



HAL
open science

Caractérisation de la Lugdulysine, une zinc métallopeptidase et facteur de virulence synthétisé par *Staphylococcus lugdunensis*

Kévin Prola

► **To cite this version:**

Kévin Prola. Caractérisation de la Lugdulysine, une zinc métallopeptidase et facteur de virulence synthétisé par *Staphylococcus lugdunensis*. Santé. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ103 . tel-04006668

HAL Id: tel-04006668

<https://theses.hal.science/tel-04006668>

Submitted on 27 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

UR7290 - Virulence Bactérienne Précoce

THÈSE présentée par :

Kévin PROLA

soutenue le : **17 Mai 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Science du Vivant

Spécialités : Biologie moléculaire, Biochimie, Microbiologie

**Caractérisation de la Lugdulysine, une zinc
métallopeptidase et facteur de virulence
synthétisé par *Staphylococcus lugdunensis***

THÈSE dirigée par :

Dr. PREVOST Gilles

MCUPH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. POPOFF Michel-Robert

Directeur de Recherches, Institut Pasteur, Paris

Dr. PESTEL-CARON Martine

PUPH, Université de Rouen Normandie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Prof. KELLENBERGER Esther

Professeure, Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Kevin Prola

**Virulence Bactérienne Précoce : fonctions cellulaires et contrôle de l'infection aiguë et
subaiguë - UR7290**

Institut de bactériologie

3 Rue Koeberlé

67200 Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, le Dr. Michel-Robert Popoff, la PUPH Martine Pestel-Caron et la Pr. Esther Kellenberger pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. C'est avec grand plaisir que je vous présente mes travaux.

Je remercie également le Dr. Gilles Prevost pour m'avoir accueilli (et supporté !) depuis le Master à l'Institut de Bactériologie de Strasbourg et plus particulièrement dans le groupe « Staphylocoques » de l'équipe UR7290 « Virulence Bactérienne Précoce ». Un grand merci pour m'avoir encadré dans les bons comme les mauvais moments.

Je remercie également de tout mon cœur Daniel Keller, pour sa patience à toute épreuve, ses conseils et toutes nos discussions scientifiques, politiques, et historiques. Tu as su transmettre ton savoir avec passion et j'espère pouvoir faire aussi bien que toi un jour.

Un grand merci également à Viola pour ces très bons moments passés ensemble. Il aura fallu du temps mais tu es devenue bien plus qu'une simple collègue de laboratoire ! Je souhaite également remercier Elodie pour ses excellents conseils et son aide pour les manipulations des biofilms. J'ai également une petite pensée pour tous les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer, avec une mention spéciale pour Matthieu, avec qui le temps passe bien plus vite au labo !

Plus généralement, je remercie toute l'équipe de l'Institut de Bactériologie, et plus particulièrement le Dr. Xavier Argémi qui est à l'origine de ce projet. Tu as transmis le flambeau avec brio et j'ai eu grand plaisir à travailler quelques temps à tes côtés.

Enfin, un immense merci à mes amis et toute la famille, des plus jeunes aux plus anciens ! Vous avez tous contribué à la conception de cette thèse par votre soutien sans faille. Une douce pensée également à toute la famille Bonneau, nos week-ends en Bourgogne avec vous m'ont permis de garder le cap ces dernières années.

Pour finir, est ce que cette thèse aurait vu le jour sans toi, ma petite Anne ? Nous nous sommes soutenus depuis les débuts et tout au long de cette épreuve. Je n'oublierai jamais ce que nous avons traversé et je suis fier d'avoir accompli cela à tes côtés !

I think it's time to blow this scene
Get everybody and the stuff together

Ok, three, two, one, let's jam !

"The Seatbelts"

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Liste des abréviations	11
Synthèse bibliographique	13
Généralités sur le genre <i>Staphylococcus</i>	15
1) La théorie dualiste à l'origine des Staphylocoques	15
2) Identification des Staphylocoques, d'hier à aujourd'hui.....	17
3) Taxonomie finale de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	26
Les infections cliniques à <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	27
1) Localisation et habitat de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	28
2) Manifestations cliniques des infections à <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	29
3) Conclusion	35
Facteurs de virulence synthétisés par <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	36
1) Facteurs d'adhésion	37
2) Peptides cytolytiques / Hémolysines.....	41
3) Compétition pour le fer	41
4) Production de biofilm	44
5) Autres facteurs de virulence.....	48
6) Conclusion et mise en contexte de la thèse.....	53
La place des métallopeptidases bactériennes en tant que facteurs de virulence ...	55
1) Les peptidases, quelques points de nomenclature et de classification	56
2) Les métallopeptidases, caractéristiques générales et classification	58
Objectifs de la thèse	77
Matériels et Méthodes	79
Milieux de culture et conditions de culture.....	81
Protocoles généraux	82
1) Manipulation de l'ADN.	82
2) Manipulation des protéines	83
3) Manipulation des bactéries.....	86
Production et purification de la Lugdulysine	88
1) Premier essai de production de Lugdulysine recombinante	88
2) Deuxième système d'expression de Lugdulysine recombinante	91
3) Purification de la Lugdulysine sauvage.....	94

