné que l'endolysine PlyV12 d'un phage d'entérocoque a été identifiée comme étant une endolysine à large spectre. En effet, elle ne détruit pas seulement les entérocoques,

mais aussi d'autres pathogènes à Gram positif comme *S. pyogenes*, des streptocoques du groupe B et *S. aureus* (YOONG *et al.*, 2004).

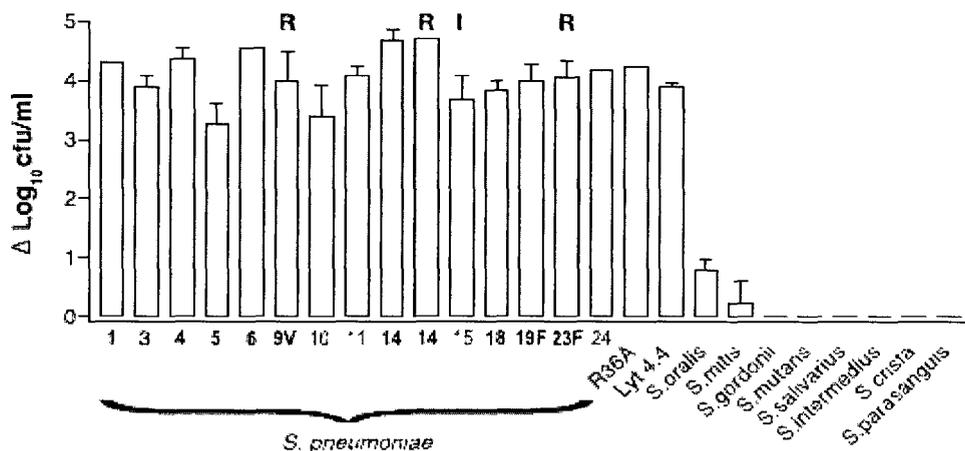


Figure 9: Effet de 100 U/ml de Pal sur différentes bactéries *in vitro* en 30 secondes
 Quinze souches de *S. pneumoniae* ont été utilisées, 2 mutants de pneumocoques (R36A, Lyt4-4), et 8 espèces de streptocoques oraux en phase-log ont été incubés avec 100 U/ml de Pal pendant 30 secondes. Le graphique montre la baisse du titre bactérien en log₁₀. Les numéros en dessous représentent les sérogroupes/sérotypes des souches utilisées. Celles écrites en gras sont les sérogroupes les plus fréquemment isolés. Les barres d'erreurs présentent la déviation standard des triplicata. I= susceptibilité intermédiaire à la pénicilline ; R= résistant à la pénicilline (LOEFFLER *et al.*, 2001).

Un des obstacles potentiels avec la thérapie par les endolysines serait l'induction d'une réponse immunitaire après l'administration de celles-ci. (FISCHETTI, 2005). Une réponse immunitaire réduirait ou empêcherait l'activité des endolysines. Or, il n'y a pas d'effets secondaires connus jusqu'à ce jour. En effet, plusieurs expositions d'une souris avec l'enzyme Cpl-1 *in vivo* ou l'utilisation d'un sérum de lapin hyperimmunisé n'ont pas empêché l'action de l'endolysine (LOEFFLER *et al.*, 2003). De plus, les endolysines semblent inoffensives que ce soit après un traitement topique ou systémique chez la souris (LOEFFLER *et al.*, 2001; NELSON *et al.*, 2001). Aucune anomalie n'est à signaler que

ce soit au niveau des cellules (FISCHETTI, 2003), des réactions inflammatoires (JADO *et al.*, 2003; LOEFFLER *et al.*, 2003) ou des irritations (NELSON *et al.*, 2001).

Des expériences ont été réalisées dans le but de voir s'il peut y avoir acquisition d'une résistance. Ainsi, des bactéries ont été exposées à des concentrations sub-létales d'endolysines et aucune résistance n'a eu lieu même après 40 passages (LOEFFLER *et al.*, 2001; SCHUCH *et al.*, 2002). Ceci peut être dû au fait que les phages, de manière à ne pas rester enfermés à l'intérieur de la bactérie hôte, ont fait évoluer le domaine C-terminal des endolysines afin qu'ils ciblent une molécule unique et essentielle au niveau du peptidoglycane, rendant le développement de la résistance des bactéries pour ces enzymes un évènement rare.

1.3.4 Les endolysines chez *C. difficile*

Lors du commencement du projet, aucun article sur les endolysines de *C. difficile* n'avait été publié et seul un article sur l'autolysine Acd de *C. difficile* était publié. Une autolysine est une protéine homologue à l'endolysine présente chez les bactéries pour détruire leur peptidoglycane lors, par exemple, de la division cellulaire (DHALLUIN *et al.*, 2005). Ceci ouvrait la porte à un grand potentiel pour développer les endolysines comme outil thérapeutique afin de prévenir ou traiter les infections à *C. difficile*. Comme la plupart des enzymes de phage (85%), les endolysines de *C. difficile* font partie de la classe des N-acétylmuramoyl-L-alanine amidases. Au cours de ma première année d'étude, le premier article sur l'endolysine CD27L de *C. difficile* a été publié et il en sera question plus loin dans ce mémoire (MAYER *et al.*, 2008).

1.4 Démarches générales pour l'expression et la purification d'une protéine recombinante

Je tiens à préciser que les démarches que nous avons entreprises pour l'expression et la purification des endolysines ainsi que les essais enzymatiques n'ont pas fait l'objet d'une approche systématique, mais se basaient principalement sur des exemples similaires tirés de la littérature. Par exemple, une étude qui démontrait l'activité d'une endolysine chez *C. difficile* (CD27L) qui est quasi identique à une des enzymes que nous avons étudiées (PlyCD52, voir plus loin). Toutefois, les pages qui suivent décrivent différentes stratégies et facteurs à considérer lors de la mise sur pied d'un protocole d'expression et de purification d'une protéine quelconque, incluant les endolysines.

Tout d'abord, il est important d'établir un bon système d'expression et de purification de la protéine afin d'obtenir un produit final pur et exempt de protéines non spécifiques. Les méthodes les plus couramment utilisées se tournent vers l'utilisation de systèmes d'expression bactériens dans le but de surexprimer une protéine recombinante. De plus, il est important de bien évaluer toutes les possibilités et de bien connaître la protéine que l'on veut purifier avant de choisir le protocole de purification. Différentes stratégies et facteurs à considérer sont illustrés dans la figure 10 et seront présentés dans les prochaines pages afin de mieux situer les travaux qui ont été effectués avec les endolysines.

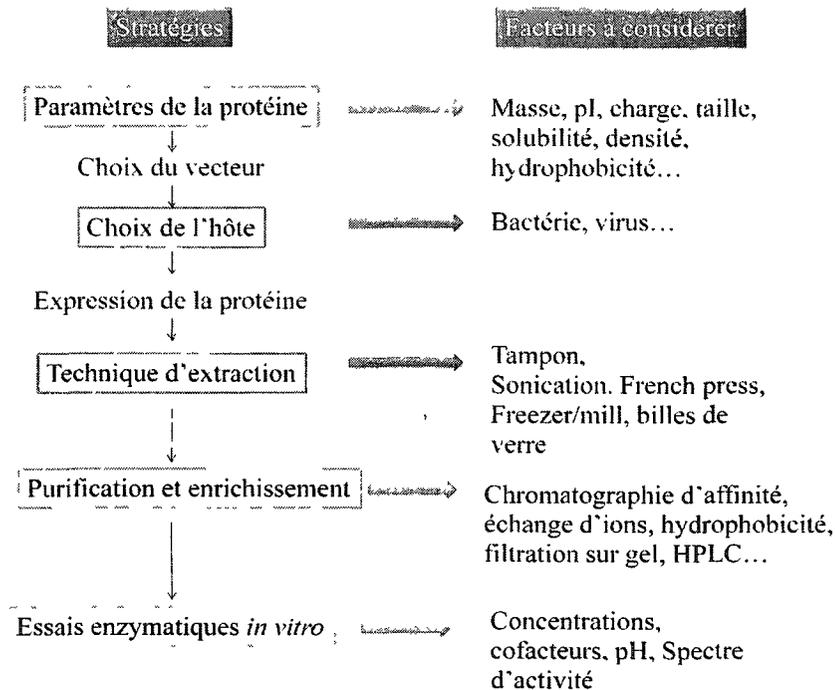


Figure 10: Stratégies et facteurs à considérer pour le développement d'un protocole de purification d'une enzyme.

1.4.1. Propriétés de la protéine à considérer

Chaque protéine possède ses propres caractéristiques qui permettent de déterminer les conditions optimales de production, d'extraction et de purification. Certains paramètres doivent être pris en considération. En effet, une protéine est composée d'un enchaînement d'acides aminés qui sont chargés dépendamment du pH du milieu. Cet ensemble donne une charge globale, une taille, une densité et une masse à la protéine. Ainsi, certaines méthodes utilisent ces propriétés pour purifier les protéines. Un autre paramètre important est la solubilité des protéines. En effet, les acides aminés permettent de donner la structure de la protéine. Ainsi, les acides aminés hydrophiles vont se placer vers l'extérieur de la protéine et vont avoir des interactions avec le milieu par

l'intermédiaire de liaisons hydrogènes. Enfin, le pH où la charge de la protéine est nulle (pI) peut être exploité pour purifier la protéine.

1.4.2. Choix du vecteur

Il existe un bon nombre de vecteurs qui permettent le clonage et l'expression du gène d'intérêt. Ces vecteurs sont choisis en fonction de la taille du gène à insérer et de l'utilisation que l'on veut en faire. Les plus communs sont les plasmides qui sont simples d'utilisation, faciles à isoler et à purifier. De plus, la présence d'un gène de résistance permet la sélection rapide des bactéries recombinantes (LEWIN, 1998).

Les vecteurs de la série pQE de Qiagen sont des vecteurs couramment employés pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes chez les bactéries. Si cette protéine recombinante est toxique pour la cellule, une expression basale non contrôlée provoque une mauvaise croissance bactérienne, la sélection de mutants, ou un mauvais repliement protéique. Ainsi, pour contrer l'expression basale des protéines, le vecteur pQE-80L exprime le gène *lacI^q* qui code pour un répresseur de l'opéron Lac qui réprime le promoteur. Lorsque l'inducteur est ajouté, dans ce cas l'IPTG, la répression est levée et la T5 ARN polymérase se lie au promoteur Lac, permettant ainsi l'expression massive de la protéine d'intérêt. Ce vecteur permet aussi l'ajout d'une étiquette 6xHis à la protéine, permettant ensuite la purification par chromatographie d'affinité (voir section 1.4.4).

1.4.3. Choix de l'hôte

L'expression de protéines recombinantes dans une souche standard de *E. coli* comme les TOP10 offre l'avantage d'être simple et rapide, et d'obtenir des niveaux d'expression généralement adéquats. Or, l'expression de gènes provenant d'organismes n'ayant pas le même % G+C, comme c'est le cas des clostridies qui ont un faible % G+C (29%), entraîne parfois des difficultés. En effet, la présence de codons rares dans le gène à être exprimé mène à un manque d'ARNt correspondants. Ce déficit en ARNt peut ralentir considérablement la traduction de la protéine ou encore interrompre la traduction menant à une protéine tronquée ou même à l'absence de la protéine à exprimer (KANE, 1995). Diverses souches d'*E. coli* spécialement conçues pour l'expression de telles protéines recombinantes ont été développées. Le tableau 5 présente les caractéristiques des différentes souches d'*E. coli* BL21 ainsi que les gènes d'ARNt apportés par celles-ci.

Étant donné que le génome des *Clostridium* est riche en AT (SEBAIHIA *et al.*, 2006) et pour les besoins de notre expérience, la souche d'*E. coli* BL21 (DE3)-RIL a été utilisée, car elle n'exprime pas les protéases Lon et OmpT, empêchant ainsi la dégradation des protéines produites et contient des copies supplémentaires des gènes des ARNt pour *argU*, *ileY*, et *leuW* sur le plasmide pACYC. Ces gènes codent pour des ARNt qui reconnaissent les codons rares pour l'arginine, l'isoleucine et la leucine et permettent la traduction de séquences provenant d'organismes riches en AT. Finalement, le gène *endA*, qui code pour une endonucléase I qui dégrade rapidement l'ADN plasmidique isolé de minipréparation d'ADN, a été inactivé.

Tableau 5: Caractéristiques des différentes souches d'*E. coli* BL21.

Souche hôte BL21	Résistance antibiotique	Gènes ARNt	Induction	Avantages	Inconvénients
CodonPlus-RIL	Camr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>leY</i> (AUA) <i>leuW</i> (CUA)	Infection avec le bactériophage lambda CE6	Milleur contrôle de l'expression non induite	Induction n'est pas efficace comparé aux DE3
CodonPlus-RP	Camr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>proL</i> (CCC)			
CodonPlus(DE3)-RIPL	Camr Strep Specr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>leY</i> (AUA) <i>proL</i> (CCC) <i>leuW</i> (CUA)	Isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG)	Haut niveau d'expression	Expression basale de la polymérase T ⁷ amène l'expression de protéines potentiellement toxique
CodonPlus(DE3)-RIL	Camr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>leY</i> (AUA) <i>leuW</i> (CUA)	induction de la polymérase T ⁷ par le promoteur <i>lacUV5</i>		
CodonPlus(DE3)-RP	Camr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>proL</i> (CCC)			
CodonPlus(DE3)-RIL-X	Camr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>leY</i> (AUA) <i>leuW</i> (CUA)	Isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG)	Haut niveau d'expression efficace pour étudier des protéines recombinantes avec la méthionine	Expression basale de la polymérase T ⁷ amène l'expression de protéines potentiellement toxiques
CodonPlus(DE3)-RP-X	Camr	<i>argU</i> (AGA, AGG) <i>proL</i> (CCC)	induction de la polymérase T ⁷ par le promoteur <i>lacUV5</i>		

ATB=antibiotique ; Cam=chloramphénicol ; Strep=streptomycine ; Spec=spectinomycine (adapté du manuel d'instruction de Stratagene)

1.4.4. Choix de la technique de purification

Plusieurs méthodes de purification ont été développées dans le but d'isoler, de caractériser et d'étudier différents complexes protéiques. Ces méthodes utilisent, pour la plupart, les propriétés intrinsèques des protéines telles que le point isoélectrique, la constante d'hydrophobicité, la taille et la masse moléculaire. D'autres méthodes plus populaires consistent à utiliser des étiquettes peptidiques et/ou protéiques fusionnées aux protéines à étudier. Ces étiquettes permettent la purification par chromatographie d'affinité de la protéine désirée et ce, en très grande quantité autant dans un système endogène que dans un système de surexpression bactérien, et avec une grande spécificité. Le tableau 6 illustre les étiquettes les plus couramment utilisées avec leurs avantages et

désavantages. Leur emplacement peut se faire autant en N-terminal qu'en C-terminal de la protéine, selon le besoin et la protéine à purifier.

Tableau 6: Diverses étiquettes utilisées pour la purification de protéines recombinantes.

Étiquette	Protéine	Support	Avantages	Inconvénients	Références
His ₆	Six histidines	Ni-NTA	<ul style="list-style-type: none"> • Petite étiquette très utilisée • Forte interaction entre l'histidine et la résine • Fonctionne dans plusieurs vecteurs d'expression • Activité protéique rarement affectée • Facile à détecter • Purification simple et rapide • Résine peu chère • Excellente pureté 	<ul style="list-style-type: none"> • Ajout de site de clivage pour enlever l'étiquette • Efficacité réduite en AnO • Conditions de clivage varient beaucoup • N'augmente pas la solubilité • Liaison de protéines contaminantes qui ont beaucoup de His • Ion de la résine peuvent se solubiliser • Peut être masquée par la protéine recombinante empêchant la liaison à la résine • Peut interférer lors des études de spectrométrie de masse ou de RMN 	(Gaberer, Porekar and Menart 2001; Terpe 2003)
GST	Glutathione S transférase	Glutathione	<ul style="list-style-type: none"> • Purification simple • Fonctionne dans plusieurs vecteurs d'expression • Aide solubilisation des protéines • Détectable par des anti-GST • Protège contre les protéases cellulaires • Stabilise les protéines • Résine peu chère • Excellente pureté 	<ul style="list-style-type: none"> • Grande étiquette • Clivage nécessaire • Peut former des agrégats et des dimères 	(Terpe 2003)
MBP	Maltose binding protein	Amilose	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente la solubilité • Résine peu chère • Excellente pureté 	<ul style="list-style-type: none"> • Grosse protéine • Clivage de l'étiquette obligatoire 	(Terpe 2003; Nallamsetty and Waugh 2006)
FLAG	Peptide FLAG	Anticorps anti-FLAG	<ul style="list-style-type: none"> • Petite étiquette • Haute spécificité • N'interfère pas avec l'activité • Bon rendement • Utilise dans plusieurs types de cellules 	<ul style="list-style-type: none"> • Beaucoup de conditions de clivage • Résine chère 	(Einhauer and Jungbauer 2001; Terpe 2003)
BAP	Peptide accepteur de biotine	Avidine	<ul style="list-style-type: none"> • Petite étiquette • Haut rendement • Grande spécificité • Protéine native 	<ul style="list-style-type: none"> • Résine chère • N'augmente pas la solubilité 	(Schatz 1993; Terpe 2003)
Strep-II	Peptide de liaison streptavidine	Streptavidine	<ul style="list-style-type: none"> • Petite étiquette • Haut rendement • Grande spécificité • Protéine native • Semble efficace pour immobiliser des protéines sur des supports • Détectable par des anticorps • Peut être utilisée pour de la cristallographie ou des études de RMN 	<ul style="list-style-type: none"> • Interaction entre la résine et streptavidine • Résine chère • Souvent pas si soluble • Faible rendement 	(Voss and Skerra 1997; Terpe 2003)
CBP	Peptide de liaison à la calmoduline	Calmoduline	<ul style="list-style-type: none"> • Petite étiquette • Haut rendement si ins en C-terminal • Hautement spécifique • Protéine native • Permet l'étude des interactions protéiques ou de cribler une librairie d'expression de bactériophages 	<ul style="list-style-type: none"> • Résine chère • N'augmente pas la solubilité • Faible rendement si ins en N-terminal 	(Vaillancourt, Zhen, et al. 2000; Terpe 2003)

Les deux premières étiquettes sont les plus couramment utilisées pour leur simplicité (GABERC-POREKAR et MENART, 2001). (NALLAMSETTY et WAUGH, 2006). (EINHAUER et JUNGBAUER, 2001), (SCHATZ, 1993). (VOSS et SKERRA, 1997, VAILLANCOURT *et al* , 2000).

1.4.5. Essais d'activité lytique

La caractérisation des propriétés biochimiques d'une protéine est une étape essentielle dans l'étude de celle-ci, particulièrement lorsqu'il s'agit d'une enzyme. Par exemple, il existe une relation entre la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme, sa concentration dans la réaction et la quantité ou la disponibilité du substrat. Ainsi, il est nécessaire de connaître la quantité minimale d'enzyme et de substrat à utiliser pour avoir de l'activité. De plus, différentes quantités d'enzyme peuvent être ajoutées de manière à voir si l'activité est dépendante de la concentration en protéine et si une protéine est plus active par rapport une autre. Le spectre d'efficacité sur différents substrats est également un facteur à expérimenter étant donné la spécificité des enzymes envers leurs substrats (VOET et VOET, 2004).

Certaines catalyses enzymatiques se font à l'aide d'un ion métallique et ont besoin de cofacteurs pour fonctionner ou améliorer leur activité. Ces enzymes peuvent agir de deux façons : soit elles sont déjà liées à un ion métallique comme le zinc ou le fer, soit elles utilisent l'ion présent dans le milieu. Ces ions participent au processus de trois manières différentes, soit ils se lient au substrat afin de les orienter correctement pour la réaction, soit ils servent de médiateurs pour une réaction d'oxydo-réduction, soit ils stabilisent ou cachent les charges négatives des protéines (VOET et VOET, 2004).

Un autre paramètre important pour le bon fonctionnement des enzymes est le pH. Normalement, la plupart des enzymes sont actives à un pH physiologique. Par contre, lorsque le pH change, la charge nette de la protéine change. Ce changement peut provoquer une rupture au niveau des liaisons hydrogènes au sein de la protéine qui va

induire un changement de conformation. Ainsi, le site actif n'est plus dans son état natif empêchant le substrat de se lier à celui-ci affaiblissant l'efficacité de l'enzyme. Un pH extrême dénature complètement la protéine qui finit par perdre sa fonction. Il existe un point de pH pour lequel la charge nette des protéines est égale à 0. Ce pH est appelé le point isoélectrique ou pI. Il est important de connaître le pI de la protéine d'intérêt afin d'éviter l'utilisation de solutions tampons qui ont un pH autour de cette valeur qui minimise la solubilité de la protéine et facilite les interactions entre protéines adjacentes (VOET et VOET, 2004). En solution saline, la solubilité des protéines dépend des interactions électrostatiques à basse force ionique, la solubilité des protéines augmente lorsque la concentration en sels croît, jusqu'à un certain seuil. Au-delà, elle diminue avec l'addition de sels due à des interactions hydrophobes (VOET et VOET, 2004).

Enfin, les enzymes agissent dans des gammes de température compatibles avec la vie. Elles sont détruites par la chaleur (= thermolabiles) qui va provoquer la rupture des liaisons qui maintiennent la chaîne protéique dans sa conformation fonctionnelle. Elles sont également inactivées momentanément par le froid (VOET et VOET, 2004).

1.5 Objectif de ma maîtrise

L'objectif principal de mes travaux était de démontrer l'activité et l'efficacité des endolysines sur des cellules vivantes de *C. difficile* dans le but de trouver une alternative aux antibiotiques. Les nombreux exemples dans la littérature montrant l'efficacité des endolysines pour lyser des bactéries pathogènes *in vitro* et *in vivo*, l'absence de données (au moment où ma maîtrise a débuté) sur les endolysines de *C. difficile* et la difficulté à

traiter cette bactérie nosocomiale a mené à l'élaboration du projet présenté dans ce mémoire. Il reflète également la difficulté de travailler avec une bactérie anaérobie qui est extrêmement sensible à la moindre présence d'oxygène et à tout changement de milieu. Différentes endolysines ont été clonées, exprimées chez *E. coli* et purifiées par chromatographie d'affinité, puis leur activité a été vérifiée de plusieurs manières. Certains facteurs biochimiques propres à ces enzymes ont été étudiés, tels que les cofacteurs nécessaires pour une meilleure activité lytique, le pH optimal et le spectre d'efficacité sur différentes souches bactériennes. Finalement, l'étude de ces enzymes comme outil de diagnostic ou de biologie moléculaire dans les laboratoires est abordée. Toutes ces données ont permis de dresser un portrait général du potentiel des endolysines chez *C. difficile* et ouvrent la voie à de nombreuses expériences.

Comme mentionné plus haut, nous nous sommes basés sur les nombreux exemples de la littérature pour élaborer ce projet de purification d'endolysine et d'essais lytiques sur des cellules entières. Toujours en nous fiant à la littérature, ce projet devait être relativement *simple* et *direct* et nous n'entrevoiyions pas d'obstacle majeur a priori. Or, nous avons rencontré de nombreuses difficultés techniques en lien avec la stabilité des endolysines purifiées et la sensibilité extrême de *C. difficile* à l'oxygène, ce qui a grandement compliqué nos expériences. De nombreux paramètres et conditions expérimentales ont été testés, mais de façon plutôt empirique jusqu'à maintenant. En rétrospective, il aurait probablement mieux valu aborder ce projet avec une approche plus systématique. Néanmoins, les travaux effectués dans le cadre de ma maîtrise serviront de base pour la poursuite de ce projet qui, je crois, montre beaucoup de potentiel d'applications pour le futur.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Note : la composition des tampons et solutions mentionnés dans les sections qui suivent est décrite dans l'annexe 3)

2.1 Souches utilisées et milieux

Les souches de *Clostridium difficile* proviennent toutes d'isolats cliniques obtenus des Drs Jacques Pépin, Louis Valiquette et Éric Frost du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CD24, CD274, CD390, CD392, CD398, CD399). La souche CD630 a été obtenue du docteur Julian Parkhill de l'Institut Sanger en Angleterre, et la souche VPI 10463 (ATCC 43255) provient de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Les cultures sont ensemencées à 3% dans un bouillon BHI (Oxoid, Nepean, On) et incubées à 37°C dans une chambre anaérobie Thermo Forma (Fisher Scientific) sous une atmosphère contenant 10% hydrogène, 5% CO₂ et 85% azote.

Les bactéries de type *Escherichia coli* TOP10 (génotype : F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻) (Invitrogen, Burlington, On) sont ensemencées dans un bouillon Luria-Bertani (LB) (Bioshop, Burlington, On) supplémenté de 50 µg/ml ampicilline (LB⁵⁰) (Bioshop, Burlington, On).

Les bactéries de type *E.coli* BL21(DE3)-RIL (F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileYleuW Camr]) (Stratagene, Cedar Creek, TX) sont

ensemencées dans un bouillon LB supplémenté de 50 µg/ml ampicilline et 34 µg/ml de chloramphénicol (Bioshop, Burlington, On).

Pour les clonages, les géloses LB ont été supplémentées de 100 µg/ml d'ampicilline (LB¹⁰⁰).

2.2 Plasmides utilisés pour les clonages

2.2.1 pBAD/HisB

Le clonage de l'endolysine *plyCD630-1* a été réalisé dans le vecteur pBAD/His B (Invitrogen). Ce vecteur possède une étiquette polyhistidine en N-terminal permettant la purification de la protéine recombinante sur colonne au Nickel. Il possède également un gène codant pour une protéine régulatrice AraC qui permet le contrôle du promoteur *araBAD* (P_{BAD}) chez *E. coli*. En présence de L-arabinose, le promoteur P_{BAD} est activé et l'expression de la protéine est induite. Il possède également un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des clones (GUZMAN *et al.*, 1995). Les caractéristiques du plasmide sont représentées dans l'annexe 2.

2.2.2 pQE-80L

Le clonage des endolysines *plyCD52* et *plyCD38-2* a été réalisé dans le vecteur pQE-80L (Qiagen, Mississauga, On). Ce vecteur permet la fusion d'une étiquette polyhistidine en N-terminal de la protéine permettant ainsi la purification de la protéine recombinante sur une colonne au Nickel. Il possède également un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des clones. Ce vecteur exprime le gène *lacI^q* qui code pour un répresseur de l'opéron Lac qui réprime le promoteur. L'ajout de l'inducteur Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside, aussi appelé IPTG, empêche le répresseur de lier le promoteur T5. Ainsi, le répresseur étant déplacé, le promoteur *lac* est reconnu par l'ARN polymérase, permettant l'expression de la protéine recombinante. Ce gène permet d'éviter l'expression basale de la protéine qui pourrait être toxique pour la bactérie. Les caractéristiques du plasmide sont représentées dans l'annexe 2.