Caractérisation biochimique de la Lugdulysine	99
1) L'azocaséine comme première approche.....	99
2) A la recherche de nouveaux substrats	102
Caractérisation de l'activité enzymatique	107
1) A la recherche d'un substrat physiologique	107
2) Impact de la Lugdulysine sur le système immunitaire	108
3) Etude sur la maturation de la Prolugdulysine	110
4) Impact de la lugdulysine sur le biofilm de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	111
Etudes cristallographiques.....	114
Spectrométrie de masse	116
Annexes du matériels et méthodes	117
Résultats.....	119
Introduction	121
Article 1 : « Coagulase Negative Staphylococci Pathogenomics »	123
Article 2 : « <i>Staphylococcus lugdunensis</i> M30 zinc metallopeptidase, lugdulysin, stabilizes with part of its propeptide and protects from lysis by LL37»	125
Des analyses génétiques à la maturation de la Lugdulysine	127
1) Etudes complémentaires du gène <i>slp1</i> et mutations naturelles.....	127
2) Le propeptide de la Lugdulysine : une nouvelle classe de chaperonnes intramoléculaires ?.....	134
3) Hypothèse quant à la maturation de la Prolugdulysine	139
4) Conclusions et perspectives	143
Relations entre la structure et l'activité de la Lugdulysine	145
1) Une brève histoire de structure	145
2) A la recherche d'un substrat pour la Lugdulysine	146
3) Quel substrat physiologique pour la Lugdulysine	150
4) Conclusions.....	155
Discussions & Conclusion.....	157
Caractérisation génomique.....	159
1) Synthèse des résultats.....	159
2) Confirmation des prédictions informatiques	159
3) Construction d'une souche <i>S. lugdunensis</i> VISLISI-22 Δ <i>slp1</i>	159
4) Etude de l'expression du gène <i>slp1</i>	160
Caractérisation structurale	162
1) Synthèse des résultats.....	162

2) Impact des mutations sur le domaine structurant du propeptide.....	163
3) Exploration de la poche catalytique.....	163
4) Développement d'un inhibiteur.....	164
Caractérisation biochimique.....	165
1) Synthèse des résultats.....	165
2) Cinétique enzymatique, cas du K_m et de la V_{max}	166
Caractérisation fonctionnelle.....	169
1) Synthèse des résultats.....	169
2) Détermination d'un ou plusieurs substrats physiologiques.....	169
3) Lugdulysine et impact sur le Biofilm.....	170
Conclusion.....	171
Annexes.....	177
Index des Figures.....	179
Index des Tables.....	181
Synthèse des publications, communications orales et posters.....	183
1) Publications.....	183
2) Présentations orales.....	183
3) Posters.....	184
Bibliographie.....	185

Liste des abréviations

Å – Angstrom

ADN – Acide désoxyribonucléique

Amp - Ampicilline

ARN – Acide ribonucléique

AS – Ammonium sulfate

BHI – Bouillon Coeur Cerveille

Chl – Chloramphénicol

ClfA – « Clumping factor A »

CoNS – Staphylocoques à coagulase négative

CoPS – Staphylocoques à coagulase positive

EDTA – Acide éthylènediaminetétraacétique

Fbl / Fbp – Fibrinogène / Protéine d'adhésion au fibrinogène

GSM – Gélose au Sang de mouton

GST – Glutathionne-S-transférase

Isd – « Iron surface determinant »

LB – « Lysogeny Broth »

MALDI-TOF – « Matrix assisted laser desorption ionization – Time of fly »

MMP – Métallopeptidase de la matrice

MRSA – *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

MS – Spectrométrie de masse

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

ODC – Ornithine décarboxylase

PNAG – Poly-N-acetylglucosamine

PSM – « Phenol soluble modulins »

PYR – Pyroglutamyl-β-naphthylamide

SCV – Variant à petites colonies

Sls – Protéines de surface de *Staphylococcus lugdunensis*

TLP – protéines comme la Thermolysine

VISLISI – « Virulence in *Staphylococcus lugdunensis* in severe infections »

VWf / VWfbp – Facteur Von Willebrand / Protéine d'adhésion au facteur Von Willebrand

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Généralités sur le genre *Staphylococcus*

1) La théorie dualiste à l'origine des Staphylocoques

La classification actuelle des Staphylocoques est le fruit de plusieurs décennies de recherches et de questionnements. Les premières traces écrites mentionnant le terme de « *staphylococcus* » remontent à 1880 avec une publication d'Alex Ogston¹. Il s'agit alors dans le manuscrit de distinguer deux comportements distincts parmi les bactéries de type « *micrococcus* ». Selon l'auteur, certains *micrococcus* se regroupent en chainettes (« *streptococcus* ») tandis que d'autres se regroupent en amas (« *staphylococcus* (from σταφυλή, a bunch of grapes) »). En cette période, Ogston est le premier à décrire les évolutions des infections causées par ces deux groupes de microorganismes. Ce chirurgien décrit ensuite en 1882 l'isolement de ce pathogène suite à une infection post chirurgicale² (A. Ogston, *Uber Abscesse* non consultable).

Peu de temps après, le genre *Staphylococcus* est subdivisé selon l'apparence de leurs colonies par le chirurgien allemand Rosenbach en deux espèces : *Staphylococcus pyogenes aureus* (du latin *aurum* (or)) et *Staphylococcus pyogenes albus* (du latin *albus* (blanc)). C'est à partir de cette description que les scientifiques vont ensuite classer les Staphylocoques selon leur pathogénicité³. En 1896, Lehmann et Neumann distinguent dans « l'atlas de bactériologie et manuel de diagnostic bactériologique », trois catégories de Staphylocoques qu'ils nomment *Micrococcus pyogenes aureus* (pathogène), *Micrococcus pyogenes albus* et *Micrococcus pyogenes citreus* (non pathogènes)⁴. Quelques années plus tard, en 1908, les *Staphylococcus* sont toujours référencés selon cette dualité pathogène/non pathogène sous les termes d'*Aurococcus aureus* et d'*Albococcus epidermidis*⁵. Tous deux sont déjà décrits comme des coques parasites naturellement présents sur la peau. Les seconds formant des colonies blanches non virulentes. Cependant, dès 1916, Alice C. Evans commence à remettre en question la dualité staphylocoque pathogène / non pathogène lors d'une étude du microbiote du lait⁶. Elle observe alors que certaines caractéristiques phénotypiques des souches non virulentes pouvaient varier selon les isolats. Elle réalise donc pour la première fois une distinction entre *Staphylococcus albus* et *Staphylococcus epidermidis*, tous deux

considérés comme non pathogènes. Cette distinction provient du constat que certaines colonies sans pigmentation (blanches) ne parviennent pas à fermenter le mannite. Il faudra attendre 1940 pour que la classification des Staphylocoques connaisse d'importants changements. Cette année-là, Fairbrother propose d'identifier le genre *Staphylococcus* à partir de la production ou non d'une coagulase⁷. Se basant sur la distinction de trois espèces de Lehmann et Neumann⁴ (*Staphylococcus aureus*, *albus* et *citreus*), Fairbrother introduit les termes de Staphylocoques à Coagulase positive (CoPS) et de Staphylocoques à Coagulase négative (CoNS)⁷. Il considère les CoPS comme des souches pathogènes présentant une pigmentation « aureus » ou « albus » et les désigne sous le terme de *Staphylococcus pyogenes*. A l'inverse, l'absence de coagulase et une pigmentation « albus » ou « citreus » témoigne d'une absence de pathogénicité. Il désigne alors ces souches *Staphylococcus saprophyticus*.

Ces distinctions se sont peu à peu affinées depuis les années 1970 avec la caractérisation d'un certain nombre d'espèces du genre *Staphylococcus*. Par exemple, Schleifer et Kloos décrivent en 1975 cinq espèces différentes à partir de prélèvements réalisés sur peau humaine⁸. A partir de divers critères taxonomiques (décrits plus loin dans ce chapitre), ils établissent une description détaillée de *Staphylococcus epidermidis* et *saprophyticus* et décrivent trois nouvelles espèces : *Staphylococcus cohnii*, *haemolyticus* et *xylosus*. *Staphylococcus hyicus* fut officiellement caractérisé en 1978 à partir de prélèvements porcins⁹.

Staphylococcus lugdunensis fut isolée pour la première fois une dizaine d'années plus tard par Freney *et al.*¹⁰. Son nom fait référence à la ville de Lyon (Lugdunum en latin), lieu de sa découverte. *S. lugdunensis* est alors observée comme une bactérie sphérique d'un diamètre de 0,8 à 1,0 µm, apparaissant seule, par paire, ou en chaînette de 3 à 5 bactéries. Elle se caractérise par la présence de peptidoglycane et d'acide téichoïque, la production d'une catalase, mais pas d'une oxydase. Il s'agit également d'une bactérie anaérobie facultative qui synthétise majoritairement de l'acide lactique à partir de glucose dans ces conditions. De plus, parmi d'autres caractéristiques, *S. lugdunensis* est capable de produire un facteur d'agglutination.

Avec le temps, et l'intérêt scientifique porté aux Staphylocoques à coagulase négative, le nombre d'espèces isolées a grandement augmenté au cours de ces quarante dernières années. Ainsi, en 2014, le genre *Staphylococcus* comprenait 47 espèces et 23 sous-espèces¹¹ (voir tableau ci-dessous). Cependant, ce chiffre ne cesse de croître puisque de nouvelles espèces, comme *Staphylococcus argentus*, *S. schweitzeri* (2015)¹² ou *S. edaphicus* (2017)¹³ ont été récemment caractérisées.

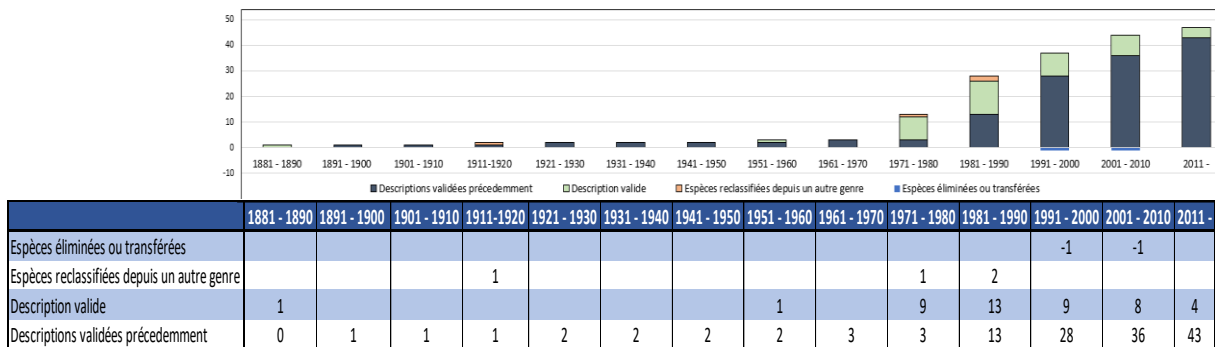


Figure 1 : Représentation graphique de la découverte des espèces du genre *Staphylococcus* découvertes depuis 1881 jusqu'à aujourd'hui

Il est intéressant de constater que les espèces caractérisées sous les termes de *Staphylococcus aureus*, *epidermidis* et *saprophyticus* regroupent jusqu'aux années 1970 un grand nombre d'espèces. En effet, les termes « *S. epidermidis* » et « *saprophyticus* » permettent, en cette période, de décrire l'ensemble des Staphylocoques non pathogènes. Deux espèces, *S. pulvereri* et *S. caseolyticus* ont été éliminées du genre *Staphylococcus*. La première étant identique à une espèce déjà décrite précédemment (*S. vitulinus*)¹⁴ tandis que la seconde fut reclassée dans le genre *Macroccoccus*¹⁵. Représentation graphique adaptée de Becker *et al.*¹¹

2) Identification des Staphylocoques, d'hier à aujourd'hui

L'augmentation du nombre d'espèces et de Staphylocoques caractérisés au cours du temps est corrélée avec l'amélioration des techniques d'identification. D'abord cantonnées à distinguer les espèces potentiellement pathogènes des non pathogènes, l'identification des Staphylocoques s'est affinée, afin de prendre en compte divers facteurs phénotypiques et génotypiques. De nos jours, l'identification des espèces est standardisée et perfectionnée pour produire des résultats rapides et fiables à travers le monde.