2.3 Extraction et purification d'ADN

Afin d'avoir de l'ADN pur en quantité importante, les plasmides ont été extraits et purifiés à l'aide du kit de maxipréparation d'ADN plasmidique provenant de la compagnie Qiagen, en suivant les recommandations du manufacturier.

Lorsque nécessaire, certains produits PCR ont été purifiés sur gel à l'aide des colonnes Spin-X (distribué par Fisher Scientific, Ville St-Laurent, Qc). L'ADN a ensuite été concentré par précipitation à l'éthanol en suivant le protocole d'écrit par Sambrook (SAMBROOK et RUSSELL, 2001)

Suite aux digestions enzymatiques, les inserts et les vecteurs ont été purifiés par phénol-chloroforme puis précipités à l'éthanol (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Le volume d'ADN est tout d'abord augmenté à 500 µl avec de l'eau et 500 µl d'un mélange phénol-chloroforme (1 :1) est ajouté. Les tubes sont vigoureusement mélangés au vortex puis centrifugés 3 minutes à 11900 x g, à la température de la pièce (TP). La phase aqueuse est ensuite récupérée, puis l'ADN est précipité à l'éthanol tel que mentionné précédemment.

Lorsque des clones d'*E. coli* positifs sont suspectés, un criblage des plasmides est effectué à l'aide d'une extraction plasmidique sur silice de la manière suivante : 1,5 ml d'une culture de 16 h contenant le plasmide est centrifugé 1 minute à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon 1 puis 200 µl de tampon 2 est ajouté de manière à lyser les cellules. Enfin, 200 µl de tampon 3 est ajouté au tube pour faire précipiter les protéines. Les tubes sont centrifugés 5 minutes à 11900 x g à TP et le surnageant récupéré est incorporé à 200 µl de silice en suspension dans de l'eau ultrapure (13% p/v). Les tubes sont ensuite centrifugés 10 secondes à 11900 x g à TP, puis la matrice ayant liée l'ADN est lavée avec 500 µl d'un tampon EtOH et à nouveau centrifugée. Le culot est finalement séché quelques minutes, puis l'ADN est élué dans 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH8.0 après incubation de 10 minutes à 55°C et deux centrifugations successives de 10 secondes à 11900 x g pour éliminer la silice.

Une fois que les clones positifs sont confirmés, ou que l'ADN va être utilisé pour être transformé dans d'autres souches bactériennes, ceux-ci sont extraits à l'aide de la trousse de minipréparation d'ADN plasmidique de la compagnie Biobasic (Markham, On) afin d'avoir de l'ADN pur pour l'envoi au séquençage.

2.4 Extraction d'acides nucléiques en utilisant les endolysines

2.4.1 Extraction d'ARN à l'aide des endolysines

Pour commencer, 10 ml d'une culture de la souche CD274 est centrifugée 10 minutes à 1900 x g à 4°C puis le surnageant est enlevé. Le culot bactérien est resuspendu dans 100 µl de lysozyme à 100 mg/ml préparé dans du TE, ou encore de PlyCD52 ou PlyCD38-2 à une concentration de 5 mg/ml, puis incubé pendant 1 ou 5 minutes à 37°C. Ensuite, 1 ml de TRIzol est ajouté aux tubes qui sont placés 10 minutes à -80°C afin de fragiliser les parois et faciliter la lyse bactérienne. Une fois décongelés, 200 µl de chloroforme est ajouté aux tubes et ceux-ci sont mélangés par inversion vigoureuse pendant 15 secondes. La suite des étapes pour l'extraction d'ARN est identique au protocole fourni par la compagnie Sigma. Le culot obtenu est finalement solubilisé dans 40 µl H₂O RNase-free et incubé 10 minutes à 55°C pour faciliter la dissolution et la quantité d'ARN est déterminée à l'aide du spectrophotomètre NanoVue de GE Healthcare (Baie d'Urfé, Qc).

2.5 Clonage des endolysines

Les manipulations d'ADN (digestion avec enzymes de restriction, ligation, déphosphorylation, purification de fragments, etc.) ont été effectuées en suivant des procédures standards décrites par Sambrook (Sambrook *et al.*, 2001) ou selon le protocole fourni par les compagnies fournissant le matériel utilisé. Les enzymes de restriction

proviennent de la compagnie Roche (Laval, Qc, Canada) et ont été utilisées d'après les directives de la compagnie, soit avec 1 U d'enzyme par μg d'ADN durant 2 h dans un bain à 37°C.

2.5.1 Préparation des inserts

Le gène *plyCD630-1* a été amplifié par PCR à partir de l'ADNg purifié du prophage $\phi\text{CD630-1}$ de *Clostridium difficile* 630 (numéro d'accèsion NCBI: AM180355) (Sebahia *et al.* 2006) et les gènes *plyCD52* et *plyCD38-2* ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADNg purifié des phages ϕCD52 et $\phi\text{CD38-2}$ provenant de *C. difficile* CD52 et CD38, respectivement (SEBAIHIA *et al.*, 2006; FORTIER et MOINEAU, 2007). Enfin, le domaine C-terminal de *plyCD52* (appelé CBD pour *Cell wall-Binding Domain*) a été déterminé par analyse bio-informatique puis amplifié à partir de l'ADNg purifié du phage ϕCD52 (FORTIER et MOINEAU, 2007) et le gène de la GFP a été amplifié du vecteur pRS315-GFP provenant du laboratoire du Docteur Sherif Abou Elela.

Toutes les réactions de PCR ont été effectuées dans un appareil Eppendorf Mastercycler de la compagnie Eppendorf (Mississauga, On) et les amorces ayant servi à amplifier les différents gènes ont été synthétisées par la compagnie Integrated DNA Technologies (IDT) (Coralville, IA). Les amorces et leurs caractéristiques sont présentées dans l'annexe 1. Des sites de restrictions ont été incorporés dans les différents amplicons PCR. Afin d'éviter l'incorporation de mutations, l'enzyme utilisée pour l'amplification

était l'ADN polymérase Pfu (préparation maison) étant donné qu'elle possède une activité de relecture. La réaction de PCR est composée de 10 ng d'ADNg, 1 X de tampon PCR, 125 µM de chaque dNTP, 1 µM d'amorces et 2.5 unités de Pfu.

Les tableaux 7 et 8 illustrent les conditions d'amplification des fragments *plyCD630-1*, *plyCD52* et *plyCD38-2*. *CBD* et *GFP*.

Tableau 7 : Conditions générales de PCR pour l'amplification des différents gènes

Température	Durée	Cycle
94°C	3 min	1 ^{ère} dénaturation
94°C	45 sec	2 ^{de} dénaturation
X	45 sec	Appariement
72°C	1 min	Élongation
72°C	10 min	Extension finale
4°C	Pour toujours	

Programme PCR de 35 cycles.

X : la température d'appariement dépend des amorces utilisées et est représentée dans le tableau 6B.

Tableau 8: Températures d'appariement utilisées pour l'amplification des différents gènes et fragments

Fragment	<i>plyCD630</i>	<i>plyCD38-2</i>	<i>plyCD52</i>	<i>CBD</i>	<i>GFP</i>
Température d'appariement °C	50	55	57	54	56

De manière à vérifier les produits PCR et à les purifier, ceux-ci sont analysés sur un gel d'agarose 0,8% (p/v) dans du tampon TAE, qui est ensuite coloré au bromure d'éthidium et visualisé sous UV dans un appareil ImageQuant IQ 300 (GE Healthcare). Après amplification, les fragments attendus sont de 816 pb pour *plyCD630-1*, 813 pb pour *plyCD52*, 807 pb pour *PlyCD38-2*, 291 pb pour *CBD52* et 714 pb pour *GFP*. À partir de ce gel, les bandes correspondantes sont rapidement découpées sous lumière UV et

purifiées sur des colonnes d'extraction Spin-X selon les recommandations du fabricant, puis précipitées à l'éthanol (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Ces fragments sont ensuite digérés avec les enzymes de restriction appropriées et puis purifiés par phénol-chloroforme. Ces inserts sont, par la suite, mis sur un gel d'agarose 0,8% afin d'être analysés et quantifiés de façon semi-quantitative à l'aide du programme ImageQuant (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada).

2.5.2 Préparation des vecteurs

Cinq μg de vecteur pBAD/HisB ont été digérés par les enzymes *XhoI* et *HindIII*. Les bouts cohésifs générés étant identiques à ceux des fragments du gène d'intérêt, ceux-ci vont s'intégrer facilement au plasmide. De même, 5 μg de vecteur pQE-80L ont été digérés par les enzymes *BamHI* ou *BamHI+HindIII*. Ces vecteurs digérés ont été purifiés sur gel tel que décrit précédemment afin d'éliminer le petit fragment généré lors de la double digestion, puis remis sur un gel d'agarose 0,8% afin d'évaluer leurs concentrations et leurs puretés. De manière à éviter la recircularisation des vecteurs, leurs extrémités 5' protubérantes ont été déphosphorylées à l'aide de la phosphatase alcaline CIAP d'après les recommandations du fabricant Roche soit avec 1 U/ μg d'ADN 15 minutes dans un bain à 37°C suivi de 30 minutes à 55°C. Finalement, l'enzyme est inactivée 10 minutes à 70°C. En ce qui concerne la fusion GFP-CBD52, le clonage de *GFP* est tout d'abord réalisé dans le vecteur pQE-80L au site *HindIII* et *BamHI* puis le gène *CBD52* est ajouté au vecteur pQE-80L-GFP au site *HindIII*.

2.5.3 Ligations des ADNs

Les réactions de ligation sont effectuées à l'aide de la T4 DNA ligase produite par Invitrogen. Le vecteur à une quantité de 50 ng est mélangé à 1 unité de ligase T4 et 1 X de tampon de ligation. Les inserts ont été ajoutés selon des ratios vecteur/insert 1:1, 1:3 et 1:5 dans un volume final de 10 µl. Ces réactions ont été incubées soit à TP pendant 3 h, soit toute la nuit à 16°C avant d'être transformées dans les bactéries *E. coli* TOP10.

2.5.4 Transformations d'ADN dans des cellules *E. coli* chimio-compétentes et obtention des clones

Les produits de ligation sont introduits dans les cellules *E. coli* TOP10 préalablement rendues chimio-compétentes par la méthode utilisant le chlorure de rubidium, tel que décrit par Sambrook (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Les transformations ont été effectuées par choc thermique après l'ajout de 1 µl de produits de ligation (environ 10 ng) à 50 µl de cellules TOP10 (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Après récupération pendant 1h à 37°C sans antibiotique, les cellules transformées sont ensuite étalées sur des géloses LB¹⁰⁰ puis incubées toute la nuit à 37°C. Dix à vingt colonies isolées sont ensuite ensemencées séparément dans 3 ml de bouillon LB contenant 50 µg/ml ampicilline et les cultures sont incubées pendant 16 h à 37°C sous forte agitation. L'ADN plasmidique est ensuite extrait par la méthode rapide avec la silice tel que décrit précédemment (section 2.3) et la présence d'un insert est vérifiée par digestion enzymatique. L'ADN des clones positifs est ensuite purifié à l'aide d'une trousse de minipréparation d'ADN plasmidique

(Biobasic). Finalement, ces plasmides sont envoyés à séquencer au service de séquençage du CHUL afin de vérifier qu'il n'y a pas eu de mutations et que le gène est présent dans le bon cadre de lecture (se référer à la section 2.10). Des amorces situées dans pBAD/HisB ou pQE-80L ont été utilisées pour le séquençage et sont répertoriées dans l'annexe 1.

Afin de surexprimer les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2, l'ADN des plasmides correspondants a été transformé dans les bactéries *E. coli* BL21(DE3)-RIL (BL21) préalablement rendues chimio-compétentes par la même méthode décrite plus haut. Les transformations ont été effectuées selon la méthode décrite par Sambrook en ajoutant 1-10 ng de plasmide à 50 μ l BL21(DE3) RIL (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Après récupération, les cellules sont ensuite étalées sur une gélose LB¹⁰⁰ + 34 μ g/ml de chloramphénicol, ce dernier antibiotique étant requis pour maintenir le plasmide pACYC.

2.6 Expression et purification des endolysines

2.6.1 Expression dans *E. coli* et détermination de la solubilité des protéines recombinantes

2.6.1.1 Induction

La souche d'*E. coli* TOP10 contenant le plasmide codant pour l'endolysine PlyCD630 dans le vecteur pBAD/HisB ou *E. coli* BL21 contenant PlyCD52 ou PlyCD38-2 dans le vecteur pQE-80L a étéensemencée dans 5 ml de bouillon LB⁵⁰ et laissée toute la nuit à

37°C sous forte agitation. Le lendemain, 11 ml de LB⁵⁰ a étéensemencé avec 1% de la préculture et laissé incubé à 37°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5 toujours sous forte agitation. Afin d'avoir un point de comparaison induit contre non induit, 1 ml de culture a été prélevé et centrifugé 30 secondes à vitesse maximale. Le culot bactérien a été solubilisé dans 50 µl de tampon de charge 1X pour SDS-PAGE (SLB 1X) de manière à obtenir l'équivalent de 0,1 unité DO₆₀₀/10 µl puis mis de côté à -20°C jusqu'à analyse sur un gel SDS-PAGE.

Aux 10 ml de culture restants a été ajouté de l'IPTG (Bioshop) de manière à obtenir une concentration finale de 0,5 mM (ou du L-(+)-arabinose 0,2% pour PlyCD630). Le tout est induit toute la nuit à 37°C sous forte agitation. À la fin de l'induction, la DO₆₀₀ est mesurée et 1 ml de culture est prélevé, centrifugé 30 secondes puis le culot est solubilisé dans un volume de SLB 1X permettant d'obtenir 0,1 unité DO₆₀₀ /10 µl d'échantillon. Les échantillons et les contrôles non induits sont ensuite mis sur un gel SDS-PAGE 12%.

2.6.1.2 Analyse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

De manière à analyser les différentes étapes de la production des protéines recombinantes, des électrophorèses sur gel d'acrylamide :bisacrylamide (29 :1) ont été réalisées en suivant le protocole de Laemmli (LAEMMLI, 1970) dans l'appareil Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, Mississauga, On). Pour commencer, 10 µl d'échantillons recueillis aux différentes étapes de purification sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes avec 10 µl de tampon Laemmli SLB 2X. Ces échantillons sont ensuite placés dans les puits du gel de polyacrylamide au côté du marqueur SDS-PAGE Standards Broad Range

(Bio-Rad) préalablement préparé de la même manière que les échantillons et la migration est effectuée à 200 V pendant environ 45 minutes. Le gel est coloré pendant 20 minutes dans une solution de coloration au bleu de Coomassie puis décoloré 50 minutes dans une solution de décoloration qui révélera le profil de bandes (voir composition des solutions en annexe 3).

2.6.1.3 Détermination de la solubilité de la protéine exprimée

L'induction de la protéine se fait de la manière stipulée dans la section 2.6.1.1 après avoir déterminé les meilleures conditions. Les paramètres testés sont la température et le temps d'induction, et une concentration d'inducteur variable. Un test de solubilité a été effectué pour chaque paramètre d'induction, car il arrive souvent qu'une protéine forme des corps d'inclusion insolubles. Avant induction, 50 µl de SLB 1X est ajouté au culot bactérien de la culture non induite et conservé à -20°C. À la fin de l'induction, les cellules sont récoltées en centrifugeant 10 minutes à 4°C, 12000 x g. Le culot bactérien est resuspendu dans 500 µl de tampon de lyse non dénaturant, transféré dans un tube eppendorf et congelé à -80°C, ce qui permet de fragiliser les cellules.

Une fois les cellules décongelées, celles-ci sont brisées par 6 rondes de sonication de 10 secondes chacune, entrecoupées de pauses de 15 secondes dans un bain de glace à une puissance de 55%, à l'aide de l'appareil Sonic Dismembrator de Artek Corporation (distribué par Fisher Scientific). Cette lyse nous permet d'obtenir l'extrait brut (EB). Ensuite, 10 µl de l'extrait brut est prélevé et 10 µl de tampon de charge SLB 2X a été ajouté puis conservé à -20°C jusqu'à analyse. Le reste de l'EB est centrifugé à 4°C

pendant 15 minutes à 20 064 g et le surnageant obtenu, qui contient les protéines totales solubles, est appelé extrait clarifié (EC).

Sur un gel SDS-PAGE 12% est chargé 10 µl de l'extrait brut et 10 µl de l'extrait clarifié dans une piste adjacente afin de comparer l'intensité des bandes correspondant à notre protéine.

2.7 Méthode finale pour la préparation des endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2

2.7.1 Induction à grande échelle et préparation de l'extrait total des protéines

2.7.1.1 Induction à grande échelle

Une fois les paramètres d'induction déterminés et la solubilité de la protéine confirmée, les protéines ont pu être préparées en gros volume afin d'avoir une quantité importante d'enzyme. Ainsi, 2 x 1 L de LB Amp⁵⁰+ Cam³⁴ ont étéensemencés avec 2 x 10 ml de préculture contenant le plasmide pQE-80L-*plyCD52* ou pQE-80L-*plyCD38-2* et incubé à 37°C sous forte agitation, jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ de 0,5. À cette culture, 0,5 mM final d'IPTG est ajouté et incubé à 37°C sous forte agitation toute la nuit. Le lendemain, les 2 L sont centrifugés à 11872 x g à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est jeté et le culot bactérien est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.7.1.2 Préparation de l'extrait total des protéines par Freezer/Mill

Le Freezer/Mill 6850 de la compagnie LAB-SPEX (Metuchen, NJ) est un appareil qui broie des échantillons cryogénisés et les pulvérise en envoyant magnétiquement un barreau d'acier d'un bout à l'autre d'un tube fermé contenant les échantillons.

Le tampon de lyse utilisé est le tampon PBS1X (2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄) 10 mM imidazole ajusté à 500 mM final NaCl.

La lyse bactérienne par le Freezer/Mill a été effectuée selon les directives du fournisseur. Au culot de bactéries décongelé est ajouté 5 ml de tampon de lyse pour chaque litre initial de culture. Cette préparation est ensuite transformée en « popcorns » dans de l'azote liquide. À l'aide d'une pipette, la suspension bactérienne concentrée est ajoutée goutte à goutte dans de l'azote liquide de manière à obtenir de petites boules congelées de bactéries appelées popcorns qui peuvent être conservées à -80°C en attendant d'être pulvérisées à l'aide du Freezer/Mill. Le Freezer/Mill est préalablement refroidi en ajoutant de l'azote liquide dans la cuve. Les quatre tubes contenant un barreau d'acier sont conservés à -80°C et refroidis à leur tour dans l'azote. Ensuite, les popcorns sont introduits dans ces tubes et mis dans l'appareil. Étant donné qu'il n'y a pas de protocole établi pour la lyse bactérienne, la lyse a été effectuée dans les conditions standards établies par le fournisseur (SPEX, Metuchen, NJ). Tout d'abord, 10 minutes sont requises afin de refroidir au maximum les tubes. Le pré-refroidissement est suivi du premier cycle de broyage qui dure 2 minutes. Enfin, le premier cycle se termine par 2 minutes de refroidissement. Ce cycle est effectué au total 4 fois. Une fois le broyage complété, les tubes contiennent de la poudre de bactéries lysées qui est transférée dans un

tube Falcon. Cette poudre peut être conservée à -80°C pour plus tard ou utilisée immédiatement.

Pour préparer l'extrait cellulaire brut, la poudre est décongelée sur glace puis 10 µg/ml de DNase I (Roche) et 5 mM MgCl₂ sont ajoutés de manière à dégrader l'ADN présent en grande quantité. Le tube est laissé 1h30 dans un bain à 37°C puis l'extrait est centrifugé 30 minutes à 20 064 x g à 4°C. Le surnageant est finalement filtré sur un filtre 0,22 µm (Sarstedt, St Leonard, Qc) et prêt pour purification.

2.7.2 Purification sur colonne au Nickel

Les purifications sont toujours effectuées dans un réfrigérateur à 4°C ou dans un bain d'eau glacée et toutes les solutions sont conservées à 4°C afin que la colonne reste froide.

2.7.2.1 Par FPLC

Dans un premier temps, les purifications de PlyCD630 étaient réalisées sur une colonne HiTrap Chelating HP de 1 ml (Amersham Biosciences, distribué par GE Healthcare) préalablement chargée de nickel et équilibrée avec le tampon de lyse. Le protocole décrit dans le *HiTrap Chelating HP handbook* a été suivi et l'appareil FPLC ÄKTA Explorer (GE Healthcare) a été utilisé. L'extrait total a été appliqué à la colonne à un débit de 1 ml/min de même que les tampons de lavages à 4°C. Ensuite, 10 ml de

tampons de lavages et d'élution sont passés à travers la colonne. Les tampons de lavages sont composés de PBS1X pH8, 500 mM NaCl, 10% glycérol et une concentration croissante d'imidazole : 60 et 100 mM d'imidazole. Le tampon d'élution contient 250 mM imidazole ; l'imidazole en forte concentration entre en compétition avec les histidines et permet le décrochage des protéines étiquetées. À la protéine éluée est ajouté 1 mM final de DTT. La disponibilité de l'appareil étant souvent limitant, la purification manuelle est devenue nécessaire.

2.7.2.2 Purification manuelle

Pour les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2, la purification manuelle a été utilisée. Celle-ci est réalisée avec une colonne HiTrap IMAC FF de 1 ml (GE Healthcare). Les étapes décrites dans le protocole *HiTrap Column Guide* fourni par la compagnie ont été suivies avec précision (GE Healthcare). Avant chaque purification, le nickel contenu dans la colonne a été enlevé par 5 ml d'un tampon contenant 20 mM de phosphate de sodium, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 7,4 puis la colonne est lavée avec 10 ml d'eau distillée. Afin d'enlever les protéines qui auraient pu précipiter dans la colonne, une incubation de 2 h avec 10 ml de 1 M NaOH est requise, suivi d'un lavage avec 10 ml de tampon de lyse et d'eau distillée. Enfin, la colonne est régénérée avec 0,5 ml d'une solution de 0,1 mM NiSO₄. La colonne est ensuite lavée avec 5 ml d'eau distillée et 5 ml de tampon de lyse et est prête à l'utilisation. L'échantillon est appliqué à la colonne à l'aide d'une seringue à un débit d'environ 1 ml/min de même que les tampons de lavage. PlyCD52 a été lavée avec des solutions contenant du PBS 1X pH 7,5, 500 mM NaCl, 40

ou 50 mM imidazole, puis éluée avec 3 ml d'un tampon B qui contient 250 mM imidazole. Étant donné que les lavages à ces concentrations d'imidazole font perdre trop de PlyCD38-2, ses solutions de lavage contiennent du tampon B et 20 ou 40 mM imidazole, puis l'éluion est effectuée avec 3 ml d'un tampon B contenant 250 mM imidazole. Aux protéines éluées est ajouté 1 mM final de DTT et 1% final Tween-20 (Bioshop). Le Tween-20 est ajouté seulement après avoir dosé les protéines par Bradford (ci-dessous). La qualité de la purification est ensuite analysée sur gel SDS-PAGE 12%.

2.7.3 Dosage des protéines totales par le test de Bradford

Avant d'ajouter le Tween-20 au tampon contenant la protéine recombinante purifiée, la concentration est déterminée par un test de Bradford (Bio-Rad), en suivant les recommandations du fabricant. Une courbe standard, à base d'une série de dilutions d'une solution de BSA à 1 mg/ml, est établie parallèlement au dosage des protéines Ply. Le volume de réaction est complété à 800 µl avec de l'eau distillée et 200 µl de réactif de Bradford est ajouté. Après 5 minutes d'incubation à TP, les absorbances à 595 nm ont été mesurées au spectrophotomètre Novaspec Plus de la compagnie Biochrom (distribué par Fisher Scientific). Afin de connaître la concentration de l'extrait protéique, leur absorbance a été reportée sur la courbe standard.

Une fois les endolysines préparées, des essais enzymatiques sont réalisés afin de connaître leur activité.

2.8 Essais enzymatiques

2.8.1 Essais enzymatiques par turbidité

2.8.1.1 Méthode générale pour tous les essais

Une souche de *C. difficile* estensemencée à 3% dans un bouillon BHI préalablement réduit toute la nuit dans la chambre anaérobique. Il est important de noter que tout contact prolongé avec l'oxygène entraîne une autolyse des cellules. Par conséquent, une fois la fin de la phase exponentielle de croissance atteinte, c'est-à-dire à une DO₆₀₀ de 0,8, les cellules sont transférées dans un tube Falcon qui est ensuite fermé hermétiquement. Ce tube est alors sorti de la chambre anaérobique et centrifugé 10 minutes à 1900 x g puis immédiatement rentré dans la chambre afin d'éviter tout contact des cellules avec l'oxygène. Le surnageant est ensuite enlevé et le culot est resuspendu par pipetage dans du PBS 1X pH 7,5 (à l'exception des essais pour déterminer le pH optimal) préalablement dégazé de manière à obtenir une DO₆₀₀ de 0,7. La souche de *Clostridium* utilisée lors des essais correspond à celle sensible pour le phage d'où provient l'endolysine, c'est-à-dire CD24 pour PlyCD52 et CD274 pour PlyCD38-2.

Tous les essais sont réalisés à 37°C en complète anaérobiose, dans des microcuvettes Sarstedt (St-Léonard, Qc) dans un volume réactionnel final de 500 µl contenant 300 mM final de NaCl, et 0,5% final de Tween-20 (à l'exception du test sans cofacteur). Les mesures ont été prises à une DO₆₀₀ toutes les 15 minutes pendant 1 h à

l'aide du spectrophotomètre Novaspec Plus, en n'oubliant pas de prendre la DO₆₀₀ initiale au temps 0. Le pourcentage des cellules résiduelles est calculé en utilisant la formule :

$$\frac{DO Tx}{DO initiale} \times 100 = \% \text{ de cellules résiduelles}$$

- DO Tx= densité optique obtenue à un temps donné (ex : 15 minutes)
- DO initiale= densité optique obtenue au temps initial.

De plus, étant donné un problème de précipitation des endolysines qui engendre une perte d'activité relativement rapide, chaque essai est enchaîné dès que la purification et le dosage sont achevés. Différentes souches de *C. difficile* et autres espèces bactériennes ont également été testées avec les endolysines. Les tests du vecteur pQE-80L vide utilisé comme contrôle et des différentes souches ont été faits avec des préparations d'endolysine différentes contrairement aux tests de concentrations, cofacteurs et pH qui, effectués la même journée dans cet ordre précis, ont été réalisés avec la même préparation d'enzyme. Chaque essai a été fait en triplicata technique et biologique. Enfin, chaque expérience ayant des paramètres différents, ceux-ci vont être spécifiés dans les sous-sections prochaines.

2.8.1.1.1 Activité en fonction de la concentration de PlyCD52 et PlyCD38-2

Les microcuvettes sont préparées à l'avance. Pour chaque concentration, le tampon A est utilisé comme contrôle. Des volumes de 10, 25, 50, 100 et 200 µl

d'endolysine ou de tampon A ont été ajoutés aux cellules. L'essai est ensuite effectué dans les conditions mentionnées dans la section 2.8.1.1.

2.8.1.1.2 Influence de certains cofacteurs sur l'activité enzymatique

Cinquante microlitres d'endolysines ou de tampon A sont ajoutés dans les essais. Pour l'essai sans cofacteur, un aliquote d'endolysine a été prélevé avant l'ajout de 1% Tween-20. Par conséquent, le contrôle de l'essai sans cofacteur est composé du tampon A sans Tween-20. Malheureusement, le tampon phosphate dans lequel les bactéries sont resuspendues empêche l'usage de cofacteurs contenant des ions sulfates. Par conséquent, les conditions étudiées sont :

1. Sans cofacteur
2. Tween-20 0,5% final
3. MgCl₂ à des concentrations de 1 et 10 mM + Tween-20 0,5% final
4. EDTA à des concentrations de 1 et 10 mM + Tween-20 0,5% final
5. Triton 0,1% final + Tween-20 0,5% final

L'essai est ensuite effectué dans les conditions mentionnées dans la section 2.8.1.1.

2.8.1.1.3 Influence du pH sur l'activité enzymatique

Les cellules de *C. difficile* sont resuspendues dans un tampon préalablement dégazé correspondant au pH testé, qui varie de pH 6 à pH 10. Pour les pH de 6, 7, 7,5, 8, et 8,5, un tampon phosphate (PBS 1X) a été utilisé alors que pour les pH de 9 et 10, un tampon Tris-HCl 20 mM a été utilisé.

Un volume de 50 μ l d'endolysine ou de tampon A en guise de contrôle est ajouté aux microcuvettes contenant les cellules resuspendues dans un tampon à pH déterminé et l'essai est réalisé dans les conditions mentionnées dans la section 2.8.1.1.

2.9 Buvarpage de type Southern pour identifier de nouvelles endolysines

Il est possible de trouver de nouvelles endolysines de phages en créant une sonde PCR à partir d'un gène d'endolysine connu et de faire un buvardage de type Southern avec des ADNg de phages dont la séquence génomique est encore inconnue. Afin de trouver l'endolysine dans le génome des phages ϕ MMP01 et ϕ MMP02, deux phages découverts par notre laboratoire mais pour lesquels une séquence d'ADNg n'est pas encore disponible, leurs ADN ont été digérés avec des enzymes de restriction afin d'obtenir un profil de bandes. Les digestions ont été effectuées tel que décrit dans la section 2.5. Étant donné que la séquence de ces phages n'est pas connue, il est impossible de prévoir où va couper les enzymes de restriction. Par conséquent, pour minimiser les risques que l'enzyme employée clive dans le gène de l'endolysine, trois enzymes différentes ont été utilisées. Les génomes purifiés de phages contrôles ϕ CD52, ϕ CD38-2, pour lesquels des

gènes d'endolysines ont été utilisés comme sonde, ϕ CD630-1, pour confirmer la faible intensité des bandes après liaison des sondes (étant donné la faible homologie observée par bioinformatique), et des phages inconnus ϕ MMP01 et ϕ MMP02, ont été digérés par les enzymes *HindIII*, *NdeI* et *HpaI* pendant 2 h à 37°C. Ensuite, des sondes DIG des gènes *plyCD52* et *PlyCD38-2* ont été préparées.

2.9.1 Préparation des sondes DIG

Un PCR pour amplifier les gènes *plyCD52* et *plyCD38-2* a été effectué pour faire la sonde en utilisant un mélange de dNTPs modifiés ayant un ratio de 2 dTTP pour 1 DIG-11-dUTP (voir tableaux 7 et 8 pour conditions d'amplification). Les dNTPs standards ont été remplacés par 1,25 mM de chaque dNTP (A/C/G), 0,83 mM de dTTP et 0,42 mM de DIG-11-dUTP (Roche). Le produit est ensuite purifié sur gel à l'aide des colonnes Spin-X d'après le protocole du manufacturier et la moitié de la sonde est mise dans 50 μ l d'eau distillée stérile ultrapure puis chauffée 10 minutes à 94°C pour la dénaturer. Cette sonde est refroidie immédiatement sur glace puis ajoutée à 10 ml de tampon DIG Easy Hyb (Roche), puis filtrée sur membrane 0,22 μ m pour réduire le bruit de fond.

Les solutions utilisées dans le buvardage de type Southern sont répertoriées dans l'annexe 3.

2.9.2 Buvardage de type Southern

Une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% a été réalisée pendant 55 minutes à 110 V en mettant sur chaque piste les ADN digérés. Après coloration au bromure d'éthidium et visualisation des profils sous UV, le gel est submergé dans une solution de HCl 0,25 M pendant 10 min avec agitation à TP puis rincé à l'eau distillée. Le gel est ensuite submergé dans une solution de dénaturation, 2 x 15 minutes, TP, avec agitation, rincé à l'eau distillée puis submergé dans une solution de neutralisation, 15 minutes, TP, avec agitation. Pour finir, le gel est submergé dans une solution de SSC 20X 15 min, TP, avec agitation et l'ADN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon Hybond ECL (Amersham distribué par GE Healthcare) toute la nuit après avoir fait le montage approprié (SAMBROOK et RUSSELL, 2001).

Le lendemain, la membrane est rincée dans du SSC 2X puis l'ADN est fixé aux UV deux minutes de chaque côté de la membrane en la déposant directement sur la plaque du transilluminateur. La membrane est séchée pour utilisation ultérieure ou incubée immédiatement pendant 4 h à 42°C avec 10 ml de solution de préhybridation DIG Easy-Hyb (Roche) dans un four à hybridation. Le reste des étapes correspond aux procédures de détection DIG décrites par le fournisseur. Brièvement, une fois la préhybridation terminée, le tampon de préhybridation est remplacé par le tampon contenant la sonde dénaturée, puis incubé à 42°C pendant un minimum de 12 heures. La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 5 minutes avec 50 ml de solution de lavage 1, TP, avec agitation, puis lavée deux autres fois avec 50 ml de solution de lavage 2, préalablement chauffée à 65°C, pendant 15 minutes à 65°C avec agitation. La membrane est ensuite

équilibrée 1 minute avec 50 ml de solution de lavage 3 puis incubée 60 minutes à TP dans 10 ml d'une solution de blocage 1X (Roche). Un microlitre d'anticorps anti-Dig couplé à la phosphatase alcaline (Roche) est ajouté à la bouteille puis incubé 30 minutes TP, avec agitation. La membrane est ensuite lavée deux fois dans 50 ml de solution de lavage 3 durant 15 minutes à TP, avec agitation puis elle est incubée 2 minutes dans le tampon de détection. Le substrat CDP-star (Roche) dilué 1 :100 est déposé sur un film plastique et la membrane y est déposée dessus et incubée pendant 5 minutes. La membrane est ensuite égouttée, enveloppée dans du papier Saran et les bandes sont ensuite détectées suite à l'exposition sur film ECL-Plus (GE Healthcare).

Étant donné que la membrane a été utilisée à deux reprises, il a été nécessaire d'enlever la sonde présente sur la membrane en l'incubant 2 x 10 minutes à 37°C dans une solution contenant 10N NaOH et SDS 10% puis dans du SSC 2X. La membrane est finalement conservée à 4°C dans du SSC 2X jusqu'à sa prochaine utilisation.

2.10 Séquencage des ADN

Les ADN à séquencer sont envoyés à la plateforme de séquençage et de génotypage du centre de recherche du Centre Hospitalier de L'Université Laval (CRCHUL) site web : <http://www.adnquebec.com/eng/index.html>. Un appareil ABI 3730xl (Applied Biosystems) a été utilisé avec la chimie des Big Dye.

2.11 Analyses bio-informatiques

Pour l'analyse et la manipulation des séquences d'ADN et de protéines, le logiciel BioEdit version 7.0.5.3 a été utilisé <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html> (HALL, 1999).

Les séquences d'ADN (fichier .ab1) sont analysées avec le programme Staden version 4.10 <http://staden.sourceforge.net/> (BONFIELD et STADEN, 1995). Ce programme nous permet de voir rapidement si les séquences obtenues contiennent des mutations l'une par rapport aux autres. Il est également possible d'intégrer en même temps que les nouvelles séquences la séquence du gène d'intérêt, nous permettant ainsi de comparer très rapidement toutes les séquences et voir laquelle ou lesquelles possèdent un gène intègre.

Enfin, afin d'aligner les endolysines connues et de les comparer, le programme ClustalW a été utilisé. Ce programme permet d'observer les différences au niveau du domaine N-terminal ou du domaine C-terminal qu'il y a entre diverses séquences (THOMPSON *et al.*, 2002).

Les séquences protéiques ont aussi été comparées par analyse BLASTp avec les séquences homologues présentes dans la base de données de NCBI (ALTSCHUL S.F. *et al.*, 1990).

3. RÉSULTATS

3.1 Tentative de caractérisation de PlyCD630-1

Lors du commencement du projet, un seul génome de *Clostridium difficile*, celui de la souche CD630, était séquencé et disponible sur la base de données NCBI (numéro d'accèsion : AM180355 (SEBAIHIA *et al.*, 2006)). Cette souche possède dans son génome deux prophages intégrés (ϕ CD630-1 et ϕ CD630-2) qui, lorsqu'induits à l'aide d'agents mutagènes, sont capables de se répliquer et de lyser la bactérie. Par conséquent, l'endolysine PlyCD630-1 provenant du phage ϕ CD630-1 est présumée fonctionnelle puisque le phage a besoin de l'endolysine pour dégrader la paroi de *Clostridium* afin de libérer les virions. Notons que l'endolysine PlyCD630-2 est identique à 100% à PlyCD630-1 puisque ces deux prophages partagent beaucoup de similarité de séquence. Le point de départ a donc été de cloner l'endolysine de ce prophage dans un vecteur inducible afin de la surexprimer et de la purifier. Une fois PlyCD630-1 clonée dans le vecteur pBAD/HisB, les conditions optimales d'induction de l'expression de la protéine ont été déterminées. Pour cela, les paramètres à mettre au point étaient la température et la durée de l'induction, ainsi que la quantité de L-(+)-arabinose utilisée. Or, l'induction de PlyCD630 toute la nuit à 37°C et à la température de la pièce a mené en partie à la formation de corps d'inclusion insolubles qui se retrouvaient dans le culot lors de la centrifugation (figure 11, B). En effet, lorsque la protéine est soluble, l'intensité des deux bandes est équivalente dans l'extrait brut (EB) et l'extrait clarifié (EC). Par contre, s'il y a formation de corps d'inclusion, ceux-ci tombent au fond du tube lors de la centrifugation

et ne sont pas présents dans le surnageant. L'intensité de la bande de l'extrait clarifié est donc plus faible que celle de l'extrait brut. Comme le montre la figure 11, les conditions retenues correspondent à une concentration de 0,2% finale de L-(+)-arabinose, pendant 4 h à 37°C (Figure 11, A).

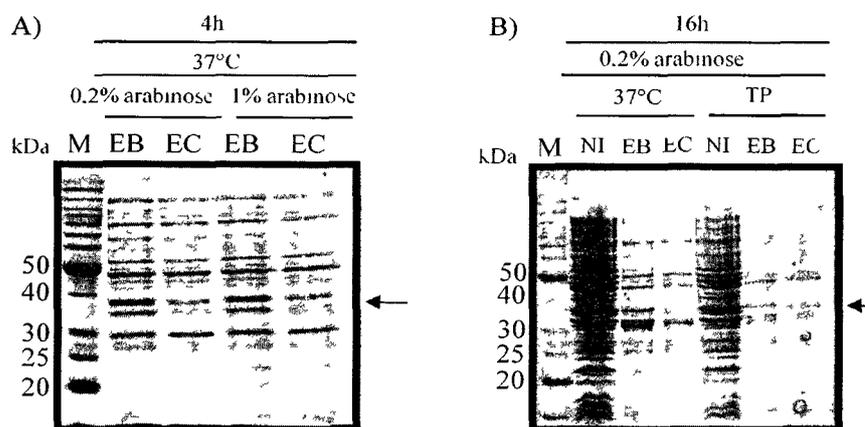


Figure 11: Tests d'induction et de solubilité de PlyCD630-1 cloné dans pBAD/HisB
 Gels SDS-PAGE 12% colorés au bleu de Coomassie.

A) induction 4 h et solubilité avec 0,2% et 1% L-(+)-arabinose à 37°C

B) induction 16 h et solubilité avec 0,2% L-(+)-arabinose à TP ou 37°C.

NI : non-induit ; **EB** : extrait brut (protéines totales) ; **EC** extrait clarifié (protéines solubles). La position de PlyCD630-1 est indiquée par les flèches.

Une fois l'induction effectuée dans les conditions choisies, un volume de 1L d'extrait clarifié est passé sur une colonne au nickel pour la purification par FPLC. Le chromatogramme de la purification est montré à la figure 12.

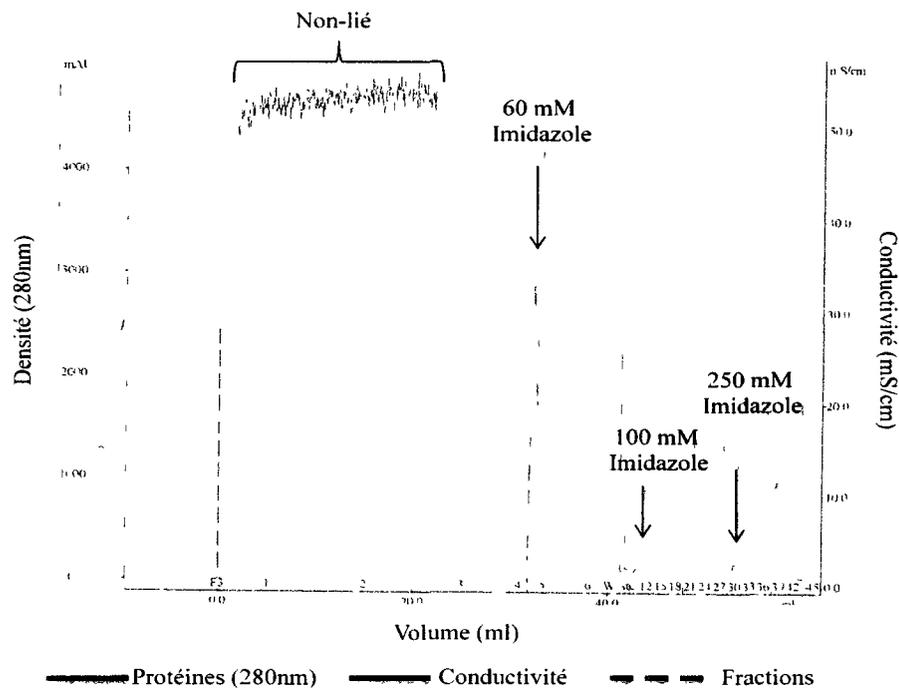


Figure 12: Chromatogramme de la purification de PlyCD630-1 sur colonne au nickel.

Les tampons pour les lavages/élution ont été injectés à un débit de 1 ml/min. Courbe bleue = protéines (280nm); courbe brune = conductivité qui réagit aux différentes concentrations de sel (mS/cm); pointillé rouge = fractions. L'ordonnée de gauche indique des milli-unités arbitraires (mAU) de densité optique. L'ordonnée de droite représente la conductivité en milli-Siemens/cm (mS/cm). L'abscisse représente le volume (ml) d'échantillon.

À chaque étape de purification, un aliquote est prélevé et mis sur gel afin de suivre la qualité de la purification. Tel qu'illustré à la figure 13, la majeure partie de PlyCD630-1 reste accrochée au nickel (piste 3) puis est libérée lors de l'élution avec 250 mM imidazole (piste 5). Il y a également très peu de bandes contaminantes pour une purification sur colonne au nickel ce qui rend la purification acceptable.

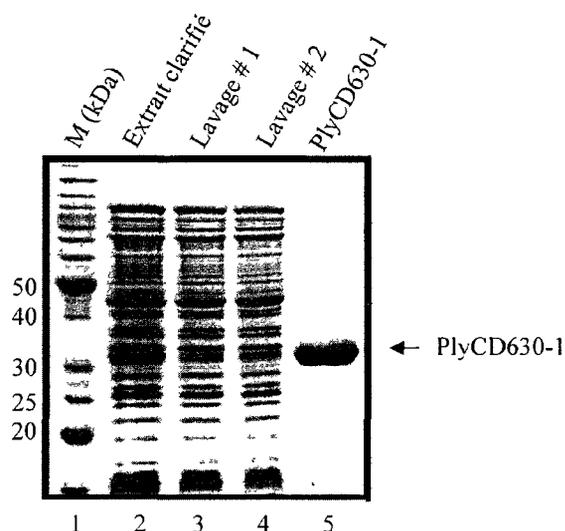


Figure 13: Purification de PlyCD630-1

Des aliquotes pris au courant de la purification sont analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. **Piste 1** : marqueur SDS-PAGE Standards Broad Range ; **piste 2** : Extrait clarifié ; **piste 3** : lavage 1 avec 60 mM imidazole; **piste 4** : lavage 2 avec 100 mM imidazole ; **piste 5** : élution avec 250 mM imidazole où PlyCD630-1 est purifiée.

Les premiers essais d'activité lytique par turbidité ou par courbe de survie ont été réalisés en aérobiose à l'aide de l'enzyme purifiée. Pour des raisons pratiques, la description de ces essais a été omise puisque nous n'avons pas détecté d'activité et que cette partie du projet n'a pas fonctionné. En effet, aucune lyse n'a été observée indiquant que la protéine est probablement inactive. De plus, les cellules contrôles CD630 étaient très instables en aérobiose. Lors des divers essais d'activité, différents tampons à des pH allant de 4 à 11 ont été utilisés tels que des tampons 40 mM acide borique /40 mM acide phosphorique, un tampon Tris-HCl 50 mM et un tampon PBS1X pH8. Différents cofacteurs ont été également ajoutés aux milieux réactionnels : $ZnSO_4$ (dans le Tris HCl), $CaCl_2$, $MgCl_2$, NaCl. Par ailleurs, comme la présence d'oxygène semblait affecter la survie et la stabilité des cellules, les essais ont aussi été effectués en anaérobiose.

Malheureusement, toutes ces conditions n'ont pas permis de détecter une activité lytique pour PlyCD630-1.

Une hypothèse pouvant expliquer l'absence d'activité est la présence de 23 acides aminés entre l'étiquette d'histidine et le premier acide aminé de la protéine, ce qui pourrait changer la conformation de la protéine (voir carte annexe 2). Un site de clivage à l'entérokinase est présent entre l'étiquette histidine et la protéine d'intérêt, nous permettant ainsi de retirer cette partie (voir la carte de pBAD/HisB en annexe 2). La figure 14 présente le produit obtenu après clivage de 2 ml de PlyCD630-1 après ajout de 0,02 unités/ml d'entérokinase et incubation 16 h à TP.

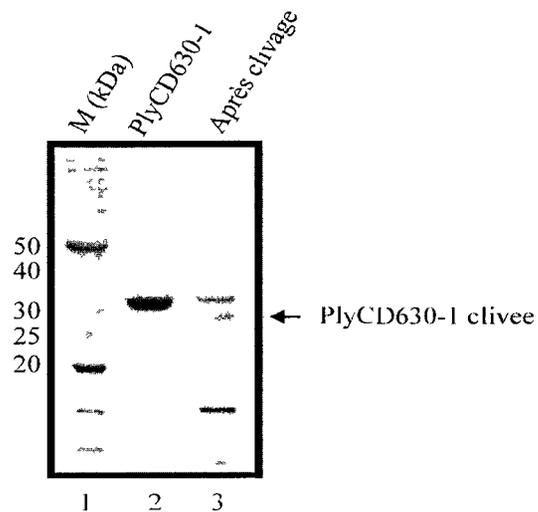


Figure 14: Coupure à l'entérokinase de PlyCD630-1

Le clivage de PlyCD630 a été analysé et visualisé sur un gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. **Piste 1** : marqueur ; **piste 2** : PlyCD630-1 purifiée avant clivage ; **piste 3** : PlyCD630-1 clivée par l'entérokinase pendant 16 h à TP. L'endolysine sans étiquette est indiquée par la flèche.

On aperçoit la présence d'une bande intense à la hauteur de l'endolysine étiquetée qui indique que la coupure n'a pas fonctionné convenablement (piste 3). Aussi,

l'entérokinase semble avoir clivé certaines protéines contaminantes, ou bien il s'agit de produits de dégradation de l'endolysine. Un essai d'activité lytique a été effectué avec cette préparation sans donner de résultat positif.

Le clivage de l'étiquette par l'entérokinase n'étant pas concluant, le clonage de *plyCD630-1* dans le vecteur pQE-80L a été effectué, vecteur dont l'étiquette est directement reliée au domaine N-terminal de la protéine fusion. Les paramètres d'induction à l'IPTG et de solubilité ont à nouveau été vérifiés. L'induction de *PlyCD630-1* toute la nuit à 37°C ou à température de la pièce a mené à la formation de corps d'inclusion insolubles qui se retrouvaient dans le culot lors de la centrifugation (données non présentées). Il ne semblait pas y avoir de différence marquée entre une induction avec 0,5 mM ou 1 mM IPTG et entre 4h et 16h d'induction (figure 15 pistes 6-14). Par conséquent, les conditions retenues pour les inductions subséquentes étaient 0,5 mM IPTG, 4 h à 37°C comme le montre la piste 7 sur la figure 15.

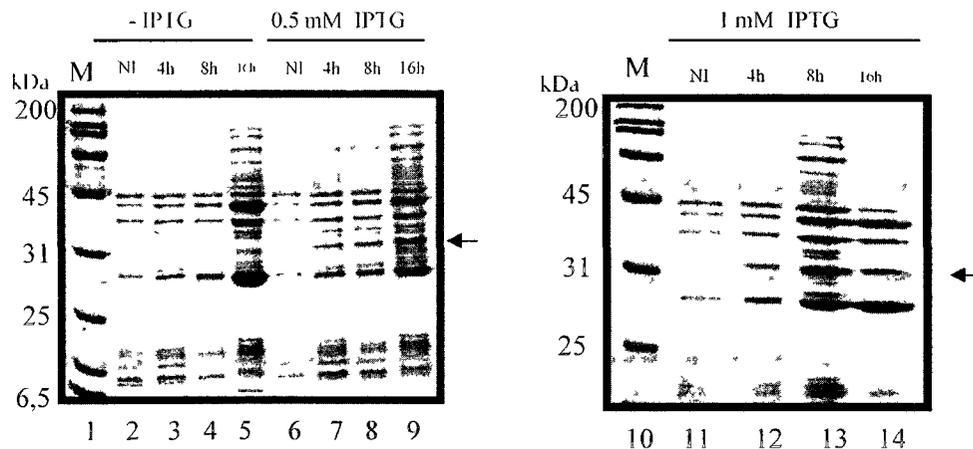


Figure 15: Induction de PlyCD630-1 clonée dans pQE-80L.

Gele SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. NI : non induit. La position de PlyCD630-1 est indiquée par les flèches.

L'activité de la protéine purifiée a ensuite été vérifiée par des essais similaires à ceux décrits précédemment. Cependant, même si la taille de l'étiquette était réduite au minimum, aucune activité n'a été décelée. Pendant l'exécution de ces expériences, le premier article décrivant une endolysine de *C. difficile* (CD27L) a été publié (MAYER *et al.*, 2008). Par ailleurs, une communication avec l'auteur a dévoilé l'échec de leurs essais avec la même endolysine PlyCD630-1. Par conséquent, l'endolysine PlyCD630-1 a été mise de côté et nous avons décidé d'étudier d'autres endolysines. Nous avons choisi les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2 qui proviennent des phages ϕ CD52 et ϕ CD38-2 dont nous avons récemment séquencé les génomes au laboratoire. Ces endolysines ont été comparées par analyses bio-informatique afin d'évaluer leur similarité et ce, dans le but d'éviter d'étudier des endolysines trop similaires.

3.2 Comparaison des séquences protéiques des endolysines

Les endolysines sont des enzymes modulaires (LOESSNER *et al.*, 2002; LOW *et al.*, 2005; KRETZER *et al.*, 2007). Il arrive donc parfois que les endolysines, même si elles proviennent de phages distincts et ont des séquences en acides aminés différentes dans l'ensemble, soient très similaires au niveau de certains domaines (SCHUCH *et al.*, 2002; YOONG *et al.*, 2006). Un alignement multiple des séquences en acides aminés de différentes endolysines de phages de *C. difficile* à l'aide de ClustalW montre que les enzymes CD27L et PlyCD52 sont très similaires. En effet, seulement 6 acides aminés diffèrent au niveau du domaine C-terminal (Figure 16). Puisque l'activité de CD27L avait été démontrée récemment (MAYER *et al.*, 2008), nous étions confiant que l'enzyme

PlyCD52 serait active également. Les essais effectués en anaérobiose par le groupe de Mayer montraient l'activité de l'endolysine CD27L. Étant donné la similarité entre les deux enzymes, nous nous attendions à des résultats similaires avec PlyCD52, en espérant que les quelques acides aminés de différents ne fassent pas en sorte que la protéine se lie mal au substrat, limitant ainsi l'activité. La comparaison de la séquence de PlyCD52 avec celle de PlyCD630-1 montre que les deux enzymes sont complètement différentes au niveau de leur séquence en acides aminés (figure 16 A).

L'endolysine PlyCD38-2 est encodée par le phage ϕ CD38-2. La séquence en acides aminés est également très différente de celle de PlyCD630-1. Or son domaine C-terminal (CBD) est identique, à 4 acides aminés près, au CBD de PlyCD52 et ces endolysines exhibent 69% d'identité entre elles. Ainsi, ces deux enzymes diffèrent par leurs domaines N-terminal essentiellement, ce qui est intéressant puisque c'est ce domaine qui porte l'activité hydrolytique alors que le domaine C-terminal lie le substrat (peptidoglycane) (figure 16 B). De plus, ces alignements révèlent l'architecture modulaire des endolysines de *C. difficile*.

Le clonage des gènes codant pour ces deux endolysines a donc été réalisé dans le vecteur pQE-80L pour éviter l'incorporation d'une étiquette trop grande.