A) Identification visuelle directe

L'identification des staphylocoques ne se base plus uniquement sur l'apparence des colonies bien que cette méthode puisse révéler certaines caractéristiques de différentes

espèces. En effet, après culture sur gélose au sang de mouton (GSM) (Columbia blood agar plates), certains Staphylocoques vont présenter une activité hémolytique reconnaissable à un pourtour clarifié caractéristique d'une hémolyse β (Figure 2A). D'autres espèces telles que *S. chromogenes* et *S. aureus* produisent une pigmentation jaune-orangée qui a permis notamment d'identifier cette dernière lors des observations les plus précoces (Figure 2B). Finalement, la plupart des CoNS développent des colonies plus ou moins blanchâtre (Figure 2C).

Certaines espèces peuvent également être isolées et croître sous la forme de petites colonies variantes (Small Colony Variant, SCV)(Figure 2D). Ces SCV apparaissent chez de nombreux genres (*Salmonella sp*, *Escherichia sp*, *Pseudomonas sp*) et ont été particulièrement étudiés au sein des Staphylocoques : *Staphylococcus aureus*¹⁶, *S. epidermidis*¹⁷, *S. warneri*¹⁷ et *S. lugdunensis*^{18,19}. Cette sous-population de bactéries a une croissance atténuée ainsi qu'un métabolisme atypique leur permettant notamment d'accroître leur résistance aux antibiotiques et d'induire des infections récurrentes^{19,20}. En culture, les SCV se retrouvent souvent mélangés à des colonies exprimant un phénotype normal.

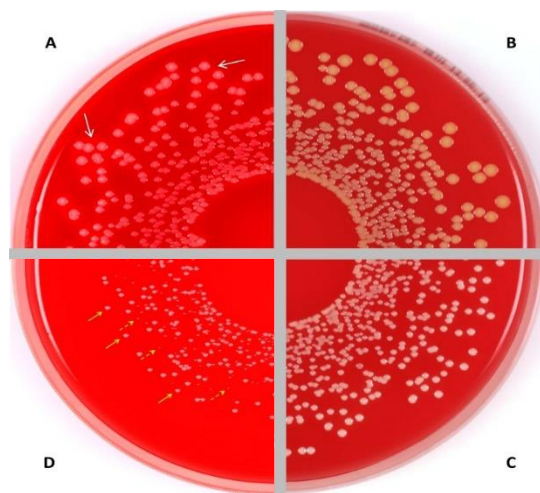


Figure 2 : Illustration des différentes morphologies après culture de différentes espèces de Staphylocoques sur géloses au sang de mouton

Des colonies de *S. haemolyticus* (A), *S. chromogenes* (B), *S. lugdunensis* (C) sont représentées. Le dernier panel (D) représente des colonies normales ainsi que des petites colonies variantes (flèches jaunes) issues d'une culture de *S. epidermidis*. Image inspirée par Becker *et al*¹¹.

Le Précis de bactériologie clinique 2018 décrit la morphologie des colonies de *Staphylococcus lugdunensis* comme suit²¹. Il s'agit de colonies d'un diamètre compris entre 1 et 4 mm, d'aspect lisse et brillante ou sèche, avec des bords réguliers ou dentelés et à centre

légèrement surélevé. Ces colonies prennent une coloration de jaune-pâle à crème orange avec une pigmentation qui s'intensifie avec le vieillissement de ces dernières. Les colonies rugueuses en revanche restent peu pigmentées. Pour finir, la culture développe une odeur de salaison caractéristiques des souches productrices d'ornithine décarboxylase (ODC).

B) Identification phénotypique

Le premier schéma d'identification des Staphylocoques fut rédigé en 1975²². En cette période, les Staphylocoques à coagulase négative étaient considérés comme non pathogènes. Cependant, des observations cliniques commencent à suggérer que les CoNS pourraient aussi être à l'origine d'infections humaines. Il s'agit donc d'établir un système d'identification pour les bactériologistes qui est certes laborieux, mais qui permet de discriminer en routine les onze espèces répertoriées en ces temps (Figure 3).

Cette méthodologie sera améliorée avec le temps par l'addition de tests phénotypiques utiles pour caractériser un plus grand nombre d'espèces. Pour exemples, l'introduction de l'évaluation de la résistance à la novobiocine a permis de discriminer *Staphylococcus saprophyticus* des autres Staphylocoques lors d'infections urinaires²³. De la même façon, tester l'hydrolyse du Pyroglutamyl- β -naphthylamide (PYR) permet de distinguer parmi les Staphylocoques produisant une coagulase libre, *S. aureus* (PYR⁻) de *S. delphini*, *S. intermedius* et *S. pseudointermedius* (PYR⁺)²⁴. Enfin, certaines techniques ont été améliorées afin d'éviter les erreurs d'identification

réagissent donc positivement au test et peuvent être confondues avec *S. aureus*²⁷. *Staphylococcus epidermidis* est également connue pour être responsable de faux positifs bien qu'il ne produise pas ce polysaccharide²⁸. Pour comparaison, une étude multicentrique a révélé que *S. lugdunensis* était le CoNS donnant le plus de faux positifs (jusqu'à 66.7% de faux positifs) suivi de *S. schleiferi* et *S. haemolyticus*²⁹.

Récemment, des galeries biochimiques d'identification miniaturisée ont été mises au point. Il est ainsi possible de citer les galeries API Staph® (BioMérieux), Vitek 2® (BioMérieux), le système BD Phoenix (Beckton Dickinson). Ces appareils permettent d'identifier en routine certaines enzymes, l'utilisation de sucres etc. Ainsi, les caractéristiques phénotypiques de cette bactérie sont décrites comme telles selon la classification BacDive (Bacterial Diversity Metabase)³⁰.