A)

```

PlyCD38-2 MRVALTACHT LTKGK--TGA TGYINEGTEN RILMDLUVKH LKRGG---A TVYSCKVDKS NN-YLAEQCC IANKQNVDA
PlyCD52 .KICI.V.S ILKS.AC.S. D.VV..YQY. KS.APVLADT FR.E.HKVVV IICPE.QF.T.K.EEKSYRIP RV.SGGY.LL
CD27L .KICI.V.S ILKS.AC.S. D.VV..YQY. KS.APVLADT FR.E.HKVVV IICPE.QF.T.K.EEKSYRIP RV.SGGY.LL
PlyCD630 KIGINC..K.A--S. I.K...SI.T NVGYK IOK ...L.N--NV VDCTIDKAST QSEC.SKITA Q. R.DL WF

PlyCD38-2 VQZHTNADHT TLNVMTETI YRTNNGKVYA ERVNEKLATI -FKNRGAKSD ARGLYWLSHT KAPAILIEVC FVDSKADTDY
PlyCD52 IEL.L.SNG QG--K.S.VL YS.K.LE..T.ICD..G.V .....L.K.. I.NSS.PT.V..SF.C.N.E.Y.K
CD27L IEL.L.SNG QG--K.S.VL YS.K.LE..T.ICD..G.V .....L.K.. I.NSS.PT.V..SF.C.N.E.Y.K
PlyCD630 IS....GGG KG---C.VY TYKGRQYCD IO.CK ISDL G.T .V DG SG- VVVK. .KSN .....T-E ANK

PlyCD38-2 YIRH-KDIVA KLIAEGILNK TIDNKENSED KMYKHTIVY GGEVDKIPAT VVGNGYNDGK --ILICDIND YVPGQTONLY
PlyCD52 AKKLSHEGI...V.V...N.N.EG--V.Q.....S.....
CD27L AKKLSHEGI...V.V...N.N.EG--V.Q.....S.....
PlyCD630 LSLGA.KL ZA.V.A.TKH ISSAE...N.YNR.....S.D--VS.D IL.LY.KRK. ESY.VT....K.HR...

PlyCD38-2 VVGGACEKI GSNTK---EK FTNIRGNDRP DTLYKALDFI DR--
PlyCD52 V.....S.I....T.....E.NK
CD27L V.....S.I....T.....E.NK
PlyCD630 I.VT.N.M KE.S.TTG...QLY..VM.S.ND..IE.V.KERL

```

B)

```

PlyCD38-2 MRVALTACHT LTKGK TGA TGYINEGTEN RILMDLUVKH LKRGG---A TVYSGKVDKS NN-YLAEQCC IANKQNVDA
PlyCD52 KICI.V.S ILKS.AC.S. D.VV..YQY. KS.APVLADT FR.E.HKVVV IICPE.QF.T.K.EEKSYRIP RV.SGGY.LL

PlyCD38-2 VQZHTNADHT TLNVMTETI YRTNNGKVYA ERVNEKLATI FKNRGAKSDA RGLYWLSTXK APAILIEVCF VDSKADTDYY
PlyCD52 IEL.L.SNG QG--K.S.VL YS.K.LE..T.ICD..G.V .....L.K.. I.NSS.PT.V..SF.C.N.E.Y.KA

PlyCD38-2 YIRH-KDIVAK KLIAEGILNKT IDNKENSEDK KMYKHTIVYD GEVDKIPATV VVGNGYNDGKI LICDINDVVP GQTONLYVVG
PlyCD52 AKKLSHEGI...V.V...N.N.EG--V.Q.....S.....

PlyCD38-2 VVGGACEKISG TKERFTMIRG HDRPDLTYKA LDFIDR-
PlyCD52 V.....S.I....T.....E.NK

```

Figure 16: Comparaison des séquences protéiques de différentes endolysines

Un alignement des séquences a été réalisé à l'aide du programme ClustalW. Les séquences de quelques endolysines connues sont alignées en **A)** alors que seulement les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2 sont alignées en **B)** de manière à mettre en évidence leurs degrés de conservation au niveau du domaine C-terminal (CBD ; les 90 derniers résidus). La séquence du haut représente la séquence référence pour l'alignement et les pointillés représentent les acides aminés identiques.

3.3 Caractérisation des endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2

3.3.1 Clonage des gènes *plyCD52* et *plyCD38-2* et expression des protéines

Deux constructions plasmidiques dans le vecteur pQE-80L ont été créées avec les gènes des endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2. Le gène *plyCD52* a été introduit après digestion par l'enzyme de restriction *Bam*HI et déphosphorylation du vecteur et le gène *plyCD38-2* a été cloné dans pQE-80L après digestion de celui-ci par *Bam*HI+*Hind*III (Figure 17). Le séquençage a permis de vérifier l'intégrité des séquences avant de commencer l'induction des protéines.

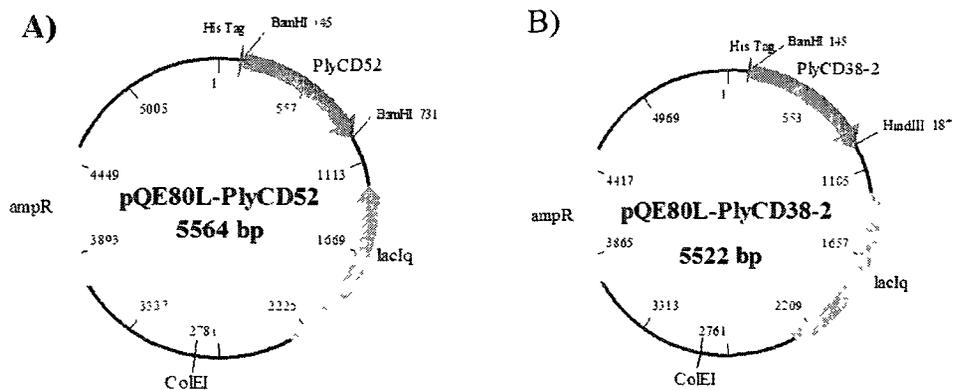


Figure 17: Constructions plasmidiques de PlyCD52 et PlyCD38-2

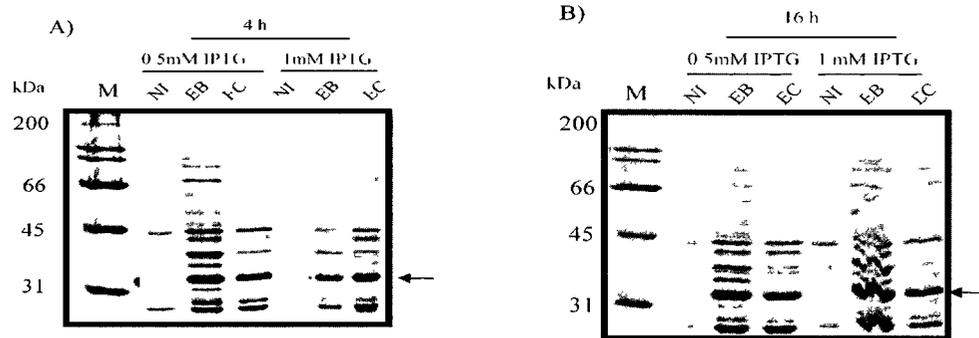
Les gènes *plyCD52* et *plyCD38-2* ont été clonés dans le vecteur pQE-80L en aval d'une étiquette His₆ permettant leur purification future. Le gène *ampR* confère la résistance à l'ampicilline. Le répresseur *lacIq* code pour le répresseur de l'opéron *lac*, empêchant ainsi une expression basale de la protéine pouvant être toxique pour les cellules.

Les plasmides ont ensuite été transformés dans les cellules *E. coli* BL21 (DE3)-RIL de manière à augmenter l'expression des protéines fusions.

Les conditions optimales d'induction des deux protéines ont été déterminées en modulant la température et la durée de l'induction, ainsi que la quantité d'IPTG utilisée.

Une induction de 4 h n'était pas suffisante pour obtenir une quantité appréciable d'endolysine PlyCD52 (figure 18 C), par contre, l'induction avec 0,5 ou 1,0 mM IPTG pendant 16 h a permis d'obtenir une protéine totalement soluble et en quantité appréciable (Figure 18 D). Ainsi, les conditions optimales retenues pour l'expression de PlyCD52 et PlyCD38-2 consistaient en une induction toute la nuit à 37°C en présence de 0,5 mM final d'IPTG (Figure 18 B et D).

PlyCD38-2



PlyCD52

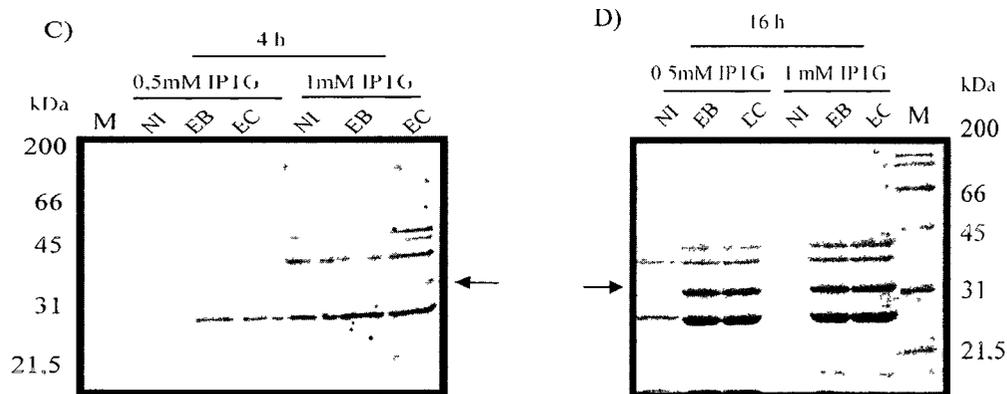


Figure 18: Induction et solubilité de PlyCD38-2 et PlyCD52.

Gels SDS-PAGE 12% colorés au bleu de Coomassie. NI : non induit EB : extrait brut; EC : extrait clarifié.

A) PlyCD38-2 induit 4 h avec 0,5 mM et 1 mM IPTG

B) PlyCD38-2 induit 16 h avec 0,5 mM et 1 mM IPTG

C) PlyCD52 induit 4 h avec 0,5 mM et 1 mM IPTG.

D) PlyCD52 induit 16 h avec 0,5 mM et 1 mM IPTG

La position des endolysines est indiquée par les flèches.

Les protéines ont ensuite été purifiées sur une colonne au nickel après avoir lysé les cellules à l'aide du Freezer/Mill. Un traitement à la DNase I était nécessaire afin de dégrader l'ADN génomique présent en grande quantité après la lyse des bactéries et ce, afin de faciliter le passage de l'extrait clarifié sur la colonne. Il est important de préciser que les conditions de purification, les tampons, les pH et les sels utilisés ont été sélectionnés selon ce qui avait été décrit pour l'endolysine CD27L (MAYER *et al.*, 2008), qui s'avère être quasi identique à notre endolysine PlyCD52 (Fig. 16). Par conséquent, il nous apparaissait logique de tenter de purifier nos endolysines dans ces conditions, d'autant plus que la plupart des endolysines caractérisées jusqu'à maintenant ont été purifiées dans des conditions très similaires (SASS et BIERBAUM, 2007; TURNER *et al.*, 2007; MAYER *et al.*, 2008).

La disponibilité de l'appareil FPLC du département étant souvent un facteur limitant, la purification manuelle est devenue nécessaire. La figure 19 présente un sommaire des étapes de purification des endolysines PlyCD38-2 et PlyCD52. Les pistes 2 et 3 des panneaux A et B correspondent aux extraits bruts et clarifiés après traitements à la DNase I. Les endolysines se sont correctement liées à la colonne comme le montrent les pistes 3 et 4 des deux panneaux (absence d'une bande correspondant à l'endolysine). Lors des lavages, les endolysines, et particulièrement PlyCD52 avaient tendance à décrocher de la matrice (Fig. 19B, pistes 5 et 6). Par conséquent, la concentration d'imidazole dans les lavages 1 et 2 a été ajustée à 20 mM et 40 mM pour PlyCD38-2 et 40 mM et 50 mM pour PlyCD52, respectivement. Cela a permis de limiter la perte sans pour autant l'abolir cependant (données non montrées). L'élution finale a été effectuée dans un volume total de 3 ml afin de récupérer un maximum d'enzyme sans devoir la

concentrer par la suite. Les fractions éluées contenant PlyCD38-2 contenaient deux bandes contaminantes, une autour de 40 kDa et l'autre autour de 30 kDa (Fig. 19A, piste 7) tandis que pour PlyCD52, une seule bande contaminante à ~30 kDa était présente (Fig. 19A et B, piste 7). L'identité de ces protéines demeure inconnue, mais nous avons jugé la qualité de la purification acceptable pour les essais enzymatiques subséquents, et les protéines purifiées ont été dosées par la méthode de Bradford.

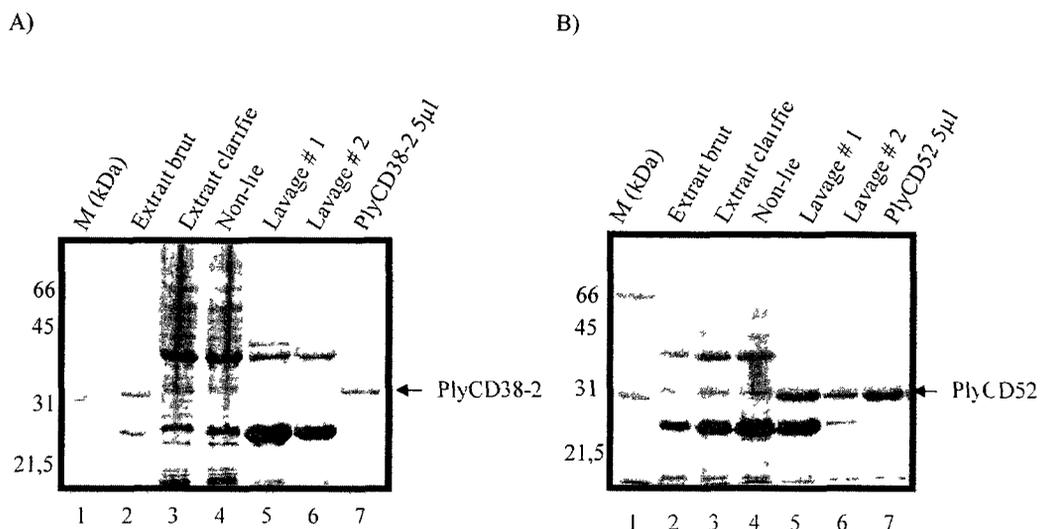


Figure 19: Purification de PlyCD38-2 et PlyCD52

Des aliquotes pris au courant des purifications sont analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. Purification de PlyCD38-2 **A)** et PlyCD52 **B)**. **Piste 2** : extrait brut ; **piste 3** : extrait clarifié ; **piste 4** : protéines non-liées ; **piste 5** : lavages avec 20 mM (PlyCD38-2) ou 40 mM (PlyCD52) imidazole ; **piste 6** : lavage 2 avec 40 mM (PlyCD38-2) ou 50 mM (PlyCD52) imidazole ; **piste 7** : élution avec 250 mM imidazole et analyse de 5 µl sur gel. La position des endolysines est indiquée par les flèches.

3.3.2 Essais enzymatiques

3.3.2.1 Essais enzymatiques en turbidité

3.3.2.1.1 Contrôle de pQE-80L induit

Après purification des endolysines, la bande contaminante à 28 kDa était presque toujours présente (voir figure 19A et B, piste 7). Dans le but de vérifier que les protéines contaminantes n'avaient aucun effet sur les cellules de *C. difficile*, un essai contrôle a été réalisé à l'aide d'un extrait d'*E. coli* contenant le vecteur pQE-80L vide. L'induction a été effectuée dans *E. coli* BL21 (DE3)-RIL dans les conditions identiques à celles des autres endolysines. Les cellules ont été lysées par Freezer/Mill et la purification a été faite comme précédemment. La figure 20 illustre les différentes étapes de la « purification » effectuée et montre les protéines obtenues aux diverses étapes. En absence de la protéine spécifique, les lavages 1 et 2 n'ont pas très bien fonctionné étant donné que de nombreuses protéines ont été récupérées dans l'élution (piste 7).

La fraction issue du lavage #1 contenait la plupart des protéines, notamment la protéine contaminante à 28 kDa en quantité importante (figure 20 piste 5). Cette fraction du lavage #1 ainsi que l'extrait clarifié (contenant toutes les protéines solubles) ont été utilisés comme contrôle négatif d'activité lytique qui a été effectuée dans les mêmes conditions que pour les endolysines purifiées.

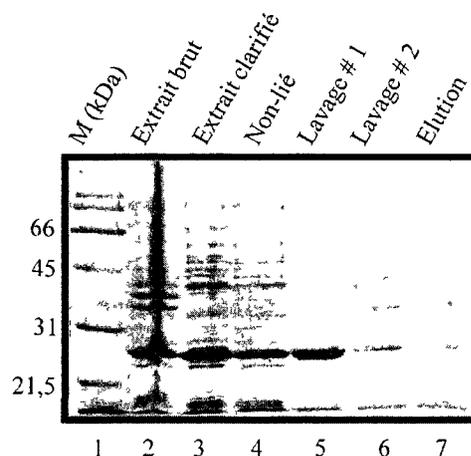


Figure 20: Purification contrôle à partir d'une souche contenant pQE-80L vide
 Des aliquotes pris au cours de la purification sont analysés et visualisés sur un gel SDS-PAGE 12% coloré au bleu de Coomassie. **Piste 1** : marqueur ; **piste 2**: extrait brut ; **piste 3**: extrait clarifié ; **piste 4** : protéines non-liées ; **piste 5** : lavage 1 avec 20 mM imidazole; **piste 6**: lavage 2 avec 40 mM imidazole ; **piste 7**: élution avec 250 mM imidazole

L'activité a été testée à l'aide de la méthode par turbidité (voir Matériel et Méthodes) en ajoutant 50 ou 200 μ l des fractions mentionnées ci-dessus à une suspension bactérienne de la souche de *C. difficile* CD24. Les essais ont été incubés à 37°C pendant 1 h en anaérobiose et des lectures d'absorbance ont été prises toutes les 15 min. Un contrôle supplémentaire consistant en du tampon de lavage #1 seul a été effectué afin de confirmer que les composants du tampon n'affectaient pas l'intégrité des cellules dans les essais.

La figure 21 présente les résultats obtenus avec les différentes fractions. Les données représentent le % de cellules résiduelles aux temps indiqués. Ce que l'on constate, c'est que les cellules sont demeurées stables et aucune lyse majeure n'a été observée. La baisse de 10 à 15% était due à une autolyse normale des cellules dans le tampon PBS1X (données concernant l'autolyse dans le PBS1X non présentées). Ces

résultats confirmaient donc que les protéines contaminantes d'*E. coli* BL21 n'avaient aucune influence sur l'intégrité des bactéries et par conséquent, les essais d'activité avec les endolysines purifiées pouvaient débiter.

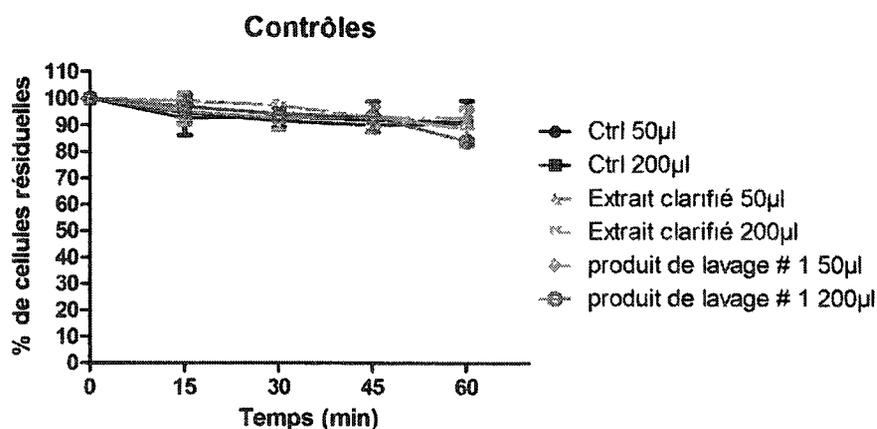


Figure 21: Contrôle de l'activité lytique dans des fractions d'*E. coli* exprimant seulement le vecteur pQE-80L vide.

Au début des essais, les purifications étaient effectuées un jour avant les tests d'activité. Or, après 24 h, les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2 avaient toutes deux précipitées à 4°C dans le tampon d'élution et il n'y avait donc aucune activité lytique dans nos préparations. Un test préliminaire d'activité a donc été réalisé immédiatement après la purification de manière à voir si une activité lytique pouvait être détectée avec les protéines solubles. Le résultat étant positif, plusieurs tentatives ont été réalisées afin de résoudre le problème de précipitation.

3.3.2.1.2 Tentatives pour résoudre le problème de solubilité

Un des facteurs primordiaux pour conserver la solubilité d'une protéine est d'avoir un tampon approprié. Le tampon PBS1X a été le premier tampon utilisé mais celui-ci n'empêchait pas la précipitation. Un des premiers moyens utilisés pour résoudre le problème de précipitation a été d'ajouter du glycérol au tampon qui contenait l'endolysine. Ainsi, 5, 10 et 15% glycérol ont été ajoutés au tampon d'élution additionné de 1 mM DTT. L'ajout de glycérol a permis à l'enzyme d'être plus stable et de ne pas précipiter aussi rapidement (données non présentées). Des essais ont ensuite été réalisés avec ces préparations. Malheureusement, la stabilité et l'intégrité des cellules de *C. difficile* dans ces tampons contenant du glycérol étaient largement réduites, probablement dû à la présence d'oxygène emprisonné dans le glycérol. Par conséquent, l'enzyme était stable plus longtemps mais les cellules étaient instables, ce qui empêchait d'effectuer les essais par turbidité et d'obtenir des activités fiables avec les endolysines. La figure 22 illustre un essai effectué sur des cellules CD24 avec une concentration finale de 0,2 mg/ml de PlyCD52 et 0,2% final de glycérol. Au bout d'1 h, il restait seulement 50% de cellules intactes dans le contrôle avec glycérol (courbe en noir) et 40% de cellules avec PlyCD52 (courbe en bleu) comparé au contrôle sans glycérol où les cellules sont demeurées plutôt stables (courbe en rouge). Même s'il semblait que PlyCD52 possédait une certaine activité, la différence n'était pas significative. D'autres essais ont confirmé l'autolyse des cellules en présence de concentrations finales en glycérol encore plus faible et sur d'autres souches de *C. difficile* tel que la souche CD274 (données non présentées). Dès lors, l'ajout de glycérol pour stabiliser l'enzyme et les tests d'activité lytique sur des cellules de *C. difficile* vivantes étaient incompatibles.

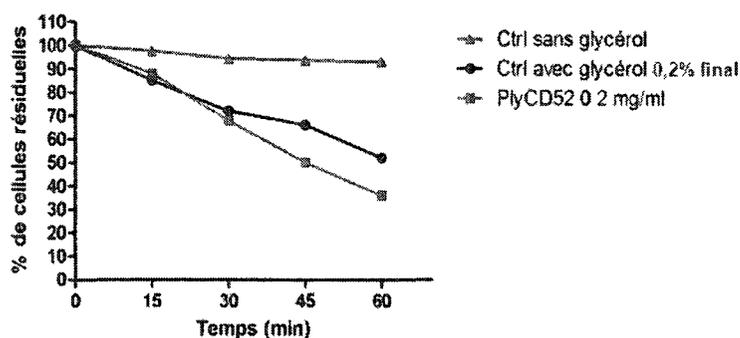


Figure 22: Effet du glycérol sur l'intégrité des cellules de *C. difficile* CD24

Les essais ont été incubés à 37°C en anaérobiose et la DO_{600} a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 1 h. **Courbe en rouge** : Contrôle sans glycérol constitué du tampon d'éluion 250 mM imidazole ; **Courbe en noir** : Contrôle avec glycérol constitué du tampon d'éluion 250 mM imidazole + 0,2% final glycérol ; **courbe en bleu** : PlyCD52 purifiée à une concentration finale de 0,2 mg/ml en présence de 0,2% final glycérol.

Toujours en nous basant sur des études antérieures avec des enzymes similaires, nous avons par la suite effectué la purification dans du tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole puis ajout de 1 mM DTT. Malheureusement, la précipitation était encore plus rapide dans ce tampon comparé au tampon PBS1X.

Il a donc fallu trouver un autre moyen pour stabiliser les endolysines. Toujours en nous basant sur des exemples de la littérature démontrant la caractérisation d'autres endolysines, nous avons testé différentes solutions. Ainsi, après purification, les enzymes PlyCD52 et PlyCD38-2 ont été dialysées contre divers tampons qui sont regroupés dans le tableau 9.

Tableau 9: Divers tampons de dialyse pour stabiliser les protéines

Tampon	NaCl (mM)	Imidazole (mM)	DTT (mM)	Divers
PBS1X pH 7,5	300	250	1	100 µg/ml BSA
PBS1X pH 7,5	500	10		20 mM MgCl ₂ Inhibiteurs de protéases
PBS1X pH 7,5	500	10		0,1% final Triton X-100 Inhibiteurs de protéases
PBS1X pH 7,5	500	10		1% final Tween-20 Inhibiteurs de protéases
PBS1X pH 7,5	500	100	1	0,5 M final sucrose
PBS1X pH 7,5	500	100	1	0,1% SDS- 1% NP10
PBS1X pH 7,5	500	100	1	10% DMSO
20 mM Tris HCl pH 9	500	100	1	1% final Tween-20
20 mM HEPES pH 7	500	100	1	1% final Tween-20
20 mM MES pH 6	500	100	1	1% final Tween-20

/ pas ajouté.