API® 32 Staph ID :	URE	ADH (Arg)	ODC	ESC	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE
2918	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
2511	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2510	+/-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
2509	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
ATCC 49576	V	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	MAN	RAF	RIB	CEL	NIT	VP	β-GAL	ArgA	PAL	PyrA
2918	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
2511	-	-	-	-	+	+	-	-	+/-	+
2510	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+/-
2509	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+/-
ATCC 49576	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	NOVO	SAC	NAG	TUR	ARA	β-GUR				
2918	-	+	+	-	-	-				
2511	+	+	+	+/-	-	-				
2510	+	+	+	-	-	-				
2509	+	+	+	+	-	-				
ATCC 49576	-	+	+	-	-	-				

Tableau 1 : Ensemble des caractéristiques phénotypiques de *Staphylococcus lugdunensis*

Le tableau regroupe les caractères phénotypiques, obtenus à partir d'une galerie d'identification API® ID32 Staph (BioMérieux), de cinq souches de *S. lugdunensis* selon les recommandations du constructeur. Elle contient 26 tests biochimiques miniaturisés permettant la détection d'une uréase (URE), de l'arginine dehydrolase (ADH), d'ornithine décarboxylase (ODC), d'hydrolyse de l'esculine (ESC), de la fermentation du D-glucose (GLU), du D-fructose (FRU), du D-mannose (MNE), du maltose (MAL), du lactose (LAC), du tréhalose (TRE), du D-mannitol (MAN), du raffinose (RAF), du D-ribose (RIB), du cellobiose (CEL), de la réduction du nitrate (NIT), de la production d'acétoïne (VP), d'une B-galactosidase (Beta GAL), de L-arginine arylamidase (ArgA), d'alkaline phosphatase (PAL), d'une Pyrrolidonyl arylamidase (PyrA), la résistance à la novobiocine (NOVO), de la fermentation du sucrose (SAC), du N-acétyl-glucosamine (NAG), du turanose (TUR), de l'arabinose (ARA). Les symboles +, - et +/- correspondent respectivement à une interprétation positive, négative ou faible du test.

C) Identification génotypique

Avec l'émergence des résistances aux antibiotiques chez *S. aureus* et la découverte du potentiel infectieux des CoNS, les techniques de caractérisation génotypique sont devenues une alternative de choix dans la discrimination des CoNS. De plus, cette méthodologie permet de s'affranchir des variations phénotypiques que l'on peut observer sur différentes souches d'une même espèce (Tableau 1).

Certaines équipes ont remarqué le potentiel de séquençage du gène l'ARN 16S dès les années 1960³¹. En effet, ce gène d'environ 1550 paires de base est constitué à la fois de régions variables et conservées. Les avantages de cet outil sont multiples ; le temps nécessaire pour réaliser les manipulations est court et nécessite peu de matériel ; la méthode est fiable puisqu'avec le recul, la taxonomie modélisée par l'ARN16s est similaire à celle obtenue après un séquençage complet du génome³². C'est pour ces raisons que différentes équipes ont développé une combinaison d'amorces permettant de différencier les Staphylocoques à coagulase négative. Les profils d'amplification obtenus sont, dans la majorité des cas, spécifiques de l'espèce^{33,34}. Pour conclure, une étude comparative démontre que les Staphylocoques pouvaient être distingués à l'échelle de l'espèce à l'exception des paires *S. intermedius* / *delphini* et *S. pulvereri* / *S. vitulinus* (bien que ces dernières s'avèreront être identiques quelques années plus tard¹⁴). Enfin, elle démontre également que le taux d'erreur des kits d'évaluation phénotypique commerciaux est bien plus conséquent que lors d'une analyse de l'ARN16S³⁵.

L'ARN 16S n'est pas le seul gène à avoir été ciblé dans la mise au point des protocoles d'identification. Le gène *rpoB*, codant la sous-unité β de l'ARN polymérase, fut également utilisé comme marqueur de différenciation des Staphylocoques à l'échelle du genre et de l'espèce³⁶ et ce, avec un pouvoir discriminant supérieur aux analyses phénotypiques³⁷. De nombreux autres gènes ont également été utilisés tels que les gènes *hsp60*^{38,39} (codant une « heat shock protein » de 60 kDa), *sodA*⁴⁰ (codant la superoxyde dismutase A) ou encore *tuf* (codant le facteur d'élongation TU)⁴¹. De même que pour les galeries d'identification biochimique, des kits commerciaux combinant l'identification des espèces à d'autres caractéristiques (production de toxine, résistance à la méticilline) ont été développés (SAMA[®], SAMAPV[®], SAPV[®] (Progenie-molecular) ; Xpert[®] MRSA/SA, (GeneXpert).

En ce qui concerne *Staphylococcus lugdunensis*, ces méthodes de caractérisation génotypique sont plus fiables et plus rapides que les méthodes phénotypiques traditionnelles⁴². La caractérisation selon des méthodes moléculaires a également permis d'accélérer le processus d'identification (environ 5 heures contre 18-24 heures). Cependant, quelques limitations subsistent. Pour exemple, le gène *nuc*, codant une nucléase, présente une diversité suffisante pour discriminer les Staphylocoques à l'exception de *S. sciuri*, *S. fleurettii*, *S. lentus* et *S. stepanovicii*⁴³.

Face au nombre de gènes ciblés et les différents protocoles employés, il est raisonnable de penser qu'une standardisation à grande échelle fut difficile à mettre en place.

D) Implémentation de la spectrométrie de masse

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification bactérienne est un concept apparu dès les années 1975⁴⁴. Ces chercheurs observent alors que l'analyse de bactéries à Gram négatif lyophilisées dans un spectromètre de masse permet d'obtenir des spectres spécifiques. La spectrométrie de masse évolue par la suite et va permettre notamment d'identifier des macromolécules de masse toujours plus élevées. Ainsi, Tanaka *et al.* qui recevra le Prix Nobel de Chimie en 2002, a pu caractériser des spectres de protéines de tailles comprises entre 1 kDa et 35 kDa⁴⁵. Par la suite, les spectres de différentes protéines telles que le lysozyme ou l'albumine ont été caractérisés⁴⁶. Deux articles sont alors produits à la fin des années 90 qui mettent en évidence l'intérêt d'utiliser la spectrométrie de masse (MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization – Time of Flight) pour l'identification de bactéries entières^{47,48}. Tous deux démontrent la rapidité (quelques minutes pour générer un spectre) ainsi que la précision de la méthode (identification à l'échelle du genre, de l'espèce, voire même de la souche).