Toutes ces dialyses se sont soldées par des échecs et n'ont pas résolu le problème de précipitation des enzymes PlyCD52 et PlyCD38-2. Nous avons vérifié si les conditions d'induction des protéines pouvaient influencer le repliement de celles-ci, ce qui pourrait expliquer pourquoi les endolysines précipitaient. En effet, une induction de PlyCD52 pendant 16 h menait à la production d'une plus grande quantité d'endolysine comparé à 4 h (Fig. 16) et il se peut qu'avec une trop grande accumulation de protéines celles-ci forment des interactions néfastes pour la stabilité. Un essai a été réalisé en comparant des concentrations de PlyCD52 similaires après une induction de 4 h et 16 h avec 0,5 mM IPTG à 37°C. La lyse bactérienne a été effectuée par Freezer/Mill et la purification a été effectuée tel que précédemment. Ensuite, une partie des endolysines a été utilisée directement dans les essais. L'autre partie des endolysines a été ajustée à des concentrations de 1 et 5 mg/ml afin de vérifier par la même occasion si la précipitation n'était pas due à une protéine trop concentrée. Les résultats présentés à la figure 23

montrent qu'en dessous de 1 mg/ml de PlyCD52, aucune lyse significative des cellules n'était observable. C'est à partir de 12 mg/ml qu'il y a eu lyse bactérienne pour la protéine induite pendant 4 h contrairement à la protéine induite pendant 16 h où 4 mg/ml permettaient d'obtenir une activité similaire. Par conséquent, il semble que la durée de l'induction ait une certaine influence sur l'activité de la protéine PlyCD52 mais hélas, la protéine a tout autant précipité le lendemain. L'induction pendant seulement 4 h et la diminution de la concentration finale de la protéine purifiée n'ont pas permis d'empêcher la précipitation de la protéine.

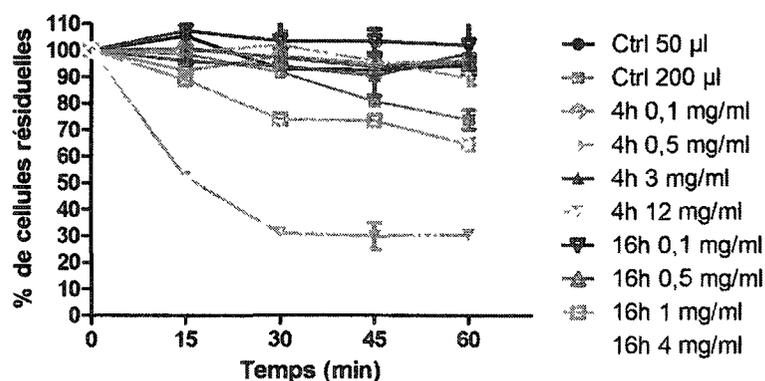


Figure 23 : Activité de PlyCD52 après induction de 4 h ou 16 h

Les cellules CD24 ont été incubées pendant 1 h à 37°C en anaérobiose et la mesure de la DO₆₀₀ a été effectuée toutes les 15 minutes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules résiduelles en fonction du temps de la réaction. Au moins 3 réplicas biologiques ont été effectués avec des résultats similaires.

Pour des raisons de temps essentiellement, en attendant de trouver un moyen de stabiliser les enzymes sans provoquer l'autolyse des cellules dans les contrôles, les essais subséquents ont été réalisés dans un laps de temps court suivant la purification, i.e. avant que les protéines précipitent. Le but était de démontrer que nos enzymes étaient actives et

que nous pouvions espérer exploiter ces enzymes dans le futur, après avoir trouvé un moyen de stabiliser celles-ci.

Certaines conditions modifient l'activité de l'enzyme tel que le pH du milieu réactionnel, la force ionique du milieu réactionnel, la présence de cofacteurs, la concentration en substrat et la température de la réaction. Ces conditions ont été étudiées dans les expériences décrites ci-dessous. Les expériences avec différentes concentrations d'enzyme, différents cofacteurs et pH ont été réalisées avec la même préparation d'enzyme PlyCD52 ou PlyCD38-2 les unes à la suite des autres dans la même journée. Au moins trois répliques biologiques ont été effectués avec trois préparations d'enzyme différentes. L'activité lytique a aussi été testée sur différentes souches de *C. difficile* et autres espèces bactériennes afin d'étudier la spécificité. La température de réaction a été fixée à 37°C, température optimale de croissance de *C. difficile*.

3.3.2.1.3 Activité lytique en fonction de la concentration d'endolysine

Généralement, l'activité des endolysines de phages est dose dépendante (LOW *et al.*, 2005; SASS et BIERBAUM, 2007; MAYER *et al.*, 2008). Il a également été démontré que certaines endolysines agissent à de très faibles concentrations alors que d'autres doivent être ajoutées en quantité importante pour qu'il y ait lyse bactérienne. Par exemple, aussi peu que 10 ng d'endolysine PlyC1 est capable de lyser 10^7 cellules de Streptocoques des groupes A et C en seulement 5 secondes alors qu'il faut 100 µg d'endolysine CD27L pour faire diminuer de 1 log en 2 h une suspension initiale de 10^8 cellules de *C. difficile* (NELSON *et al.*, 2001; MAYER *et al.*, 2008). Nous avons donc

étudié l'activité des endolysines PlyCD38-2 et PlyCD52 en fonction de la concentration d'enzyme utilisée.

Lors des essais pour stabiliser la protéine, le Tween-20 a permis de ralentir la formation du précipité, sans l'en empêcher toutefois. Celui-ci a néanmoins été ajouté aux préparations d'enzymes et aux milieux réactionnels à une concentration finale de 0,5% après détermination de la concentration optimale (données non présentées). Étant donné qu'il fallait procéder rapidement après la purification des endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2 (pour minimiser l'accumulation de précipités), que la concentration en enzyme purifiée variait d'un essai à l'autre et que la présence du Tween-20 interférait avec la réaction de dosage Bradford, il était difficile d'ajuster rapidement la concentration des endolysines avant chaque essai. De plus, le temps de préparation des cultures de *C. difficile* variait d'un jour à l'autre. Tous ces facteurs ont rendu impossible la réalisation des essais dans des conditions standardisées et plusieurs paramètres variaient d'un essai à l'autre. Par conséquent, les expériences présentées ne correspondent pas aux moyennes des essais biologiques, mais plutôt aux moyennes des réplicats techniques \pm l'écart-type pour un réplikat biologique typique. Les exemples d'activité ont été obtenus dans un tampon réactionnel PBS1X à pH 7,5. Des essais ont aussi été réalisés dans un tampon PBS1X pH 8 et les résultats étaient similaires et reproductibles d'un essai à l'autre.

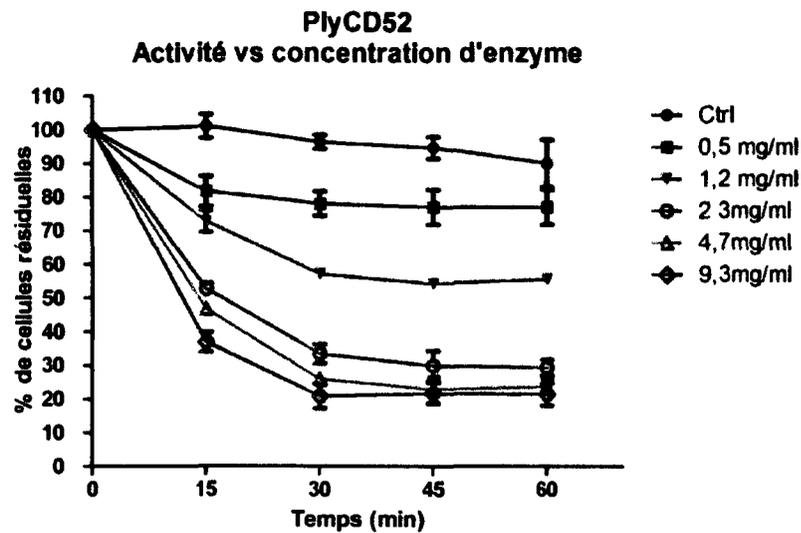
Afin de rendre les graphiques moins chargés, la moyenne \pm l'écart-type de tous les contrôles effectués dans l'essai a été réalisé. En effet, différents volumes d'enzyme ont été ajoutés dans un volume réactionnel final fixe de manière à faire varier la quantité d'enzyme. Donc des volumes équivalents de tampon d'enzyme (sans enzyme) ont été effectués afin d'écarter tout effet du volume de tampon ajouté sur l'intégrité des cellules.

Peu importe les conditions expérimentales testées, la valeur des contrôles demeurait similaire. Par conséquent, la courbe « Ctrl » représente la moyenne \pm l'écart-type des valeurs obtenues dans toutes les conditions différentes testées dans cette expérience.

La figure 24 présente l'activité des enzymes PlyCD38-2 et PlyCD52 en fonction de la quantité d'enzyme ajoutée. Les contrôles présentent une autolyse typique de 10% (courbe en noir). Une baisse drastique du pourcentage de cellules résiduelles a été généralement observée au cours des 15 premières minutes, suivi d'un plateau où la lyse cellulaire semblait diminuer ou se stabiliser. Ce genre de courbe est typique avec les endolysines (CHENG *et al.*, 2005; SASS et BIERBAUM, 2007; MAYER *et al.*, 2008). D'autre part, plus il y avait d'enzyme, plus la lyse bactérienne était rapide et importante, ce qui suggère que les endolysines fonctionnent de façon dose-dépendante. Si les deux enzymes sont comparées, PlyCD38-2 semble plus active par rapport à PlyCD52. En effet, une quantité de 1,4 mg/ml de PlyCD38-2 a permis de lyser 70% des cellules en 30 minutes alors qu'il a fallu une quantité 3 fois plus élevée, soit 4,7 mg/ml de PlyCD52, pour lyser 75% des cellules en 30 minutes. Cette différence entre l'activité de PlyCD52 et PlyCD38-2 a été observée dans tous les essais réalisés (données non présentées). L'activité spécifique de l'enzyme PlyCD38-2 semble donc plus élevée que celle de PlyCD52.

Compte tenu des quantités relativement élevées d'enzyme nécessaires pour obtenir une lyse efficace (en comparaison avec d'autres endolysines décrites dans la littérature (LOEFFLER *et al.*, 2001; SCHUCH *et al.*, 2002; YOONG *et al.*, 2004)), nous avons testé l'effet de différents cofacteurs pour voir si l'activité pouvait être améliorée.

A)



B)

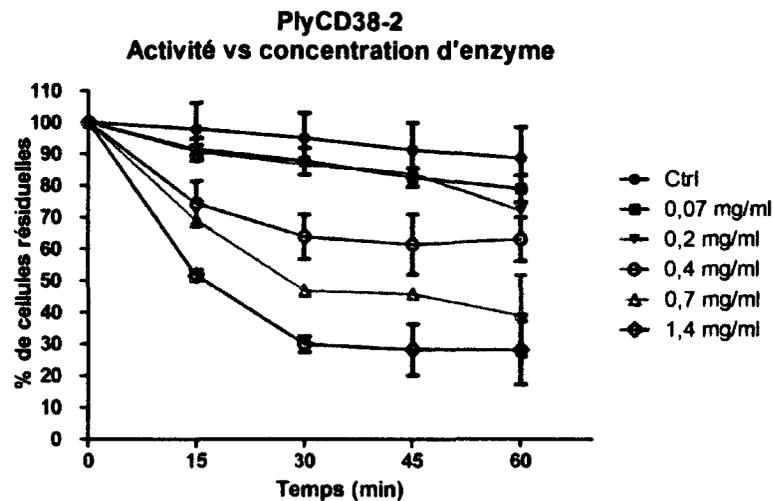


Figure 24: Activité lytique des endolysines en fonction de la quantité d'enzyme

Les cellules (CD24 pour PlyCD52 et CD274 pour PlyCD38-2) ont été incubées à 37°C en anaérobiose et la DO_{600} a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 1h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules résiduelles en fonction du temps de la réaction et correspondent à la moyenne de 3 réplicas techniques \pm l'écart-type. Les courbes en noir représentent la moyenne de tous les contrôles négatifs (Ctrl). Au moins 3 réplicas biologiques ont été effectués avec des résultats similaires.

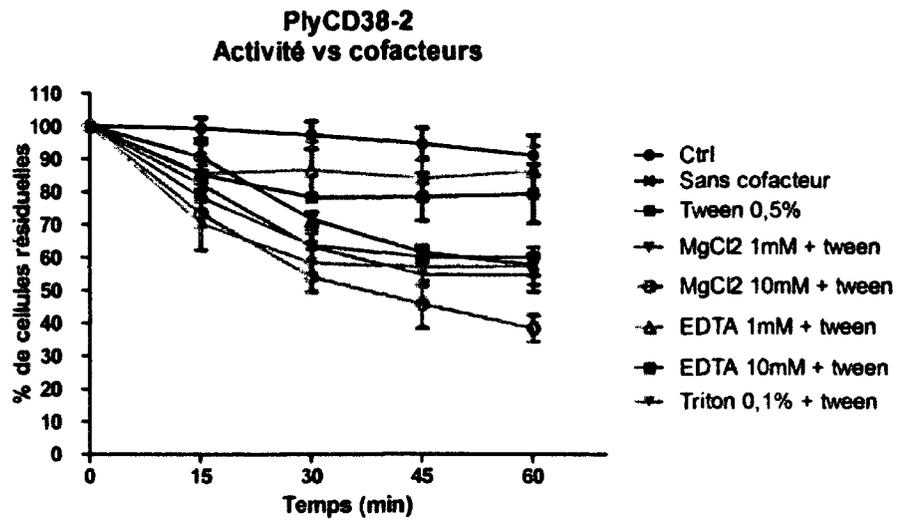
3.3.2.1.4 Effet de l'ajout de différents cofacteurs

Certaines enzymes ont besoin de cofacteurs pour fonctionner ou améliorer leur activité lytique. Par exemple, l'endolysine AmpD de *Citrobacter freundii* a absolument besoin de zinc pour fonctionner (GENEREUX *et al.*, 2004). L'endolysine du phage Tuc2009 voit son activité augmenter de 3 fois en présence de 10 mM CaCl₂ (SHEEHAN *et al.*, 1996). Afin de vérifier si c'est le cas pour PlyCD52 et PlyCD38-2, différents cofacteurs ont été ajoutés au milieu réactionnel et l'activité des endolysines a été mesurée pendant 1 h à 37°C en anaérobiose (Figure 25).

Toujours pour des raisons de simplicité, la moyenne de tous les contrôles sans enzymes effectués dans l'essai est présentée (figure 25, courbe en noir). Les cofacteurs choisis correspondent aux cofacteurs standards rapportés fréquemment au cours d'études similaires avec d'autres endolysines (SHEEHAN *et al.*, 1996; BRIERS *et al.*, 2007; CELIA *et al.*, 2008). Malheureusement, le tampon phosphate dans lequel les bactéries sont resuspendues empêche d'utiliser des cofacteurs contenant des ions sulfates. Par ailleurs, le Tween-20 et du Triton X-100 à 0,1% ont démontré l'amélioration de l'activité de Ply700 et Ply500 (LOESSNER *et al.*, 1996).

La figure 25 présente l'activité des enzymes PlyCD38-2 (A) et PlyCD52 (B) en fonction des cofacteurs testés. Aucun des cofacteurs ajoutés n'a influencé de façon significative la lyse bactérienne étant donné que toutes les courbes sont regroupées entre 40 et 60% de cellules résiduelles. Un essai préliminaire avec le Tween-20 semblait améliorer l'activité par rapport au contrôle sans cofacteur et c'est la raison pour laquelle le Tween-20 a été ajouté dans tous les essais par la suite.

A)



B)

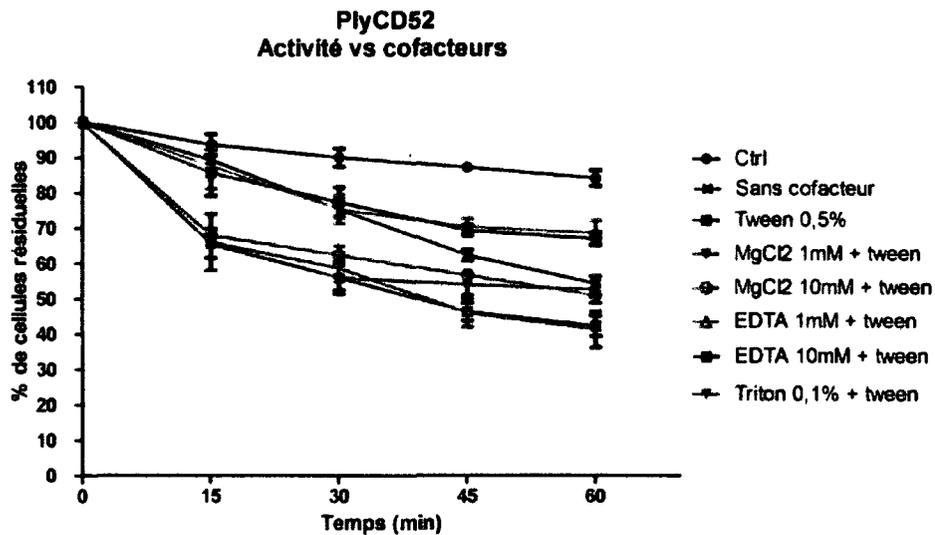


Figure 25: Activité lytique des endolysines en présence de divers cofacteurs

Les cellules (CD24 pour PlyCD52 et CD274 pour PlyCD38-2) ont été incubées à 37°C en anaérobiose et la DO_{600} a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 1h. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type du pourcentage de cellules résiduelles en fonction du temps de la réaction. A) Résultats obtenus avec 0,4 mg/ml PlyCD38-2. B) Résultats avec 1,2 mg/ml PlyCD52. Les courbes en noir représentent les contrôles négatifs sans enzyme (Ctrl). Au moins 3 répliques biologiques ont été effectués avec des résultats similaires.

Seul l'EDTA a semblé inhiber l'activité des deux endolysines. Dans cet essai les différences d'activité n'étaient pas assez grandes pour être significatives, toutefois les résultats ont été reproductibles d'un essai biologique à un autre.

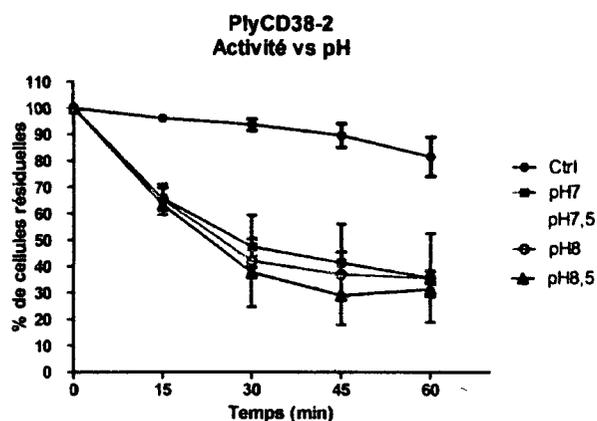
3.3.2.1.5 Effet du pH sur l'activité lytique

Le pH du tampon réactionnel influence grandement l'activité des enzymes. Chaque enzyme est unique et possède un pH optimal de réaction. Par exemple, l'endolysine gp36 du phage ϕ KMV fonctionne à un pH optimal de 6 (LAVIGNE *et al.*, 2004) alors que l'enzyme PlyPH fonctionne de manière équivalente de pH 5,5 à pH 9,5 (YOONG *et al.*, 2006). Il est donc très important de connaître le pH optimal.

Les essais ont été effectués dans des tampons ajustés à des valeurs de pH allant de 6 à 10 (Figure 26A,B). Malheureusement, aux pH 6 et 10 il y avait précipitation rapide des enzymes PlyCD38-2 et PlyCD52 et donc les valeurs n'ont pu être présentées. Le pH 9 quant à lui ne permettait pas d'obtenir la moindre activité, bien que l'enzyme restait stable (Figure 26 B).

Comme on peut le constater à la figure 26, il n'y avait pas de différence significative d'activité aux différents pH testés (excepté ceux où l'enzyme précipitait ou à pH 9,0 où il n'y avait pas d'activité du tout). Donc le pH optimal se situe probablement dans un intervalle plutôt large autour de pH 7 à 8,5.

A)



B)

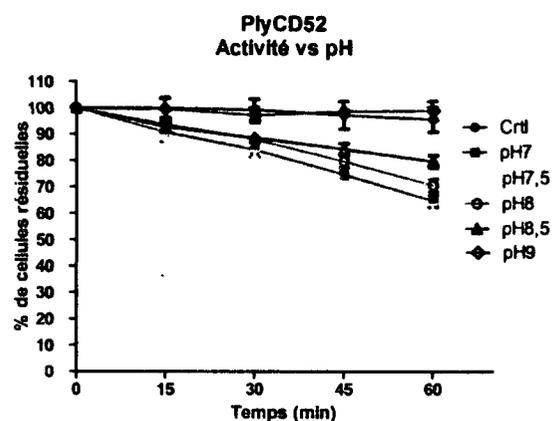


Figure 26: Activité lytique des endolysines en fonction du pH

Les cellules (CD24 pour PlyCD52 et CD274 pour PlyCD38-2) ont été incubées à 37°C en anaérobiose et la DO_{600} a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 1h. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type du pourcentage de cellules résiduelles en fonction du temps de la réaction. A) Résultats obtenus avec 0,4 mg/ml PlyCD38-2. B) Résultats avec 1,2 mg/ml PlyCD52. Les courbes en noir représentent les contrôles négatifs sans enzyme (Ctrl). Au moins 3 réplicas biologiques ont été effectués avec des résultats similaires.

3.3.2.1.6 Spécificité des endolysines

Les endolysines ont la particularité d'être spécifiques à l'espèce bactérienne et sont donc habituellement inefficaces contre des bactéries d'autres espèces ou genres bactériens (LOEFFLER *et al.*, 2001; NELSON *et al.*, 2001). Afin de vérifier le spectre d'activité des endolysines, celles-ci ont été testées sur diverses souches. Les bactéries n'appartenant pas au genre *Clostridium* et à l'espèce *C. difficile* ne doivent pas être affectées par la présence de PlyCD52 telle qu'*E. coli*. Les souches de *Clostridium difficile* sont susceptibles d'être lysées et ont été choisies pour leurs caractéristiques variées. Tout d'abord, elles possèdent des ribotypes différents, le ribotype étant une méthode de typage des souches basée sur l'analyse des tailles des fragments PCR amplifiés sur la région

d'ADN séparant les gènes ribosomiaux 16S et 23S (régions intergéniques) (BIDET *et al.*, 1999). Certaines souches produisent plus de spores que d'autres et provoquent des symptômes plus ou moins sévères. Notez que dû à l'instabilité des endolysines et à la rapidité avec laquelle les essais devaient être réalisés, nous avons limité nos essais à quelques souches seulement. Les caractéristiques des souches testées et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Caractéristiques des différentes souches bactériennes utilisées pour la vérification du spectre d'action de PlyCD52.

Souches bactériennes	Caractéristiques	Ribotype
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	/
<i>Clostridium difficile</i> CD24	Souche contrôle pour PlyCD52	38
<i>Clostridium difficile</i> QCD-32g58	Souche contrôle pour PlyCD38-2	27
<i>Clostridium difficile</i> VPI 10463	Souche de référence ATCC43255	37
<i>Clostridium difficile</i> CD630	1 ^{er} génome séquencé (Sebahia, Wren <i>et al.</i> 2006)	28
<i>Clostridium difficile</i> CD390	Grande sporulatrice Cas compliqué	27
<i>Clostridium difficile</i> CD392	Grande sporulatrice Cas sévère	23
<i>Clostridium difficile</i> CD398	Grande sporulatrice Cas sévère	18
<i>Clostridium difficile</i> CD399	Grande sporulatrice Cas compliqué	6

/ : pas de ribotype associé.

La figure 27 présente l'activité de 0,6 mg/ml PlyCD52 sur les différentes souches et espèces bactériennes testées. Cette expérience a également été réalisée avec PlyCD38-2 mais des problèmes d'inactivité de l'enzyme sont apparus. Par manque de temps, l'expérience n'a pas pu être refaite. Ainsi, il faudrait reprendre cette expérience.

Malgré l'activité relativement faible sur la souche contrôle *C. difficile* CD24 (baisse de 30% seulement), PlyCD52 n'a aucune activité sur *E. coli* qui est une bactérie à Gram négatif, résultat auquel on s'attendait. Aussi, toutes les souches de *C. difficile* se sont avérées sensibles à l'endolysine, ce qui est en accord avec les résultats de Mayer *et al.* (2008). Toutefois un résultat inattendu est survenu. En effet, la souche de *C. difficile* CD630 semble être insensible à l'endolysine. La pureté de la culture a été vérifiée ce qui écarte la possibilité d'une contamination. La raison pouvant expliquer l'absence d'activité demeure inconnue, mais il aurait été très intéressant de comparer ce résultat avec l'enzyme PlyCD38-2.

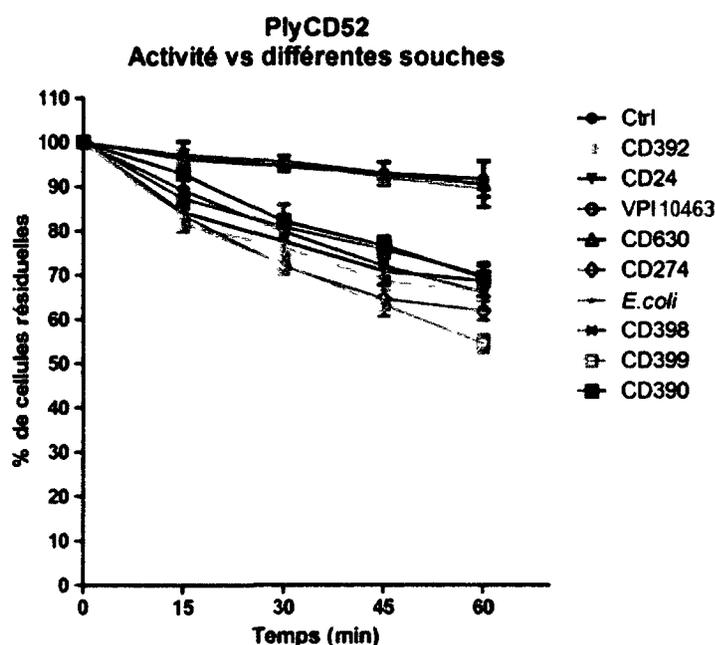


Figure 27 : Activité lytique de PlyCD52 sur différentes souches

Les cellules ont été incubées à 37°C en anaérobiose et la DO_{600} a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 1h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules résiduelles en fonction du temps de la réaction.

3.2 Applications potentielles des endolysines

3.2.1 Extraction d'acides nucléiques

Il est particulièrement long et difficile d'extraire de façon efficace les acides nucléiques de *C. difficile* étant donné la présence de l'épaisse paroi de peptidoglycane. C'est pourquoi nous avons donc tenté de déterminer si les endolysines pouvaient augmenter l'efficacité de la lyse de la paroi bactérienne lors des extractions des acides nucléiques et ce, en modifiant dans un premier temps un protocole d'extraction d'ARN basé sur l'utilisation du lysozyme et du réactif TRIzol. Pour être efficace sur des cellules de *C. difficile*, le lysozyme doit être ajouté en concentration élevée (100 mg/ml) et requiert un temps d'incubation variant de 15 à 20 minutes suivi de plusieurs gels-dégels dans un mélange de glace sèche-éthanol afin de fragiliser au maximum la paroi cellulaire pour que le TRIzol puisse ensuite bien lyser les cellules.

L'endolysine PlyCD52 a donc été utilisée à une concentration de 5 mg/ml et comparée à une concentration de 10 mg/ml de lysozyme. Le tableau 11 résume la quantité d'ARN obtenue avec les différents essais. Le tampon de conservation de l'enzyme est utilisé à titre de contrôle négatif (sans traitement enzymatique). Le lysozyme est utilisé à titre comparatif étant donné que les extractions se font habituellement avec le lysozyme. Les enzymes ont été incubées avec les cellules pendant 1 et 5 minutes afin de vérifier si le temps d'incubation pouvait influencer la quantité finale d'ARN obtenue, telle que déterminée à l'aide du Nanovue. Au bout de 1 minute, aucun ARN n'a été obtenu avec le tampon de conservation alors que 22 µg/ml d'ARN ont été obtenu avec le lysozyme.

L'endolysine PlyCD52 conservée dans du glycérol à -20°C a permis d'obtenir une quantité en ARN plus faible qu'avec celle conservée à -80° (données non présentées). Par contre lorsque le temps d'incubation était de 5 minutes, la quantité d'ARN a presque doublé en présence de lysozyme par rapport au contrôle sans enzyme (78 µg/ml vs 47 µg/ml respectivement), mais ces valeurs étaient faibles comparés à celle obtenue avec PlyCD52 (1038 µg/ml selon la méthode de conservation de l'enzyme). Par contre, il faudrait vérifier la qualité des ARN obtenus par cette méthode.

Tableau 11: Efficacité de l'extraction d'ARN total de *C. difficile* en présence d'endolysine PlyCD52

Composition	1 minute (µg/ml)	5 minutes (µg/ml)
Tampon de conservation	0	47
Lysozyme 10 mg/ml	22	78
PlyCD52 5 mg/ml	235	1038

3.3 Détection de *C. difficile* à l'aide d'une endolysine modifiée avec la GFP

Les endolysines peuvent être utilisées de manière à visualiser la présence de bactéries dans un milieu, par exemple en couplant le domaine de liaison CBD à une protéine fluorescente comme la GFP. Ainsi, les bactéries peuvent être visualisées en microscopie à fluorescence. On pourrait éventuellement utiliser une telle enzyme comme diagnostic pour identifier rapidement l'espèce *C. difficile* (LOESSNER *et al.*, 2002).

Un clonage de CBD de PlyCD52 a été effectué dans le vecteur pQE-80L de façon à fusionner le CBD à la GFP. La figure 28 représente la carte plasmidique du plasmide pQE-80L avec la construction GFP-CBD insérée. Malheureusement, les séquences obtenues après envoi au séquençage ne sont pas intègres et beaucoup de mutations étaient présentes au niveau du CBD.

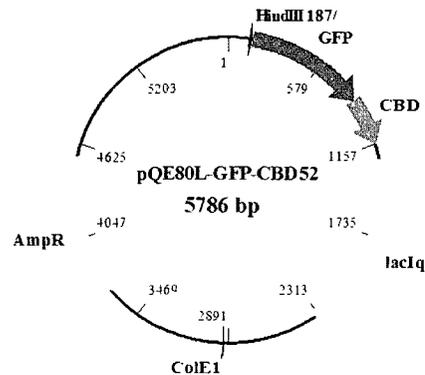


Figure 28: Construction plasmidique de GFP-CBD

Le fragment *CBD* de *plyCD52* a été cloné dans le vecteur pQE-80L-GFP à l'aide de l'enzyme de restriction *HindIII*. Le gène *ampR* confère la résistance à l'ampicilline. Le répresseur *lacIq* code pour le répresseur de l'opéron *lac*, empêchant ainsi une expression basale de la protéine pouvant être toxique pour les cellules.

3.4 Buvardage de type Southern pour trouver d'autres endolysines

Comme démontré dans la littérature, l'activité spécifique des endolysines est souvent très variable selon l'enzyme étudiée. Nous avons donc voulu trouver d'autres endolysines de phages, mais en absence de séquence génomique, il a fallu se tourner vers une méthode basée sur la similarité de séquence. En effet, les endolysines peuvent avoir une séquence similaire sans pour autant provenir de phages apparentés (voir Fig. 16). En utilisant une sonde d'ADN marquée correspondant à une endolysine connue, il est possible de détecter

par buvardage de type Southern d'autres gènes similaires codant pour des endolysines (SOUTHERN, 1975).

Nous avons voulu trouver le gène codant pour l'endolysine dans le génome de deux phages de *C. difficile* récemment isolés au laboratoire, mais pour lesquels le génome n'est pas séquencé, ϕ MMP01 et ϕ MMP02. L'ADNg de ces phages a été digéré par différentes enzymes de restriction et les fragments ont été séparés sur gel d'agarose (Figure 29A). Le génome du phage ϕ CD52 digéré par *HindIII* a servi ici de contrôle positif pour la sonde PlyCD52 étant donné que l'endolysine provient de ce phage (Fig. 29A, piste 2), et pour les mêmes raisons, le génome du phage ϕ CD38-2 digéré par *HindIII* a servi de contrôle positif pour la sonde PlyCD38-2 (Fig. 29A, piste 3). L'objectif était de trouver une enzyme permettant de générer un fragment de taille raisonnable (moins de 3-4 kb) à l'intérieur duquel le gène de l'endolysine serait présent et ce, afin d'identifier rapidement ce gène après purification sur gel du fragment de restriction, puis clonage et séquençage du fragment. Ainsi, on évite de séquencer le génome du phage en entier pour obtenir la séquence du gène de l'endolysine. Le buvardage de type Southern a par la suite été réalisé sur le gel présenté en A. La figure 29 présente les deux buvardages réalisés, l'un avec la sonde PlyCD52 B) et l'autre avec la sonde PlyCD38-2 C). Tout d'abord, si les deux membranes sont comparées, les bandes qui apparaissent sont presque identiques, la différence étant l'intensité avec laquelle elles apparaissent.

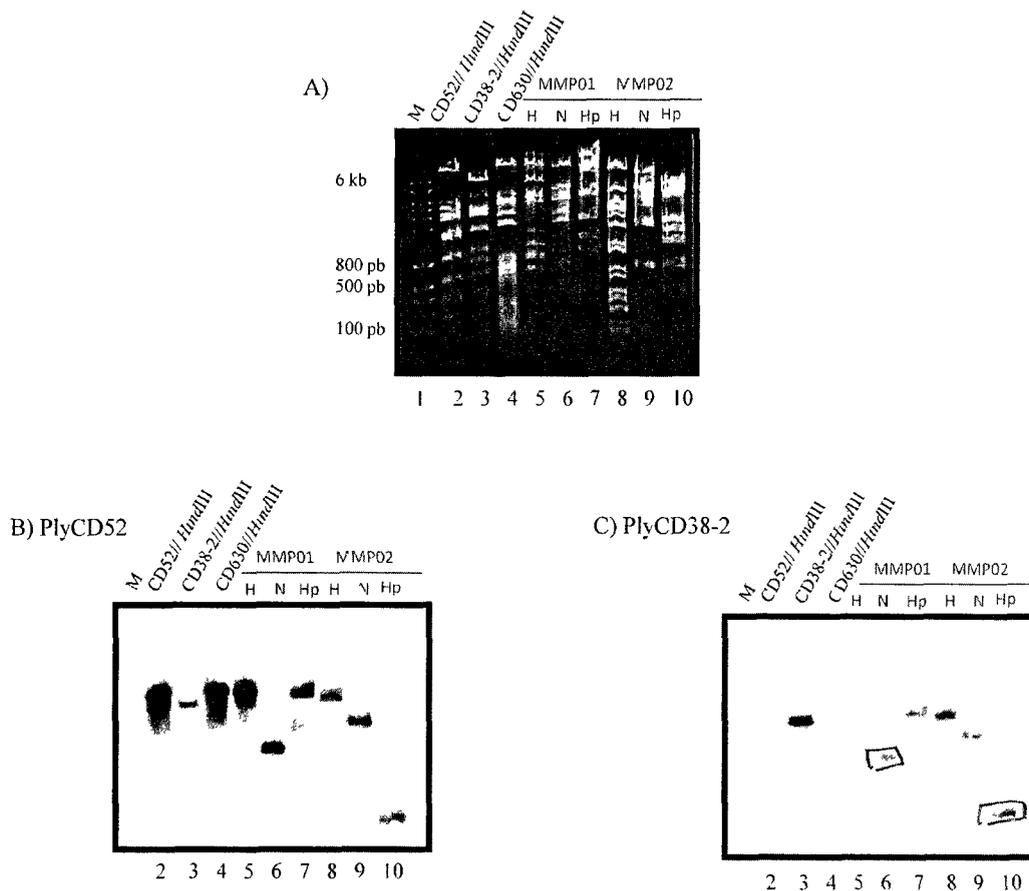


Figure 29: Buvardage de type Southern avec des sondes de PlyCD52 et PlyCD38-2

L'ADNg des phages est digéré par différentes enzymes de restriction. Puis, 5 µl d'ADN digéré est déposé et analysé sur un gel d'agarose 0,8% coloré au bromure d'éthidium A) puis, transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde correspondant à PlyCD52 B) et PlyCD38-2 C). H : *HindIII*; N : *NdeI*; Hp : *HpaI*

De plus, les deux sondes se sont parfaitement liées à leur propre ADN et donnent des bandes de forte intensité (B piste 2 et C piste 3). La sonde PlyCD52 se lie de manière prononcée avec l'ADN du phage φCD630-1 (B piste 4) mais également avec φMMP01 et φMMP02 (B piste 5 à 10) alors que la sonde PlyCD38-2 se lie moins fortement aux ADN présents sur le gel (C pistes 5 à 10). Si ces hybridations sont analysées plus en détail, on constate que les deux endolysines de ces phages sont similaires aux endolysines PlyCD52

et, dans une moindre mesure, PlyCD38-2. Aussi, le fragment le plus approprié pour un clonage de l'endolysine du phage ϕ MMP02 est celui obtenu après digestion de l'ADN par *HpaI*, puisqu'une bande bien définie et de taille plus petite a été obtenue avec les deux sondes (figure 29 B et C, pistes 10) (malheureusement, la position des marqueurs de masse moléculaire n'est pas identifiée sur la figure). Lorsque ϕ MMP02 est digéré par *HindIII*, le fragment portant l'endolysine est d'une taille trop importante pour permettre le clonage efficace même si la bande obtenue est bien définie (figure 29 B et C, pistes 8). De même, sa digestion par *NdeI* apporte un clivage de l'endolysine en deux fragments distincts (figure 29 B et C, pistes 9). Finalement, pour ϕ MMP01, les fragments obtenus sont soit trop grands ou le gène de l'endolysine est scindé en deux par les enzymes utilisés. Donc il faudrait essayer d'autres enzymes pour trouver un fragment de taille raisonnable et un gène d'endolysine non interrompu pour le phage ϕ MMP01.

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

4.1 Rappel de la problématique

La bactérie *Clostridium difficile* est un pathogène nosocomial important responsable de diarrhée qui peut parfois provoquer une colite pseudomembraneuse et entraîner la mort. Lors d'une infection à *C. difficile* (ICD), le traitement de base est l'arrêt de la prise d'antibiotiques pour rétablir la flore normale de l'intestin. Dans le cas où les symptômes sont plus sévères, le patient est alors traité avec la vancomycine ou le métronidazole (GERDING, 2000). Entre les années 2000 et 2003, l'émergence d'une souche hypervirulente NAP1/027 résistante aux céphalosporines et aux fluoroquinolones a fait ressentir le besoin de trouver des alternatives face au traitement des ICD (O'CONNOR *et al.*, 2009). De nos jours, de nouveaux antibiotiques sont à l'essai. De même, l'utilisation de probiotiques, la transplantation fécale et l'immunothérapie sont également étudiés dans le but de trouver des alternatives qui n'utilisent pas les antibiotiques (JORUP-RONSTROM *et al.*, 2006; MILLER, 2008; TUNG *et al.*, 2009; YANGCO *et al.*, 2009; SILVERMAN *et al.*, 2010). C'est à ce niveau que les endolysines de *C. difficile* interviennent comme nouvelle approche pour traiter les infections à *C. difficile*.

Les endolysines sont des protéines de phages qui ont évolué depuis des millions d'années dans le but d'attaquer de manière spécifique le peptidoglycane d'une souche bactérienne donnée (HERMOSO *et al.*, 2007; FISCHETTI, 2008). Sauf pour quelques exceptions, les endolysines ne possèdent pas de peptides signal, mais le passage au travers

la membrane cytoplasmique est contrôlé par le produit du gène de la holine situé au niveau du module de lyse. Ainsi, pendant le cycle lytique du phage, les endolysines s'accumulent dans le cytoplasme. À un moment précis, les molécules de holines forment un pore dans la membrane qui ouvre l'accès au peptidoglycane. Les endolysines créées ensuite des lésions qui provoquent la lyse de la bactérie et libèrent les nouveaux virions (WANG *et al.*, 2003). Ce n'est que récemment que les endolysines ont été exploitées dans le but de traiter les infections étant donné l'augmentation de la résistance aux antibiotiques au sein de plusieurs espèces bactériennes. Plusieurs données indiquent que les endolysines fonctionnent sur des bactéries à Gram positif *in vitro* et *in vivo* comme sur les Streptocoques de groupe A (NELSON *et al.*, 2001). Or, lors du commencement du projet, aucun article sur les endolysines de *C. difficile* n'avait été publié. Ceci justifiait encore plus la nécessité d'étudier les endolysines comme outil thérapeutique afin de prévenir ou traiter les infections à *C. difficile*.

4.2 Le défi de travailler avec *C. difficile*

Un des facteurs qui rend *C. difficile* une bactérie délicate à manipuler est son caractère anaérobie strict qui lui confère une sensibilité extrême à l'oxygène. De ce fait, la mise au point des conditions pour avoir des contrôles stables lors des essais d'activité par la méthode de turbidité était essentielle. Les premiers essais ont été effectués en aérobiose étant donné la facilité de travailler hors de la chambre anaérobique. De même, tous les tests effectués dans la littérature ont été réalisés en aérobiose que ce soit avec des bactéries aérobies ou anaérobies (LOEFFLER *et al.*, 2001; SCHUCH *et al.*, 2002;

ZIMMER *et al.*, 2002; SASS et BIERBAUM, 2007). Par contre, mes essais ont par la suite été réalisés en anaérobiose étant donné que nous avons observé une autolyse des contrôles relativement élevée, de toute évidence due à un stress oxydatif. De plus, lors des premiers essais, le culot bactérien était lavé et resuspendu dans le tampon en utilisant le vortex. Malheureusement, l'introduction massive d'oxygène provoquait l'autolyse rapide des cellules. Par conséquent, ce procédé a été mis de côté en faveur d'une resuspension par pipetage en évitant l'introduction de bulles d'air, moyen qui a diminué l'autolyse de beaucoup mais pas totalement. Cette autolyse encore présente était expliquée par le fait que le tube Falcon était centrifugé et les cellules lavées deux fois avec du tampon préalablement dégazé, mais hors de la chambre anaérobique, en présence d'oxygène. Afin de limiter cette variation et de rendre les cellules plus stables, celles-ci sont dorénavant transvasées dans un tube Falcon à l'intérieur de la chambre anaérobique qui, fermé hermétiquement, est sorti pour centrifugation. Ce tube est par la suite directement entré dans la chambre anaérobique et le culot est resuspendu par pipetage dans le tampon PBS1X dégazé en absence complète d'oxygène. De cette manière, les cellules sont stables et l'autolyse est presque abolie.

4.3 L'endolysine PlyCD630-1

La première endolysine que nous avons clonée est celle d'un des deux prophages contenus dans la souche CD630, premier génome connu et dont la séquence est disponible sur la banque de données NCBI (numéro d'accèsion : AM180355) (SEBAIHIA *et al.*, 2006). Le fait que le prophage ϕ CD630-1 peut être induit de la souche

CD630 et est capable de lyser la bactérie à la fin du cycle lytique suggère que l'endolysine de ce phage, en conditions *in vivo* dans la bactérie, est fonctionnelle. Des essais d'activité lytique en aérobiose par turbidité ou en anaérobiose par courbe de survie ont été réalisés à l'aide de l'enzyme purifiée. Différents paramètres ont également été étudiés. Malgré toutes ces conditions, aucune lyse n'a été observée ce qui indiquait que la protéine était inactive. La coupure de l'étiquette et le clonage dans un autre plasmide n'avaient également pas résolu le manque d'activité de PlyCD630-1.

Pour qu'une protéine soit active, il faut que celle-ci soit dans une conformation native et ait le cofacteur dont elle a besoin. Les cofacteurs ajoutés lors des différents essais sont ceux les plus couramment utilisés dans la littérature, mais il se pourrait que PlyCD630-1 ait besoin d'une autre sorte de cofacteur pour être active, ou que la concentration des cofacteurs soit inadéquate. De plus, le groupe de Stepnaya a récemment découvert que la molarité d'un tampon peut grandement affecter l'activité d'une enzyme (MIKOULINSKAIA *et al.*, 2009). Ainsi, une gamme de molarité devrait être expérimentée dans le but de déceler de l'activité. Finalement, il se pourrait tout simplement que PlyD630-1 soit une enzyme inactive qui a besoin d'une protéine chaperonne pour l'épauler ou d'être en complexe avec la holine qui est reconnue pour former un pore dans la membrane et donne accès au peptidoglycane (LOESSNER *et al.*, 1998). Le fait qu'un autre groupe de recherche (MAYER *et al.*, 2008) ait également observé une absence d'activité avec cette enzyme renforce l'hypothèse que le problème se situe à un niveau qu'on ne soupçonne pas.

Des endolysines provenant de phages différents et infectant la même espèce bactérienne possèdent des séquences différentes. Cependant, il arrive également que les

séquences au niveau de leurs domaines soient similaires. Un alignement avec le programme ClustalW a permis de comparer les séquences de plusieurs endolysines connues et de choisir PlyCD52 et PlyCD38-2 comme enzymes à étudier. L'endolysine PlyCD52 est quasi identique à l'endolysine CD27L (à 6 acides aminés près) dont l'activité a été démontrée sur *C. difficile*, ce qui nous a amené à penser que cette enzyme possédait fort probablement une activité lytique (MAYER *et al.*, 2008). Les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2 diffèrent par leur domaine N-terminal. Ce domaine étant responsable de l'activité catalytique de l'enzyme, il se peut que l'impact des endolysines diffère en efficacité. Cette caractéristique reflète l'organisation modulaire de l'évolution des phages afin de contrer le mécanisme de défense des bactéries. En effet, on estime à environ 10^{31} le nombre de phages dans la biosphère. Or, même si ces phages se multiplient sous forme de clones identiques, chaque infection est une opportunité pour un échange génétique avec d'autres séquences de phages. Ceci étant dû au fait que la majorité des génomes bactériens portent des gènes de prophages avec lesquels un phage peut recombiner. (CANCHAYA *et al.*, 2003; CASJENS, 2003). À la lumière de ces informations, il est fort probable qu'il y ait eu recombinaison entre un domaine N-terminal d'un phage encore inconnu et un domaine C-terminal de l'endolysine du phage CD38-2 (qui a un domaine C-terminal similaire à CD52) pour former l'endolysine PlyCD52. Les manipulations génétiques ont donné de nouvelles ouvertures pour étudier la relation entre la structure moléculaire et la fonction biologique des protéines. Par exemple, il a été démontré que la construction d'une enzyme, en substituant le module de deux protéines qui partagent des similarités en acides aminés, provoque un changement de substrat et d'activité catalytique. (HOUGHTON *et al.*, 1989). De plus, cette idée est

appuyée par des essais effectués par le groupe de Diaz avec l'endolysine cpl-1 qui montre qu'il y a eu un échange de modules entre des enzymes lytiques de pneumocoques (DIAZ *et al.*, 1990; DIAZ *et al.*, 1991). Ce caractère modulaire pourrait être exploité pour de futures expériences.

4.4 Les endolysines PlyCD52 et PlyCD38-2

Les enzymes PlyCD52 et PlyCD38-2 ont donc été clonées et purifiées. La similarité de leur CBD et la différence de leur domaine catalytique en font de bons modèles.

Les essais d'activité lytique des endolysines ont pu débuter après confirmation que l'extrait cellulaire provenant d'une souche exprimant le vecteur pQE-80L vide n'influençait pas la lyse bactérienne. Malheureusement, les endolysines précipitent un jour après leur purification empêchant l'analyse de l'activité. En effet, plusieurs facteurs peuvent entraîner la précipitation des protéines.

4.4.1. Hypothèse pouvant expliquer la précipitation des endolysines

4.4.1.1. Point isoélectrique des protéines

Le point isoélectrique des protéines est un facteur primordial à prendre en considération lorsque l'on veut travailler avec celles-ci. En effet, si les protéines sont

électriquement chargées avec la même polarité, elles auront tendance à se repousser, donc à ne pas s'agréger. Au contraire, si les charges sont nulles dans un pH équivalent au pI, cette répulsion disparaît, et l'agrégation devient possible. (VOET et VOET, 2004). Le pI de PlyCD52 est de 8,9 et celui de PlyCD38-2 est de 8,76. Ainsi, plusieurs tampons comme le tampon PBS1X pH 8, PBS1X pH 7,5, des tampons Tris HCl 20 mM et 50 mM pH 9, et des tampons HEPES et MES à des pH de 6 et 7 ont été testés. Les pH utilisés sont éloignés du pI sauf pour le milieu Tris HCl pH9 et ces pH n'ont pas empêché la précipitation des protéines. Ainsi, dans notre cas, la précipitation des protéines n'est pas due à un problème de charge et par conséquent, ne provient pas du pH du milieu étant donné que plus une protéine est loin de son pI, plus elle est présumée soluble.

4.4.1.2. Hydrophobicité des protéines

Le caractère hydrophobe d'une protéine est essentiel pour la bonne conformation de la protéine. Un changement des conditions du milieu fait souvent perdre aux protéines leurs propriétés biologiques et physiques (VOET et VOET, 2004). Dans leur état natif les groupes latéraux des acides aminés leur permettent d'être solubles en milieu aqueux. En effet les chaînes latérales chargées sont dirigées vers l'extérieur de la molécule maximisant leur contact avec le milieu aqueux. Au contraire, les acides aminés possédant des chaînes latérales hydrophobes sont dissimulés à l'intérieur, minimisant ces contacts. La dénaturation brise cette organisation et ramène à la surface des groupements hydrophobes qui vont avoir tendance à s'agréger entre eux et avec les groupements hydrophobes des autres protéines dénaturées. Une température élevée ou une induction

trop violente provoque un mauvais repliement protéique et privilégie les interactions protéine-protéines (VOET et VOET, 2004). Ainsi, différentes concentrations d'inducteur, différents temps et températures d'induction ont été expérimentés afin de limiter la formation de précipité dans le temps. De plus, différentes dialyses ont été effectuées pendant 16 h à 4°C dans le but de changer tout en douceur les conditions dans lesquelles sont les protéines mais celles-ci n'ont pas empêché la précipitation. Ainsi, les conditions que nous avons testées ne permettent pas à la protéine d'être stable. Il faudrait donc tester d'autres conditions.

4.4.1.3. Interactions protéines et milieu

Comme mentionné ci-dessus, les interactions entre les protéines et le milieu sont très importantes pour leur bonne conformation. La solubilité d'une protéine dans une solution aqueuse est sensible à la force ionique du milieu. Les ions peuvent ainsi protéger les charges de la protéine et augmenter la solubilité de celle-ci. Si par contre la concentration en ion est trop élevée, les interactions entre ions vont devenir plus importantes et provoquer la précipitation des protéines (principes de « *salting-out* » (VOET et VOET, 2004). Par conséquent, différentes concentrations de NaCl allant de 150 mM à 500 mM ont été expérimentées afin de prévenir les interactions ioniques qu'il pourrait y avoir dans le milieu. À nouveau, les protéines précipitent peu importe la concentration en sel ajoutée. La concentration de sel étudiée n'est peut-être pas assez importante et pourrait être augmentée jusqu'à 1 M NaCl. Par contre, il faut faire attention de ne pas provoquer l'effet de « *salting out* » qui provoque la précipitation. L'agent

réducteur DTT a également été ajouté à tous les tampons d'élution pour diminuer les ponts disulfures des protéines, et ainsi prévenir la formation de ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires. Là encore, l'ajout de DTT n'a rien changé au final mis à part qu'en absence de DTT les protéines précipitent beaucoup plus rapidement. Le DTT n'est donc pas essentiel, mais permet quand même une stabilisation minimale alors que la protéine a sûrement déjà commencé à être mal repliée lors de l'extraction et la purification.

4.4.1.4. Interactions protéines-protéines

Du glycérol a été ajouté afin de stabiliser les interactions protéine-protéine. Le glycérol est connu pour stabiliser les protéines dans une conformation native plus compacte et d'inhiber l'agrégation des protéines pendant leur repliement (VAGENENDE *et al.*, 2009). Malheureusement, le glycérol s'est avéré incompatible avec des essais sur les cellules de *C. difficile* vivantes car, même en très faible concentration, il provoque leur autolyse. Ceci est probablement dû au fait que le glycérol renferme une grande quantité d'oxygène qui est néfaste pour les cellules. Étant donné que le but d'étudier les endolysines est de voir leur effet sur des cellules viables de manière à être utilisé comme alternatives aux antibiotiques, il était important que ces essais soient réalisés sur des cellules vivantes. Le glycérol ne peut ainsi pas être additionné aux endolysines qui vont servir aux essais d'activité lytique à moins d'être dégazé et maintenu sous atmosphère anaérobie. Nous pourrions éventuellement tenter d'effectuer des essais d'activité sur des

extraits de peptidoglycane purifié, mais cela nécessitera auparavant la mise au point d'un protocole de purification et d'extraction du peptidoglycane de *C. difficile*.