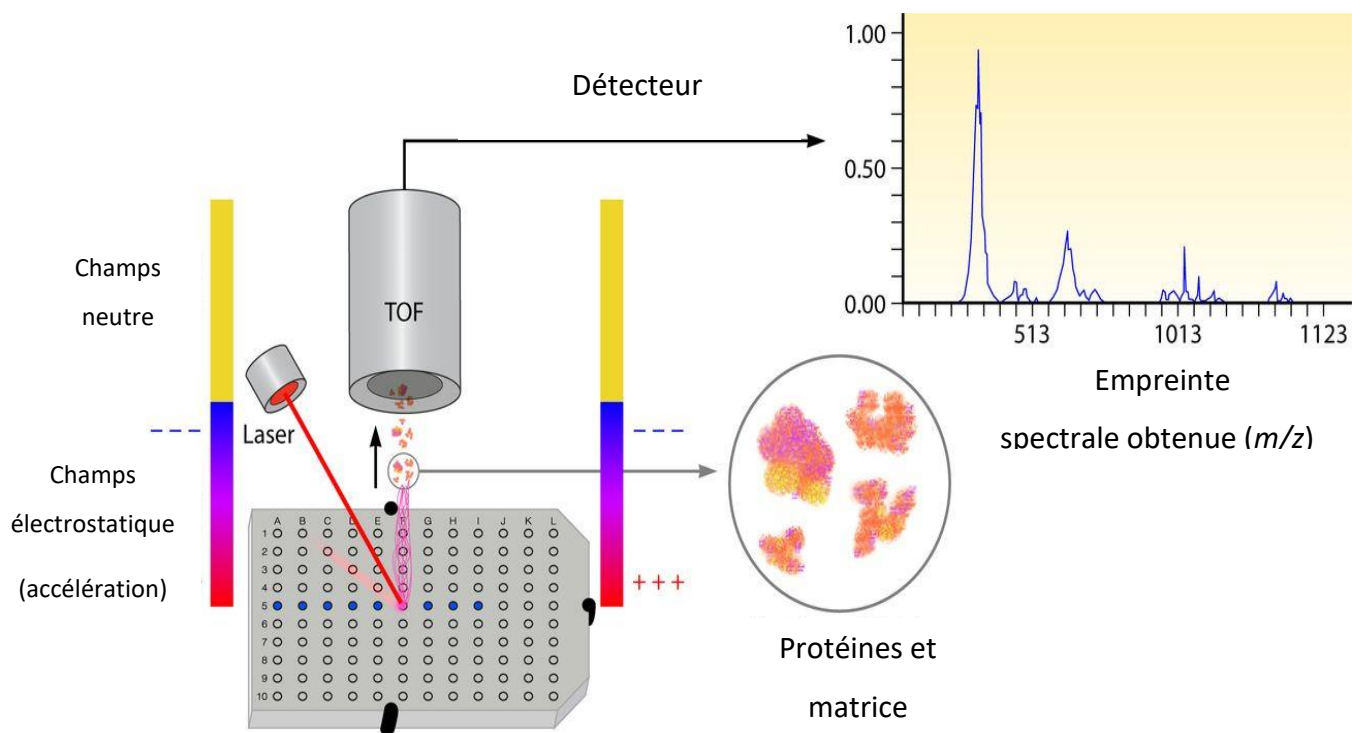


Figure 4 : Représentation schématique de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Après culture sur milieu gélosé ou prélèvement d'un échantillon, les bactéries sont appliquées et mélangées à une matrice (composés organiques) sur une plaque de spectrométrie. Après séchage, le mélange est irradié par un laser UV pour une courte période. Cette action provoque la sublimation (passage d'un état solide à gazeux) de la matrice et de l'échantillon clinique. Ces éléments sont ensuite analysés par un détecteur permettant d'évaluer le ratio m/z , c'est-à-dire la vitesse à laquelle un échantillon traverse le tube (TOF) pour atteindre le détecteur. Une fois détecté, les différents pics sur le profil sont comparés à une banque d'empreintes spectrales fournie par le fabricant. Illustration adaptée d'Andrew E. Clark *et al.*, 2013⁴⁹.

Ainsi, dès les années 2000, il devient possible de discriminer rapidement des souches de *Staphylococcus aureus* sensibles (MSSA) ou résistantes (MRSA) à la méticilline⁵⁰. En effet, certains pics présents dans les spectres sont conservés et varient entre une souche sensible et résistante. Selon ce même principe, une étude démontre qu'il est possible d'identifier avec précision les différentes espèces de Staphylocoques à coagulase négative⁵¹. Il est alors démontré que la spectrométrie de masse permet une caractérisation des CoNS rapide puisqu'il ne faut que quelques minutes pour obtenir un résultat (contre 1 jour à partir d'une galerie d'identification phénotypique et quelques heures à partir d'identification

génomique). De plus, cet outil permet de caractériser les échantillons cliniques pour un coût relativement faible.

Cette méthode nécessite cependant une base de données regroupant un ensemble de profils bactériens permettant la comparaison avec l'échantillon traité. Ces banques d'empreintes varient d'un constructeur à l'autre et permettent d'obtenir de très bons taux d'identification. Une étude (parmi les nombreuses réalisées) sur 980 isolats bactériens démontre que l'identification par MALDI-TOF/MS permet un taux d'identification à l'échelle du genre de 98,8% et de l'espèce de 92,0%, ce qui est bien supérieur à la caractérisation phénotypique (respectivement 98% et 83,1%)⁵². Après analyse, ces erreurs proviennent notamment de lacunes concernant des bactéries rarement identifiées dans la base de données. Il est également possible que les empreintes spectrales varient selon la qualité du dépôt et du mélange avec la matrice. Un nombre trop important de bactéries, un dépôt non homogène peut entraîner l'obtention de spectres de mauvaises qualités. Chez certaines espèces, comme les streptocoques, ou lorsque l'inoculum initial est faible (hémocultures, urines) il est possible de réaliser des extractions protéiques en amont pour améliorer la qualité des spectres⁵³.