Les détergents sont généralement utilisés pour briser les interactions hydrophobes et dans notre cas dénaturerait partiellement les protéines, enlèveraient les interactions entre protéines et permettraient aux protéines de retourner dans leurs conformations natives. Le NP-40 ou le SDS à faible concentration et des détergents non ioniques comme le Tween-20 et le Triton X-100 ont été ajoutés aux milieux. Dans ce même but, une dialyse contre un solvant DMSO a été effectuée sans résultat convaincant. Or, si la protéine se replie mal, il serait possible de dénaturer entièrement la protéine avec des agents dénaturants tels que la guanidine, l'urée à 8 M et le SDS. Ensuite, celle-ci serait renaturée en douceur à l'aide de dialyses en baissant la concentration d'agent dénaturant jusqu'à l'élimination totale de celui-ci. Du β -mercaptoéthanol et de l'acide ascorbique pourraient également être mis dans la solution de protéine afin de prévenir les liaisons possibles entre les ponts disulfures (WINGFIELD *et al.*, 2001)

Le sucrose, qui peut stabiliser des protéines en créant une interaction avec l'eau qui va interagir avec les protéines, et du BSA, qui permettrait d'éviter à l'endolysine de former des interactions non voulues avec des surfaces solides et/ou l'interface et stabiliserait la protéine, ont été ajoutés sans donner de résultat positif (LEE et TIMASHEFF, 1981; WILLIAMS *et al.*, 1996). Finalement des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés de manière à limiter le clivage de la protéine par des protéases qui auraient pu être présentes dans le milieu. La précipitation des protéines a toujours lieu rendant l'ajout d'inhibiteur de protéase inefficace et donc, enlevant la possibilité que la précipitation soit due à des protéases.

Il existe d'autres moyens pour solubiliser et stabiliser les protéines. Par exemple, une fusion avec des protéines très solubles pourrait rendre nos protéines recombinantes plus solubles. Une des protéines souvent utilisée est la glutathione S-transférase ou GST qui, lorsque fusionnée à la protéine recombinante, permet de la protéger et de la stabiliser. De plus, il est reconnu que les protéines recombinantes fusionnées à la GST sont partiellement, voire totalement solubles (TERPE, 2003). Une seconde protéine communément utilisée pour augmenter la stabilité des protéines surexprimées est la *Maltose Binding Protein* ou MBP, et peut être fusionnée au niveau du N-terminal ou du C-terminal de la protéine, puis clivée à l'aide d'une protéase spécifique. Enfin, le domaine de liaison à la chitine (*chitin-binding domain*) pourrait être utilisé comme étiquette (TERPE, 2003). Donc la fusion de nos endolysines à des protéines plus grosses que le 6xHis et très solubles pourrait résoudre le problème. Par contre, il n'est pas dit que la présence d'une grosse protéine ne nuirait pas à l'activité de l'endolysine. Il faudrait tenter des fusions aux deux extrémités pour voir les impacts sur l'activité.

On pourrait également faire de la mutagenèse directement sur la protéine, certains résidus d'acide aminé pourraient être substitués afin de la rendre soluble et des fragments de protéines pourraient être enlevés comme par exemple le pont reliant les deux domaines ou encore certaines parties du domaine C-terminal (BRIERS *et al.*, 2007; SASS et BIERBAUM, 2007). Dans le même ordre d'idée, le domaine de liaison C-terminal pourrait être couplé à un domaine N-terminal connu pour être fonctionnel et soluble. Ceci pourrait fonctionner sauf si le domaine C-terminal est la partie non soluble de la protéine ou si les deux domaines sont incompatibles (DIAZ *et al.*, 1990; NELSON *et al.*, 2006).

En attendant de trouver un moyen de stabiliser les enzymes sans provoquer l'autolyse des contrôles, les essais d'activité ont été réalisés dans un laps de temps court après la purification.

4.4.2. Activité avec différentes concentrations de PlyCD52 et PlyCD38-2

Lorsqu'une enzyme agit, il existe une relation entre la vitesse d'une réaction catalysée par cette enzyme et sa concentration. Nous avons démontré que l'activité de PlyCD52 et PlyCD38-2 est dépendante de la quantité d'enzyme mise dans la réaction et que ces deux enzymes sont effectives contre les cellules de *C. difficile* à des degrés différents. En effet, PlyCD38-2 est deux fois plus active par rapport à PlyCD52, mais leurs activités ne sont pas aussi rapides et dévastatrices que d'autres endolysines. Un des exemples les plus spectaculaires est la lyse en 5 secondes seulement de 10^7 Streptocoques des groupes A et C provoquée par l'ajout de 10 ng d'endolysine PlyC1 (NELSON *et al.*, 2001).

L'endolysine PlyCD52 a été choisie pour sa similarité avec l'endolysine CD27L. L'endolysine CD27L a été exprimée chez *E. coli* et partiellement purifiée par colonne au nickel grâce à la fusion de l'endolysine avec une étiquette 6xHis en N-terminal. Les essais d'activité ont été réalisés en aérobiose avec 0,7 mg/ml de protéine sur des cellules de *C. difficile* préalablement congelées dans de l'azote liquide. Ainsi, ils ont noté que la stabilité des cellules était précaire étant donné leur autolyse graduelle. Ils ont ensuite observés une activité dose dépendante dans un tampon 20mM phosphate de sodium pH8 ou 50 mM Tris-HCl pH7,5, à différentes concentrations de NaCl allant jusqu'à 100 mM, à un pH

compris entre 4,5 et 8,3 et sur une trentaine d'isolats de *C. difficile*. Ils ont réussi à détecter une activité significative avec aussi peu que 7 ng/ml d'endolysine. Par ailleurs, des essais ont également été réalisés en anaérobiose avec 100 µg de CD27L et une baisse de seulement un log à partir de 10⁸ cellules a été observée au bout de 2 h. Lorsque les endolysines étaient ajoutées à moins de cellules, l'activité semblait légèrement plus forte. Ainsi, les résultats observés en anaérobioses par le groupe de Mayer sont similaires à ceux obtenus avec nos endolysines. Cependant, en aérobiose, Mayer n'observait pas d'autolyse des cellules contrôles et nous n'avons aucune explication pour cette observation.

4.4.2.1. Optimisation de l'activité de PlyCD52 et PlyCD38-2

L'activité des enzymes PlyCD52 et PlyCD38-2 est faible. On a tenté d'optimiser cette activité en se basant sur les propriétés biochimiques de l'enzyme en ajoutant des cofacteurs, changeant le pH du milieu réactionnel et essayé sur différents substrats. Nos essais montrent qu'aucune optimisation tentée n'a permis l'amélioration de l'activité de PlyCD52 et PlyCD38-2.

4.4.2.2. Optimisation à l'aide de cofacteurs

Certaines enzymes ont besoin de cofacteurs pour fonctionner ou améliorer leur activité lytique. Par exemple, l'endolysine AmpD de *Citrobacter freundii* a

nécessairement besoin de zinc pour fonctionner (GENEREUX *et al.*, 2004), d'autres comme la lysine Tuc2009 voit son activité augmenter de 3 fois lorsqu'il y a ajout de 10 mM CaCl₂ (SHEEHAN *et al.*, 1996). Le Tween-20 et 0,1% Triton X-100 ont amélioré l'activité de Ply700 et Ply500 (LOESSNER *et al.*, 1996). L'EDTA est un composé qui chélate les ions divalents tels que Mg²⁺, Ca²⁺ et Fe²⁺ (VOET et VOET, 2004). Dans nos essais, l'inhibition de l'activité par l'EDTA peut être dû au fait que celui-ci chélate un ion divalent nécessaire à l'activité des protéines, ion que nous n'avons de toute évidence pas essayé encore. Il serait donc intéressant, lors des prochains essais, de mettre une certaine quantité d'EDTA avec les endolysines afin d'éliminer toute trace de cofacteur endogène et d'ajouter des concentrations croissantes d'ions divalents, comme le MgCl₂, le MnCl₂ et le CaCl₂ de manière voir leur effet sur l'activité. Il faudrait aussi pouvoir tester d'autres ions tels que le zinc qui est un élément presque primordial à la vie, mais il faudrait utiliser du ZnCl₂ pour demeurer compatible avec le tampon phosphate. Enfin, il est possible d'utiliser un autre composé chélateur comme l'EGTA qui a plus d'affinité pour les ions calcium que magnésium.

4.4.2.3. Optimisation à l'aide du pH

Comme mentionné dans la section 1.5, le pH du tampon réactionnel influence grandement l'activité des enzymes de plusieurs manières tel que la liaison du substrat à l'enzyme, l'activité catalytique de l'enzyme, l'ionisation du milieu ou une variation dans la structure de l'enzyme (VOET et VOET, 2004). La plupart des endolysines sont connues pour fonctionner entre pH 5 et pH 7 (LOEFFLER *et al.*, 2003; YOONG *et al.*,

2004). De plus, chaque enzyme est unique comme le montre l'endolysine gp36 du phage ϕ KMV qui fonctionne à un pH de 6 (LAVIGNE *et al.*, 2004) alors que l'enzyme PlyPH fonctionne de manière équivalente de pH 5,5 à pH 9,5 (YOONG *et al.*, 2006). Dans notre cas les pH extrêmes provoquent la précipitation des endolysines au fur et à mesure de l'essai. Les enzymes peuvent parfois fonctionner de manière semblable à des pH voisins. Ainsi, le pH optimal de PlyCD38-2 et PlyCD52 semble situé entre pH 7 et 8,5. Comme mentionné ci-dessus, il sera nécessaire d'avoir une protéine qui ne précipite pas afin de pouvoir expérimenter une gamme de pH plus importante.

4.4.2.4. Effet de différents substrats

Finalement, les endolysines ont la particularité d'être spécifiques à l'espèce bactérienne sur laquelle elles agissent (LOEFFLER *et al.*, 2001; NELSON *et al.*, 2001). Afin de vérifier le spectre de lyse, PlyCD52 a été ajoutée à *E. coli*, et différentes souches de *C. difficile*. PlyCD52 agit sur différentes souches de *C. difficile* mais n'est pas active contre CD630 ni *E. coli*. Une hypothèse pour le manque d'activité sur CD630 est que la culture utilisée a été contaminée par une autre souche bactérienne. Après vérification faite, cette culture s'avère être une culture pure. Il faudrait tester plus d'espèces différentes afin de montrer la spécificité des endolysines avec une préparation de meilleure qualité. Il serait également très intéressant de comparer ce résultat avec l'enzyme PlyCD38-2, qui, par manque de temps, n'a pas encore été effectué.

4.5. Autres applications des endolysines

4.5.1. Extraction d'acides nucléiques

Grâce à leur capacité à lyser les bactéries *in vitro*, les endolysines pourraient également être utilisées comme outil de biologie moléculaire afin d'extraire les acides nucléiques de manière rapide et spécifique. En effet, il est particulièrement difficile d'extraire de façon rapide et efficace les acides nucléiques présents dans *C. difficile* étant donné la présence d'une paroi de peptidoglycane épaisse. Des trousse d'extraction adaptées aux bactéries à Gram positif sont commercialisées, mais aucune spécifique à *Clostridium* n'existe sur le marché. Or la quantité d'acides nucléiques obtenue de *C. difficile* avec ces trousse est généralement faible comparé à ce qu'on peut obtenir avec des bactéries à Gram négatif comme *E. coli* ou d'autres bactéries à Gram positif plus communes comme *B. subtilis*. Ainsi, les endolysines pourraient être utilisées dans des applications spécifiques pour *C. difficile*. Dans ce cas-ci, les endolysines peuvent être conservées dans 50% glycérol à -80°C, ce qui semble permettre de conserver l'intégrité et l'activité de l'enzyme selon nos observations. Or, les cellules n'ont pas besoin de rester vivantes contrairement à une expérience de viabilité, donc la présence de glycérol ne cause pas de problème.

Dans un premier temps, nous avons tenté l'extraction d'ARN. Le protocole pour extraire l'ARN de *C. difficile* est particulièrement long et la quantité d'ARN final est faible. Par conséquent, il est primordial de trouver une alternative à ce protocole. Nos

résultats montrent qu'il est possible d'extraire une grande quantité d'ARN en un laps de temps plus court avec l'endolysine PlyCD52 comparativement à l'utilisation du lysozyme, ou sans traitement de fragilisation de la paroi avant l'extraction au TRIzol. Dans ces expériences, la qualité de l'ARN n'a pas été vérifiée faute de temps. Par conséquent, la prochaine étape sera de vérifier l'intégrité des ARN par électrophorèse en conditions dénaturantes et aussi par l'utilisation du Bioanalyzer (Agilent Technologies). Cette expérience montre un potentiel pour l'utilisation des endolysines au laboratoire étant donné que, plus un protocole est rapide et précis, plus les acides nucléiques obtenus seront de bonne qualité. Il sera intéressant d'effectuer le même genre d'expérience mais pour l'extraction d'ADNg de *C. difficile*.

4.5 .2 Outil de diagnostic

Finalement, les endolysines pourraient être utilisées comme un outil de diagnostic rapide. En effet, le groupe de Loessner a démontré la reconnaissance spécifique des domaines de liaison CBD des endolysines Ply118 et Ply500 au peptidoglycane de *Listeria monocytogenes* (LOESSNER *et al.*, 2002). Ainsi, en fusionnant le CBD à la protéine GFP, il est possible de visualiser son attachement à l'aide d'un microscope à fluorescence. Ils ont également démontré qu'il est possible de détecter la bactérie cible parmi une variété d'espèces bactériennes. Aucun essai dans ce genre n'a encore été réalisé avec les endolysines de *C. difficile*. Malheureusement, le CBD que j'ai cloné contenait des mutations et nous n'avons donc pas cru bon de nous lancer dans la vérification de sa liaison aux cellules. Il est primordial de réussir le clonage du domaine C-terminal à la

protéine GFP dans un futur proche. En effet, la vérification de la liaison des CBD à la souche CD630 nous permettrait de nous orienter sur la cause de l'absence de lyse des endolysines sur cette souche. Si les endolysines ne se lient pas, le peptidoglycane a probablement une composition différente ou bien la capsule de cette souche est tellement épaisse qu'elle empêche leur liaison à celui-ci. Si par contre les endolysines se lient, c'est probablement au niveau du domaine N-terminal qu'il y a incompatibilité.

4.6 Obtention d'autres endolysines

Les buvardages de type Southern sont couramment utilisés pour comparer des profils d'ADN. Par exemple, des profils de phages de *C. difficile* ont été analysés et comparés par buvardage de type Southern (FORTIER et MOINEAU, 2007; GOH *et al.*, 2007). Puisque les endolysines proviennent d'ADNg de phages, il est possible d'hybrider une sonde d'endolysine marquée à la DIG sur un profil d'ADN complet. Les deux buvardages effectués montrent que les endolysines des phages ϕ MMP01 et ϕ MMP02 ont des similarités avec PlyCD52 et PlyCD38-2 étant donné que les deux sondes se sont liées efficacement. Les différentes enzymes de restriction utilisées permettront d'isoler un fragment contenant le gène de l'endolysine complet et permettront éventuellement le clonage de celui-ci dans un vecteur d'expression. Ceci permettra ensuite de séquencer le gène de l'endolysine et de faire des essais d'activité lytique. De cette façon, nous pourrions éventuellement découvrir de nouvelles endolysines stables et ayant une activité spécifique élevée.

4.7 Perspectives

Le problème majeur à régler avant de continuer sur l'analyse de l'activité est la stabilisation des enzymes. Il faut ainsi repartir sur une base de purification plus systématique en considérant davantage les caractéristiques de la protéine.

Une grande quantité d'endolysines pourrait être préparée et cette même préparation devrait être utilisée pour tous les essais afin qu'ils soient comparables. Évidemment, les protéines ne doivent pas précipiter et doivent être conservées à haute concentration dans du glycérol. Ceci permettrait de diluer suffisamment l'enzyme (et le glycérol) afin de ne pas interférer avec la stabilité des bactéries lors des essais. Ce glycérol pourrait aussi être préalablement dégazé étant donné qu'il emprisonne sûrement une grande quantité d'oxygène.

Comme mentionné dans la section 4.4.1.4, il faudrait également créer des fusions entre une protéine soluble et la protéine d'intérêt ou faire de la mutagenèse.

Une fois le problème de précipitation résolu, l'activité des enzymes pourrait être améliorée de façon plus fine par de la mutagenèse dirigée sur les domaines C-terminal et N-terminal.

La construction de chimères, la création de « nouvelles endolysines » en mutants des acides aminés présents au niveau du site actif ou de liaison au peptidoglycane, ou en enlevant des parties pourraient nous permettre d'améliorer l'activité. Le groupe de Gaeng a, par exemple, observé une augmentation de l'activité de l'endolysine Ply511 après troncature de celle-ci (GAENG *et al.*, 2000).

Même si les endolysines fonctionnent avec toutes sortes de souches de *C. difficile*, la création de cocktails d'endolysines ayant des activités différentes (type de liaison coupée) pourrait permettre de cibler les souches de *C. difficile* plus résistantes en restant le plus spécifiques possible. La synergie entre les deux endolysines pourrait augmenter considérablement l'activité. De plus, même si les endolysines fonctionnent avec toutes les souches d'une même espèce, celles-ci fonctionnent à des degrés différents. Le spectre d'action serait ainsi plus grand et la probabilité pour qu'une nouvelle souche, ou une souche plus tenace, de *C. difficile* puisse survivre serait diminuée. Par ailleurs, Loeffler et Fischetti ont montré que la combinaison des endolysines Pal et Cpl-1 clive de manière synergique le peptidoglycane de différentes souches de *Streptococcus pneumoniae* incluant des souches résistantes à la pénicilline, et seraient par conséquent plus efficace pour le traitement de ces souches (LOEFFLER et FISCHETTI, 2003). Les endolysines peuvent également agir en synergie avec les antibiotiques afin de réduire la concentration de l'antibiotique à utiliser, la durée du traitement et ainsi limiter la résistance à cet antibiotique. Le groupe de Fischetti a montré que l'enzyme Cpl-1 agit avec la pénicilline pour détruire une souche de *S. pneumoniae* extrêmement résistante à la pénicilline (DJURKOVIC *et al.*, 2005). En outre, le groupe de Donovan a montré que l'endolysine LysK peut agir synergiquement avec la bactériocine lysostaphine pour détruire le SARM (BECKER *et al.*, 2008).

Enfin, une variété d'autres endolysines devront être découvertes par analyse Southern de génomes de phages qui sont progressivement découverts par notre laboratoire. Ceci permettra éventuellement de trouver des endolysines plus performantes qui ne précipiteront pas.

4.8 Conclusion

Lorsqu'on désire purifier une protéine, il faut considérer plusieurs facteurs et considérer les caractéristiques de la protéine (pI, masse, structure secondaire, hydrophobicité, etc...). Malgré notre approche de purification plutôt empirique basée sur la littérature, nous avons pu tout de même démontrer l'activité de nos endolysines et étudier certaines de leurs propriétés. De plus, l'enzyme PlyCD52, étant similaire à l'endolysine CD27L caractérisée par le groupe de Mayer, nous indiquait que l'activité devait être semblable. L'activité de PlyCD52 et PlyCD38-2 est faible comparée aux endolysines caractérisées dans la littérature, mais est similaire à l'activité de CD27L. De plus, un problème de précipitation subsiste empêchant probablement les endolysines d'être pleinement actives. Tout ceci se joint à la difficulté de travailler avec une bactérie anaérobie telle que *Clostridium difficile*. Malgré plusieurs mises au point encore à faire, les endolysines de *C. difficile* ont un grand potentiel au niveau du laboratoire. En ce qui concerne leur potentiel pour traiter les ICD, il faut également trouver un moyen de protéger les endolysines, étant donné que l'intestin regorge de matière organique et de milliards de bactéries, afin d'éviter sa dégradation et assurer son bon fonctionnement.

ANNEXE 1 :

Liste des amorces utilisées et leurs caractéristiques

LCF-126	CTCGAG <u>CTCGAG</u> GATGAAAATAGGTATAAAATTGTGGAC XhoI	φCD630	gène PlyCD630 1-25	Sens
LCF-127	AAGCTTA <u>AAGCTT</u> CTACAATTTTCTTTTACAAAATTCTATAGC HindIII	φCD630	gène PlyCD630 787-816	Antisens
LCF-351	CAGCTAATGA <u>AAGCTT</u> ATGAAAATATGTATAACAGTAGGACAC HindIII	φCD52	PlyCD52 1-27	Sens
LCF-260	GCAGTCA <u>AAGCTT</u> CATTIATTTATAAACTCCAGTGCTTTATAAAG HindIII	φCD52	PlyCD52 781-832	Antisens
LCF-352	CAGCTAATGA <u>AAGCTT</u> AAATAAAATATAAATAATGAGGGAGTTAATGAG HindIII	φCD52	CBD-PlyCD52 523-556	Sens
LCF-253	GTACTGGGATCCATGAGAGTAGCACTAACAGCA BamHI	φCD38-2	Ply38-2 1-21	Sens
LCF-254	GCAGTCA <u>AAGCTT</u> CTATCTATCAATAAAATCTAGTGCCTTGTA HindIII	φCD38-2	Ply38-2 778-807	Antisens
LCF-191	CCCGAAAAGTGCCACCG	pQE80L	séquençage pQE Fwd	Sens
LCF-192	GTTCTGAGGTCATTACTGG	pQE80L	séquençage pQE Rev	Antisens
LCF-14	CGTCACACTTTGCTATGCCA	pBAD/His B	Séquençage pBAD/HisB	Sens
LCF-15	ATCAGACCGCTTCTGCGTT	pBAD/His B	Séquençage pBAD/HisB	Antisens
LCF-189	GCATTCCGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTT BamHI	pRS315- GFP	gène GFP 1-23	Sens
LCF-195	GCTAATTA <u>AAGCTT</u> TTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGT HindIII	pRS315- GFP	gène GFP 688-714	Antisens

Tableau 12: Amorces utilisées pour les différents clonages ou séquençages.

Ce tableau présente les diverses amorces employées lors des différents clonages dans les vecteurs pQE-80L ou pBAD/HisB. Les acides nucléiques soulignés représentent le site de restriction de l'amorce et son enzyme correspondante est indiquée en dessous. La direction montre si l'amorce est sens ou antisens. Après clonage, les amorces LCF-14, LCF-15, LCF191 et LCF-192 ont servi au séquençage des plasmides afin de vérifier l'intégrité des séquences en acides nucléiques.

ANNEXE 2:

Cartes des vecteurs utilisés et leurs caractéristiques pBAD/HisB et pQE-80L

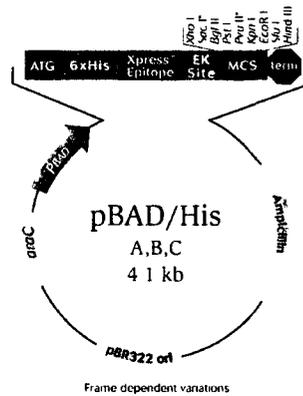


Figure 30: Carte du vecteur pBAD/HisB (Invitrogen)

P_{BAD} : Promoteur *araBAD*, *araC* : protéine régulatrice de P_{BAD}, **pBR322 ori** : origine de réplication pBR322, **Ampicillin** : gène de résistance à l'ampicilline, **ATG** : codon d'initiation, **6xHis** : séquence de l'étiquette 6xHis, **EK Site** : site de coupure de l'entérokinase, **MCS** : site de clonage multiple avec indication des sites de restriction, **term** : Codons stops

```

      O2 Region
1  AAGAAACCAA TTGTCCATAT TGCATCAGAC ATTGCCGTCA CTGGCTCTTT TACTGGCTCT

61  TCTCGCTAAC CAAACCGGTA ACCCCGCTTA TTAAAAGCAT TCTGTAACAA AGCGGGACCA

121 AAGCCATGAC AAAAACGGGT AACAAAAGTG TCTATAATCA CGGCAGAAAA GTCCACATTG
      CAP bind LCF-14 O forward
181 ATTATTGCA CGGCGTCACA CTTTGCTATG CCATAGCATT TTTATCCATA AGATTAGCGG
      O1 Region
      I2 and I1 Region
241 ATCCTACCTG ACGCTTTTTA TCGCAACTCT CTACTGTTTC TCCATACCCG TTTTTGGGC
      -35 -10
301 TAACAGGAGG AATTAACC ATG GGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT
      RBS Nco I Polyhistidine Region
      Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala
358 AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG
      Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Lys
      Xpress™ Epitope EK recognition site
      EK cleavage site ▲
412 GAT CCG AGC TCG AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATA TGG GAA TTC GAA GCT TGG
      Xho I Sac I Bgl III Pst I Pvu II Kpn I EcoR I Sfu I Hind III
      Asp Pro Ser Ser Arg Ser Ala Ala Gly Thr Ile Trp Glu Phe Glu Ala Trp
463 CTGTTTGG CCGGATGAGA GAAGATTTTC AGCCTGATAC AGATTAATC AGAACGCAGA
      pBAD reverse priming site
      LCF-15
521 AGCGGTCTGA TAAAACAGAA TTGCCTGGC GGCAGTAGCG CGGTGGTCCC ACCTGACCCC

581 ATGCCGAAC T CAGAAAGT GAA ACGCCGTAGC GCCGATGGTA GTGTGGGGTC TCCCATGCC
      rmb T1 and T2 transcriptional terminator
641 AGAGTAGGGA ACTGCCAGGC ATCAAATAAA ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT

701 TCGTTTTATC TGTTGTTTG
  
```

Figure 31: Séquence de la région promotrice du vecteur pBADHisB

Les séquences surlignées en jaune représentent le site des amorces LCF-14 et LCF-15 utilisées pour le séquençage des inserts.

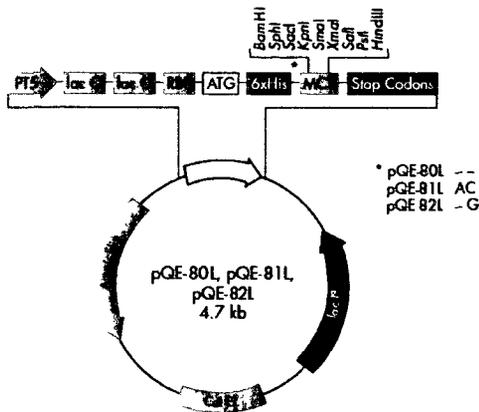


Figure 32: Carte du vecteur pQE-80L (QIAGEN)

PT5: promoteur T5, **lac O** : opérateur lac, **RBS** : site de fixation du ribosome, **ATG** : codon d'initiation, **6xHis** : séquence de l'étiquette 6xHis, **MCS** : site de clonage multiple avec indication des sites de restriction, **Stops codons** : Codons stops, **Col E1** : origine de réplication, **Ampicillin** : gène de résistance à l'ampicilline, **lacI^q** : gène du répresseur lacI^q

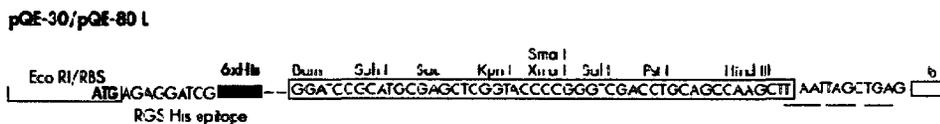


Figure 33: Séquence partielle du vecteur pQE-80L montrant le site de clonage multiple

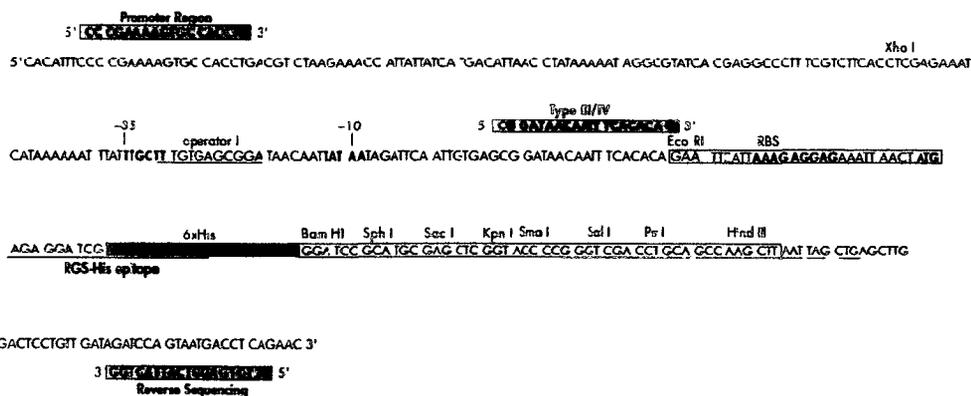


Figure 34: Séquence partielle de la région promotrice du vecteur pQE-80L montrant le site des amorces utilisées pour le séquençage

ANNEXE 3:

Composition des tampons et des milieux utilisés

Tampons généraux :

PBS1X :	150 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM KH ₂ PO ₄
Tampon TAE :	20 mM Tris-Acétate 50 mM EDTA pH 8
TE :	Tris 10 mM pH 8 EDTA 1 mM
Tampon PCR:	20 mM MgSO ₄ 200 mM Tris pH 8,8 100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% Triton-X 100 1mg/ml BSA
Tampon de ligation :	50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM ATP 10 mM DTT

Extraction des acides nucléiques

Tampon 1 :	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA
Tampon 2 :	200 mM NaOH 1 % SDS
Tampon 3 :	KoAc 3M pH 4.8
Tampon EtOH :	50% EtOH 0.1 M NaCl 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl pH 7.5

Tampon de lysozyme : 10 mM Tris HCl pH 8
1 mM EDTA pH 8
0,1 mM NaCl
5% Triton X-100

Tampon de conservation : PBS1X pH 7,5
500 mM NaCl
250 mM imidazole
1 mM DTT
1% Tween-20
50% glycérol

SDS-PAGE

Tampon SLB 2X : 0.5 M Tris pH 6,8
v/v glycérol
p/v SDS
v/v β -mercaptoéthanol
p/v bleu de bromophénol

Solution de coloration au bleu de Coomassie : 50% v/v méthanol
7% v/v acide acétique
0,2% p/v bleu de Coomassie

Solution de décoloration : 50% v/v méthanol
v/v acide acétique

Solubilité

Tampon de lyse non dénaturant : 50 mM NaH_2PO_4 pH 8
300 mM NaCl
10 mM Imidazole

Induction

Tampon de lyse : PBS1X pH 7,5
500 mM NaCl
10 mM Imidazole

Purification :

Solutions de lavage # 1 : PBS1X pH 7,5
500 mM NaCl
20 mM Imidazole

Solutions de lavage # 2 : PBS1X pH 7,5
500 mM NaCl
40 mM Imidazole

Tampon d'élution : PBS1X pH 7,5
500 mM NaCl
250 mM Imidazole

Milieu réactionnel :

Tampon A : PBS1X pH 7,5
500 mM NaCl
250 mM Imidazole
1 mM DTT
1% Tween-20

Tampon B : PBS1X pH 8
500 mM NaCl

Buvarbage de type Southern :

Solution de dépurination :	0,25M HCl
Solution de dénaturation :	1,5 M NaCl 0,5 N NaOH
Solution de neutralisation (1L):	175,32 g NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
20X SSC :	300 mM citrate de sodium pH 7,0 3M NaCl
Solution de lavage 1:	SSC 2X 0,1% SDS
Solution de lavage 2:	0,5X SSC 20X 0,1% SDS 10%
Tampon acide maléique 10X :	1 M acide maléique 1,5M NaCl pH7,5
Tampon de lavage 3 :	tampon acide maléique 10X 0,3% v/v Tween 20
Solution de blocage 10X:	dissoudre le bloking reagent (poudre) dans l'acide maléique 1X à une concentration de 10% (w/v)
Solution de blocage:	diluer blocking reagent 10X 1:10 dans le tampon acide maléique 1X;
Tampon de détection :	100mM Tris-HCl pH 9,5 100mM NaCl

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Louis-Charles Fortier, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de perfectionner mes connaissances scientifiques. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur support moral et leurs encouragements constants malgré la distance qui nous sépare. Je voudrais aussi remercier les membres de mon laboratoire pour la bonne ambiance et les moments inoubliables passés ensemble pendant ces 2 ans de maîtrise, ainsi que les membres du département, pour les discussions constructives. Enfin, je remercie Mme Catherine Desrosiers pour ses conseils, ses connaissances et son temps dans l'élaboration de la purification de mes enzymes. Finalement, je remercie le Dr Sherif Abou Elela et le Dr Éric Massé d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

RÉFÉRENCES:

- Ackermann, G., Y. J. Tang, et al. (2001). "Resistance to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in gyrA." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2348-2353.
- Akerlund, T., B. Svenungsson, et al. (2006). "Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates." J Clin Microbiol **44**(2): 353-358.
- Alekshun, M. N. and S. B. Levy (2007). "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." Cell **128**(6): 1037-1050.
- Altschul S.F., Gish W., et al. (1990). "Basic local alignment search tool. ." J Mol Biol(215): 403-410
- Aslam, S., R. J. Hamill, et al. (2005). "Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies." Lancet Infect Dis **5**(9): 549-557.
- Baines, S. D., J. Freeman, et al. (2009). "Tolvamer is not efficacious in the neutralization of cytotoxin in a human gut model of *Clostridium difficile* infection." Antimicrob Agents Chemother **53**(5): 2202-2204.
- Baker-Austin, C., M. S. Wright, et al. (2006). "Co-selection of antibiotic and metal resistance." Trends Microbiol **14**(4): 176-182.
- Bakken, J. S. (2009). "Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection." Anaerobe **15**(6): 285-289.
- Barbut, F., V. Lalande, et al. (2002). "Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France." J Clin Microbiol **40**(6): 2079-2083.

- Bartlett, J. G. (1994). "*Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism." Clin Infect Dis **18 Suppl 4**: S265-272.
- Beales, I. L. (2002). "Intravenous immunoglobulin for recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea." Gut **51**(3): 456.
- Becker, S. C., J. Foster-Frey, et al. (2008). "The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA." FEMS Microbiol Lett **287**(2): 185-191.
- Bentley, R. and J. W. Bennett (2003). "What is an antibiotic? Revisited." Adv Appl Microbiol **52**: 303-331.
- Bidet, P., F. Barbut, et al. (1999). "Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing." FEMS Microbiol Lett **175**(2): 261-266.
- Bignardi, G. E. (1998). "Risk factors for *Clostridium difficile* infection." J Hosp Infect **40**(1): 1-15.
- Bignardi, G. E. and C. Settle (2008). "Different ribotypes in community-acquired *Clostridium difficile*." J Hosp Infect **70**(1): 96-98.
- Bonfield, J. K. and R. Staden (1995). "The application of numerical estimates of base calling accuracy to DNA sequencing projects." Nucleic Acids Res **23**(8): 1406-1410.
- Bongaerts, G. P. and D. M. Lyerly (1994). "Role of toxins A and B in the pathogenesis of *Clostridium difficile* disease." Microb Pathog **17**(1): 1-12.
- Borgmann, S., M. Kist, et al. (2008). "Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany." Euro Surveill **13**(49).
- Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska, et al. (2006). "Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents." Exp Biol Med (Maywood) **231**(4): 366-377.

- Briers, Y., G. Volckaert, et al. (2007). "Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL." Mol Microbiol **65**(5): 1334-1344.
- Canchaya, C., C. Proux, et al. (2003). "Prophage genomics." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 238-276, table of contents.
- Carle, S. (2009). "Le parrainage des antimicrobiens : vision 2010." Pharmactuel **42**(supplément 2).
- Casjens, S. (2003). "Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?" Mol Microbiol **49**(2): 277-300.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (2008). "Data & Statistics about *Clostridium difficile* Infections."
- Celia, L. K., D. Nelson, et al. (2008). "Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*." Vet Microbiol **130**(1-2): 107-117.
- Cheng, Q., D. Nelson, et al. (2005). "Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 111-117.
- Cowen, L. E. (2008). "The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype." Nat Rev Microbiol **6**(3): 187-198.
- Curry, S. R., J. W. Marsh, et al. (2007). "tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*." J Clin Microbiol **45**(1): 215-221.
- Dhalluin, A., I. Bourgeois, et al. (2005). "Acd, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with N-acetylglucosaminidase activity." Microbiology **151**(Pt 7): 2343-2351.
- Diaz, E., R. Lopez, et al. (1990). "Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 8125-8129.
- Diaz, E., R. Lopez, et al. (1991). "Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits." J Biol Chem **266**(9): 5464-5471.

- Dixson, S., W. Brumfitt, et al. (1985). "In vitro activity of six antibiotics against multiresistant staphylococci and other gram-positive cocci." Eur J Clin Microbiol **4**(1): 19-23.
- Djurkovic, S., J. M. Loeffler, et al. (2005). "Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1225-1228.
- Donovan, D. M., S. Dong, et al. (2006). "Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2988-2996.
- Dupuy, B., R. Govind, et al. (2008). "*Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC." J Med Microbiol **57**(Pt 6): 685-689.
- ECDC, A. R. a. H.-A. I. P. (2009). Antibiotic resistance in Europe: the challenges ahead. Euro Surveill. **14**: 19405.
- Einhauer, A. and A. Jungbauer (2001). "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins." J Biochem Biophys Methods **49**(1-3): 455-465.
- Fekety, R. and A. B. Shah (1993). "Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis." JAMA **269**(1): 71-75.
- Fischetti, V. A. (2003). "Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes." Ann N Y Acad Sci **987**: 207-214.
- Fischetti, V. A. (2005). "Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives." Trends Microbiol **13**(10): 491-496.
- Fischetti, V. A. (2008). "Bacteriophage lysins as effective antibacterials." Curr Opin Microbiol **11**(5): 393-400.
- Fortier, L. C. and S. Moineau (2007). "Morphological and genetic diversity of temperate phages in *Clostridium difficile*." Appl Environ Microbiol **73**(22): 7358-7366.
- Gaberc-Porekar, V. and V. Menart (2001). "Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography." J Biochem Biophys Methods **49**(1-3): 335-360.

- Gaeng, S., S. Scherer, et al. (2000). "Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*." Appl Environ Microbiol **66**(7): 2951-2958.
- Garcia, P., J. L. Garcia, et al. (1990). "Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages." Gene **86**(1): 81-88.
- Gardiner, D. F., T. Rosenberg, et al. (2009). "A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A." Vaccine **27**(27): 3598-3604.
- Genereux, C., D. Dehareng, et al. (2004). "Mutational analysis of the catalytic centre of the *Citrobacter freundii* AmpD N-acetylmuramyl-L-alanine amidase." Biochem J **377**(Pt 1): 111-120.
- George, R. H., J. M. Symonds, et al. (1978). "Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis." Br Med J **1**(6114): 695.
- Gerding, D. N. (2000). "Treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis." Curr Top Microbiol Immunol **250**: 127-139.
- Gerding, D. N. (2004). "Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem." Clin Infect Dis **38**(5): 646-648.
- Gerding, D. N., C. A. Muto, et al. (2008). "Treatment of *Clostridium difficile* infection." Clin Infect Dis **46 Suppl 1**: S32-42.
- Geric, B., M. Rupnik, et al. (2004). "Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital." J Med Microbiol **53**(Pt 9): 887-894.
- Goh, S., P. F. Ong, et al. (2007). "The complete genome sequence of *Clostridium difficile* phage phiC2 and comparisons to phiCD119 and inducible prophages of CD630." Microbiology **153**(Pt 3): 676-685.

- Goldstein, E. J., D. M. Citron, et al. (2010). "Bactericidal activity of telavancin, vancomycin and metronidazole against *Clostridium difficile*." *Anaerobe*.
- Goldstein, F. W. and J. Garau (1997). "30 years of penicillin-resistant *S pneumoniae*: myth or reality?" *Lancet* **350**(9073): 233-234.
- Goncalves, C., D. Decre, et al. (2004). "Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*." *J Clin Microbiol* **42**(5): 1933-1939.
- Goorhuis, A., D. Bakker, et al. (2008). "Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078." *Clin Infect Dis* **47**(9): 1162-1170.
- Goossens, H., M. Ferech, et al. (2005). "Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study." *Lancet* **365**(9459): 579-587.
- Guzman, L. M., D. Belin, et al. (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J Bacteriol* **177**(14): 4121-4130.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids. Symp. Ser.*(41): 95-98.
- Hermoso, J. A., J. L. Garcia, et al. (2007). "Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics." *Curr Opin Microbiol* **10**(5): 461-472.
- Hermoso, J. A., B. Monterroso, et al. (2003). "Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1." *Structure* **11**(10): 1239-1249.
- Hinkson, P. L., C. Dinardo, et al. (2008). "Tolvamer, an anionic polymer, neutralizes toxins produced by the BI/027 strains of *Clostridium difficile*." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(6): 2190-2195.
- Houghton, J. E., G. A. O'Donovan, et al. (1989). "Reconstruction of an enzyme by domain substitution effectively switches substrate specificity." *Nature* **338**(6211): 172-174.

- Huang, H., A. Weintraub, et al. (2009). "Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*." Int J Antimicrob Agents **34**(6): 516-522.
- Hyde, T. B., K. Gay, et al. (2001). "Macrolide resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates." JAMA **286**(15): 1857-1862.
- Jado, I., R. Lopez, et al. (2003). "Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model." J Antimicrob Chemother **52**(6): 967-973.
- Johnson, S., M. H. Samore, et al. (1999). "Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals." N Engl J Med **341**(22): 1645-1651.
- Johnson, S., C. Schrieffer, et al. (2009). "Rifaximin Redux: treatment of recurrent *Clostridium difficile* infections with rifaximin immediately post-vancomycin treatment." Anaerobe **15**(6): 290-291.
- Jorup-Ronstrom, C., A. Hakanson, et al. (2006). "[Feces culture successful therapy in *Clostridium difficile* diarrhea]." Lakartidningen **103**(46): 3603-3605.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Kelly, C. P., C. Pothoulakis, et al. (1994). "*Clostridium difficile* colitis." N Engl J Med **330**(4): 257-262.
- Kirby, W. M. (1944). "Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci." Science **99**(2579): 452-453.
- Kramer, A., I. Schwebke, et al. (2006). "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review." BMC Infect Dis **6**: 130.
- Kretzer, J. W., R. Lehmann, et al. (2007). "Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells." Appl Environ Microbiol **73**(6): 1992-2000.

- Kuijper, E. J., F. Barbut, et al. (2008). "Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008." Euro Surveill **13**(31).
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Larson, E. (2007). "Community factors in the development of antibiotic resistance." Annu Rev Public Health **28**: 435-447.
- Lavigne, R., Y. Briers, et al. (2004). "Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme." Cell Mol Life Sci **61**(21): 2753-2759.
- Lee, J. C. and S. N. Timasheff (1981). "The stabilization of proteins by sucrose." J Biol Chem **256**(14): 7193-7201.
- Levy, S. B. (1994). "Balancing the drug-resistance equation." Trends Microbiol **2**(10): 341-342.
- Lewin, B., Ed. (1998). Gènes VI.
- Loeffler, J. M., S. Djurkovic, et al. (2003). "Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia." Infect Immun **71**(11): 6199-6204.
- Loeffler, J. M. and V. A. Fischetti (2003). "Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 375-377.
- Loeffler, J. M., D. Nelson, et al. (2001). "Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase." Science **294**(5549): 2170-2172.
- Loessner, M. J. (2005). "Bacteriophage endolysins--current state of research and applications." Curr Opin Microbiol **8**(4): 480-487.
- Loessner, M. J., S. Gaeng, et al. (1998). "The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin." FEMS Microbiol Lett **162**(2): 265-274.

- Loessner, M. J., K. Kramer, et al. (2002). "C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates." Mol Microbiol **44**(2): 335-349.
- Loessner, M. J., A. Schneider, et al. (1996). "Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (ply) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins." Appl Environ Microbiol **62**(8): 3057-3060.
- Lopez, R., E. Garcia, et al. (1997). "The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?" Microb Drug Resist **3**(2): 199-211.
- Lopez, R., J. L. Garcia, et al. (1992). "Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage." FEMS Microbiol Lett **79**(1-3): 439-447.
- Louie, T. J., J. Peppe, et al. (2006). "Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea." Clin Infect Dis **43**(4): 411-420.
- Low, L. Y., C. Yang, et al. (2005). "Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin." J Biol Chem **280**(42): 35433-35439.
- Lowy, I., D. C. Molrine, et al. (2010). "Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins." N Engl J Med **362**(3): 197-205.
- Lund-Tonnesen, S., A. Berstad, et al. (1998). "[*Clostridium difficile*-associated diarrhea treated with homologous feces]." Tidsskr Nor Laegeforen **118**(7): 1027-1030.
- Lyerly, D. M., E. F. Bostwick, et al. (1991). "Passive immunization of hamsters against disease caused by *Clostridium difficile* by use of bovine immunoglobulin G concentrate." Infect Immun **59**(6): 2215-2218.
- Matamouros, S., P. England, et al. (2007). "*Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC." Mol Microbiol **64**(5): 1274-1288.

- Matsuzaki, S., M. Rashel, et al. (2005). "Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases." J Infect Chemother **11**(5): 211-219.
- Mayer, M. J., A. Narbad, et al. (2008). "Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin." J Bacteriol **190**(20): 6734-6740.
- McCullers, J. A., A. Karlstrom, et al. (2007). "Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*." PLoS Pathog **3**(3): e28.
- McDonald, L. C., G. E. Killgore, et al. (2005). "An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*." N Engl J Med **353**(23): 2433-2441.
- McFarland, L. V. (2005). "Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works?" J Med Microbiol **54**(Pt 2): 101-111.
- McPherson, S., C. J. Rees, et al. (2006). "Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhea." Dis Colon Rectum **49**(5): 640-645.
- Mikoulinskaia, G. V., I. V. Odinkova, et al. (2009). "Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5." FEBS J **276**(24): 7329-7342.
- Miller, M. (2008). "A probiotic drink prevented diarrhoea and *Clostridium difficile* infection in older patients taking antibiotics." Evid Based Med **13**(2): 46.
- Mulhbach, J., E. Brouillette, et al. (2010). "Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways." PLoS Pathog **6**(4): e1000865.
- Mylonakis, E., E. T. Ryan, et al. (2001). "*Clostridium difficile*--Associated diarrhea: A review." Arch Intern Med **161**(4): 525-533.
- Nallamsetty, S. and D. S. Waugh (2006). "Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners." Protein Expr Purif **45**(1): 175-182.

- Navarre, W. W., H. Ton-That, et al. (1999). "Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity." J Biol Chem **274**(22): 15847-15856.
- Nelson, D., L. Loomis, et al. (2001). "Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4107-4112.
- Nelson, D., R. Schuch, et al. (2006). "PlyC: a multimeric bacteriophage lysin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10765-10770.
- Nieuwdorp, M., E. van Nood, et al. (2008). "[Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea with a suspension of donor faeces]." Ned Tijdschr Geneesk **152**(35): 1927-1932.
- Nikaido, H. (1994). "Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux." Science **264**(5157): 382-388.
- Numan, S. C., P. Veldkamp, et al. (2007). "*Clostridium difficile*-associated diarrhoea: bovine anti-*Clostridium difficile* whey protein to help aid the prevention of relapses." Gut **56**(6): 888-889.
- O'Connor, J. R., S. Johnson, et al. (2009). "*Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain." Gastroenterology **136**(6): 1913-1924.
- O'Flaherty, S., R. P. Ross, et al. (2009). "Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria." FEMS Microbiol Rev **33**(4): 801-819.
- Okuma, K., K. Iwakawa, et al. (2002). "Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community." J Clin Microbiol **40**(11): 4289-4294.
- Ott, E., J. Stolz, et al. (2009). "The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*." RNA Biol **6**(3): 276-280.

- Pepin, J., N. Saheb, et al. (2005). "Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec." Clin Infect Dis **41**(9): 1254-1260.
- Pochapin, M. (2000). "The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea." Am J Gastroenterol **95**(1 Suppl): S11-13.
- Poutanen, S. M. and A. E. Simor (2004). "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults." CMAJ **171**(1): 51-58.
- Poxton, I. R., J. McCoubrey, et al. (2001). "The pathogenicity of *Clostridium difficile*." Clin Microbiol Infect **7**(8): 421-427.
- Pritchard, D. G., S. Dong, et al. (2007). "LambdaSa1 and LambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*." Appl Environ Microbiol **73**(22): 7150-7154.
- Razavi, B., A. Apisarnthanarak, et al. (2007). "*Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance." Infection **35**(5): 300-307.
- Rigden, D. J., M. J. Jedrzejas, et al. (2003). "Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of gamma-D,L-glutamate-specific amidohydrolases." Trends Biochem Sci **28**(5): 230-234.
- Rupnik, M., A. Widmer, et al. (2008). "*Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans." J Clin Microbiol **46**(6): 2146.
- Rupnik, M., M. H. Wilcox, et al. (2009). "*Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis." Nat Rev Microbiol **7**(7): 526-536.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press Retrieved Cold Spring Harbor, NY., 3rd ed.
- Sass, P. and G. Bierbaum (2007). "Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*." Appl Environ Microbiol **73**(1): 347-352.

- Schatz, P. J. (1993). "Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*." Biotechnology (N Y) **11**(10): 1138-1143.
- Schuch, R., D. Nelson, et al. (2002). "A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*." Nature **418**(6900): 884-889.
- Schwan, C., B. Stecher, et al. (2009). "*Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria." PLoS Pathog **5**(10): e1000626.
- Sebahia, M., B. W. Wren, et al. (2006). "The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome." Nat Genet **38**(7): 779-786.
- Seddon, S. V., I. Hemingway, et al. (1990). "Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model." J Med Microbiol **31**(3): 169-174.
- Sheehan, M. M., J. L. Garcia, et al. (1996). "Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling." FEMS Microbiol Lett **140**(1): 23-28.
- Shim, J. K., S. Johnson, et al. (1998). "Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea." Lancet **351**(9103): 633-636.
- Silverman, M. S., I. Davis, et al. (2010). "Success of self-administered home fecal transplantation for chronic *Clostridium difficile* infection." Clin Gastroenterol Hepatol.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-517.
- Steffee, C. H. (1992). "Alexander Fleming and penicillin. The chance of a lifetime?" N C Med J **53**(6): 308-310.
- Sullivan, K. M. and L. M. Spooner (2010). "Fidaxomicin: A Macrocyclic Antibiotic for the Management of *Clostridium difficile* Infection." Ann Pharmacother **44**(2): 352-359.

- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **60**(5): 523-533.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. (2002). "Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 2**: Unit 2 3.
- Tung, J. M., L. R. Dolovich, et al. (2009). "Prevention of *Clostridium difficile* infection with *Saccharomyces boulardii*: a systematic review." Can J Gastroenterol **23**(12): 817-821.
- Turner, M. S., F. Waldherr, et al. (2007). "Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria." Syst Appl Microbiol **30**(1): 58-67.
- Vagenende, V., M. G. Yap, et al. (2009). "Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol." Biochemistry **48**(46): 11084-11096.
- Vaillancourt, P., C. F. Zheng, et al. (2000). "Affinity purification of recombinant proteins fused to calmodulin or to calmodulin-binding peptides." Methods Enzymol **326**: 340-362.
- van Nood, E., P. Speelman, et al. (2009). "Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: is donor faeces the solution?" Euro Surveill **14**(34).
- van Veen, H. W. and W. N. Konings (1997). "Drug efflux proteins in multidrug resistant bacteria." Biol Chem **378**(8): 769-777.
- Vettoretti, L., N. Floret, et al. (2009). "Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**(10): 1217-1222.
- Viscidi, R., B. E. Laughon, et al. (1983). "Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*." J Infect Dis **148**(1): 93-100.
- Voet, D. and J. G. Voet, Eds. (2004). Biochemistry. Hoboken.
- Voss, S. and A. Skerra (1997). "Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification." Protein Eng **10**(8): 975-982.

- Waligora, A. J., C. Hennequin, et al. (2001). "Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties." Infect Immun **69**(4): 2144-2153.
- Wang, I. N., J. Deaton, et al. (2003). "Sizing the holin lesion with an endolysin-beta-galactosidase fusion." J Bacteriol **185**(3): 779-787.
- Warny, M., J. Pepin, et al. (2005). "Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe." Lancet **366**(9491): 1079-1084.
- Weiss, K., M. Laverdiere, et al. (1999). "Group A Streptococcus carriage among close contacts of patients with invasive infections." Am J Epidemiol **149**(9): 863-868.
- Wiener, J., J. P. Quinn, et al. (1999). "Multiple antibiotic-resistant Klebsiella and Escherichia coli in nursing homes." JAMA **281**(6): 517-523.
- Wilcox, M. H. (2004). "Descriptive study of intravenous immunoglobulin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea." J Antimicrob Chemother **53**(5): 882-884.
- Williams, R., M. Kline, et al. (1996). "BSA and Restriction Enzyme Digestions." Promega Notes Magazine **59**: 6.
- Wilson, K. H. (1993). "The microecology of *Clostridium difficile*." Clin Infect Dis **16 Suppl 4**: S214-218.
- Wilson, K. H., J. N. Sheagren, et al. (1985). "Population dynamics of ingested *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract of the Syrian hamster." J Infect Dis **151**(2): 355-361.
- Wingfield, P. T., I. Palmer, et al. (2001). "Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from Escherichia coli." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 6**: Unit 6 5.
- Witte, W. (2004). "International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens." Infect Genet Evol **4**(3): 187-191.
- Yangco, B. G., G. Sher, et al. (2009). "Nitazoxanide and probiotics for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection in a peritoneal dialysis patient." South Med J **102**(7): 746-747.

- Yoong, P., R. Schuch, et al. (2004). "Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*." J Bacteriol **186**(14): 4808-4812.
- Yoong, P., R. Schuch, et al. (2006). "PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*." J Bacteriol **188**(7): 2711-2714.
- Zaiss, N. H., W. Witte, et al. (2010). "Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany." Emerg Infect Dis **16**(4): 675-677.
- Zimmer, M., N. Vukov, et al. (2002). "The murein hydrolase of the bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains." Appl Environ Microbiol **68**(11): 5311-5317.