Pour conclure, la spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) s'est imposée pour l'identification bactérienne et plus particulièrement en microbiologie médicale. Cet outil présente de nombreux atouts (temps, argent, précision) qui permettent une utilisation simple et un diagnostic efficace. Cependant, la MS n'a pas complètement remplacé les méthodes d'identification génomique. En effet, les arbres phylogénétiques obtenus lors d'identification des Staphylocoques par MALDI-TOF/MS sont similaires à ceux développés après analyse du gène de l'ARN 16S⁵⁴. Ainsi, les deux méthodes semblent équivalentes à l'exception du temps d'analyse exigé (et son coût). La méthode génomique est donc utilisée de manière complémentaire, lors d'un échec d'identification par MS ou pour la détection de gènes spécifiques tels que des gènes de résistance aux antibiotiques, par exemple.

3) Taxonomie finale de *Staphylococcus lugdunensis*

La classification définitive de *Staphylococcus lugdunensis* ne fut déterminée que très récemment. Le terme de « Bacteria », regroupant en un seul royaume les Prokaryotes fut proposé en 2002⁵⁵. Au sein de ce royaume se distingue donc les Firmicutes, division caractérisée en 1978⁵⁶. La classe des « Bacilli » de même que la famille des « Staphylococcaceae » furent introduites en 2010 dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁵⁷. Cette famille est incluse dans l'ordre des « Bacillales », déterminée en 1953⁵⁸, et contient le genre « *Staphylococcus* »³.

Tableau 2 : Taxonomie actuelle de *Staphylococcus lugdunensis*

Taxonomie de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>		Références
Royaume	Bacteria	Cavalier-Smith (2020) ⁵⁵
Division	Firmicutes	Gibbons et Murray (1978) ⁵⁶
Classe	Bacilli	Ludwig <i>et al.</i> (2010) ⁵⁷
Ordre	<i>Bacillales</i>	Prévot (1953) ⁵⁸
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>	Schleifer et Bell (2010) ⁵⁷
Genre	<i>Staphylococcus</i>	Rosenbach (1884) ³
Espèce	<i>lugdunensis</i>	Freney <i>et al.</i> (1988) ¹⁰

Les infections cliniques à *Staphylococcus lugdunensis*.

L'amélioration des techniques d'identification a permis de bouleverser complètement la perception des cliniciens et des chercheurs à propos des Staphylocoques à coagulase négative (CoNS). Comme évoqué précédemment, ces espèces étaient alors considérées comme non pathogène. De nos jours, cette distinction persiste puisque l'on oppose toujours les CoPS, en sous entendant presque exclusivement *Staphylococcus aureus* contre les CoNS. Cependant, l'accumulation des données issues des observations cliniques tendent à redéfinir ce schéma général. En effet, certains CoNS tels que *Staphylococcus lugdunensis* ont gagné une réputation de bactéries « intermédiaires », capables d'induire des infections de sévérité similaires à celles développées par *S. aureus*. De plus, parmi la quarantaine d'espèces de Staphylocoque identifiés, seulement une vingtaine sont responsables de pathologies chez l'homme²¹. Les autres sont isolés principalement dans l'environnement ou chez l'animal bien qu'ils puissent être transmis à l'homme en cas de contacts fréquents (vétérinaires, employés de zoo, fermiers etc).

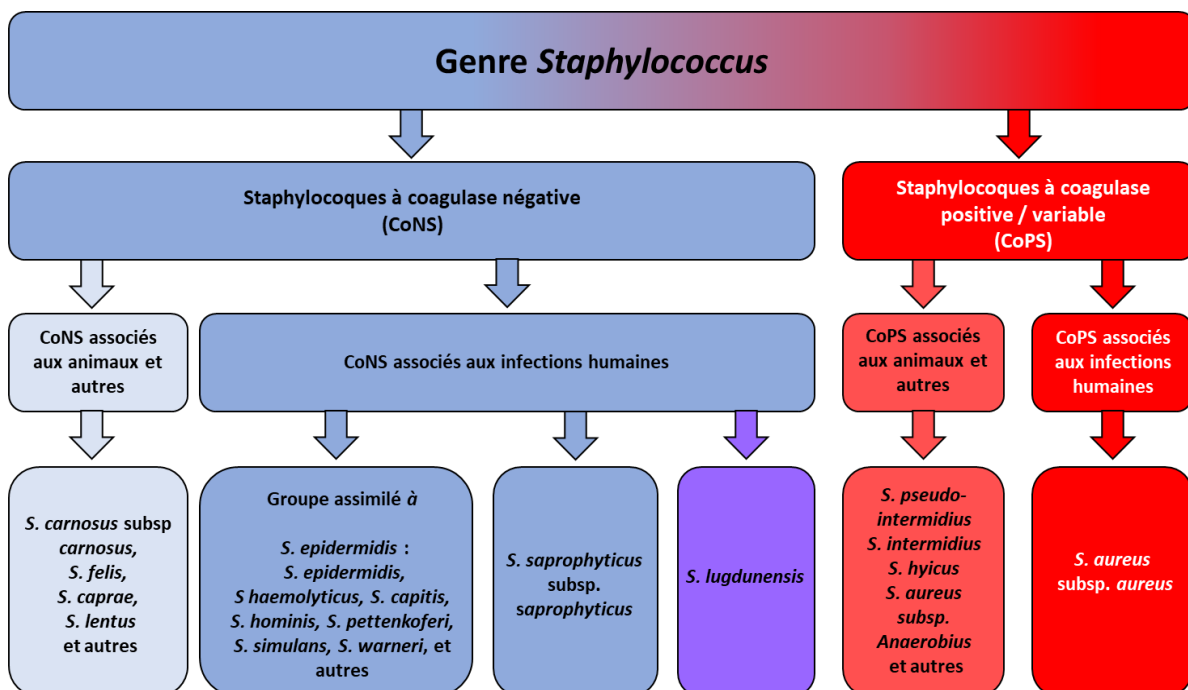


Figure 5 : Schéma simplifié des considérations cliniques vis-à-vis des Staphylocoques

Il est possible de constater la différenciation classique CoNS / CoPS, avec *Staphylococcus aureus* comme espèce principale associée aux infections humaines. A l'inverse, la virulence associée aux CoNS est considérée comme peu sévère, sauf dans le cas particulier de

Staphylococcus lugdunensis. Nous pourrions apprécier ce constat plus tard dans ce chapitre. Schéma inspiré et traduit de l'anglais à partir de Becker *et al.*¹¹

1) Localisation et habitat de *Staphylococcus lugdunensis*

Avant de s'intéresser aux manifestations cliniques des infections à *Staphylococcus lugdunensis*, il semble important de rappeler qu'il s'agit d'une bactérie commensale de la flore cutanée. Ainsi, certaines infections, et leurs localisations, seront corrélées aux zones de colonisation privilégiées sur la peau.

La peau est désormais reconnue comme un organe à part entière colonisé par une grande variété de micro-organismes⁵⁹. De vastes campagnes de caractérisation de ce microbiote cutané ont permis de décrire avec efficacité cet écosystème. Il apparaît alors clairement que les communautés microbiennes s'organisent notamment en fonction des propriétés inhérentes à certaines zones corporelles. Ces différences s'expliquent notamment par les variations que l'on peut observer entre ces zones, aussi bien au niveau du pH, que de l'humidité ou de la qualité des sécrétions (sébum notamment). En effet, en schématisant trois grands environnements ; sébacé, humide et sec, il apparaît que la flore microbienne habitant ces zones varie grandement. Ainsi, les staphylocoques sont présents majoritairement dans les régions humides ou sébacées⁶⁰. Ils sont majoritaires dans les régions humides localisées notamment au niveau du nombril, de la voute axillaire et plantaire, des plis inguinaux et fessiers, du creux sternal à la base du cou, de l'arrière du genou et de l'intérieur du coude et des poignets. C'est également dans ces zones que la diversité microbienne est la plus importante. De la même façon, ces régions connaissent aussi les plus grandes variations au cours du temps⁶¹.

D'un point de vue général, *Staphylococcus lugdunensis* est considéré comme étant présent sur l'ensemble de la peau. Cette affirmation provient notamment d'une première étude clinique, datant de 1991, ayant pour but d'analyser des prélèvements (sur 17 zones de la peau) chez des patients hospitalisés. Les chercheurs observent notamment que *Staphylococcus lugdunensis* est isolé sur l'ensemble des zones testées, concluant ainsi que la bactérie est présente sur toute la surface de la peau⁶². D'autres publications antérieures ont permis d'affiner ce constat. Basé sur des prélèvements réalisés dans 16 villes à travers l'Europe, un article démontre que la majorité des infections avérées à *S. lugdunensis* étaient

localisées sous la taille. Grace à ces observations, ils concluent donc que le site de colonisation favorisé est le périnée⁶³. Une première étude réalisée sur 75 personnes saines a permis d'observer que 66 % de la cohorte était colonisée par *S. lugdunensis* (contre 21 % pour *S. aureus*) dans une ou plusieurs régions testées. Il apparaît ici que la bactérie colonise majoritairement trois régions, les orteils, les aisselles et l'aîne. De manière intéressante cette étude confirme que *S. lugdunensis* colonise principalement le bas du corps et qu'il est présent sur un plus grand nombre de zones corporelles que son homologue *S. aureus*. Une autre étude prospective réalisée sur 140 patients confirme le portage de *S. lugdunensis* au niveau des plis inguinaux puisque 21 % des personnes testées dans cette zone sont colonisées. Ils remarquent également que pour 68 % de ces personnes, *S. lugdunensis* était présente au niveau des deux plis inguinaux⁶⁴. Pour finir, une publication récente met en évidence que 51.6 % des 252 patients testés étaient porteurs de la bactérie. Les zones majoritairement colonisées sont le nez, l'aîne, et les aisselles, confirmant ainsi les résultats précédents⁶⁵.

2) Manifestations cliniques des infections à *Staphylococcus lugdunensis*

La présence de *Staphylococcus lugdunensis* au niveau de certaines zones corporelles est directement corrélée avec les infections développées par cette même bactérie. A cause de son mode de vie commensal *S. lugdunensis* fut longtemps considéré comme un simple contaminant récolté lors du prélèvement. A cause des problèmes d'identification, le nombre d'infections dues à *Staphylococcus lugdunensis* a donc probablement été sous-évalué dans un premier temps. Par la suite, de nombreuses séries cliniques (dont les conclusions seront retranscrites plus loin dans ce chapitre) en se concentrant sur l'isolement de la bactérie, pourraient avoir, à l'inverse, surestimées l'importance de *S. lugdunensis*. En effet, il n'existait pas, à la date de publication de ces séries, de méthodologie et de critères de significativité microbiologiques strictes. Ainsi, certains prélèvements, cette fois-ci contaminés ont pu être traités comme relevant d'une infection à *S. lugdunensis*. Pour toutes ces raisons, il convient d'accepter avec précaution les chiffres donnés qui, malgré les biais méthodologiques, restent de bons indicateurs de la situation globale.

Le manuel européen de microbiologie clinique considère, par exemple, qu'il faut deux échantillons positifs pour un CoNS pour que l'implication de la bactérie dans l'infection soit significative⁶⁶. En effet, les prélèvements dans les zones colonisées peuvent être sujets à de nombreuses contaminations. Afin de résoudre ce flou, notre équipe s'est attachée à développer une méthodologie rigoureuse pour établir la significativité d'un prélèvement positif à *Staphylococcus lugdunensis*⁶⁷.

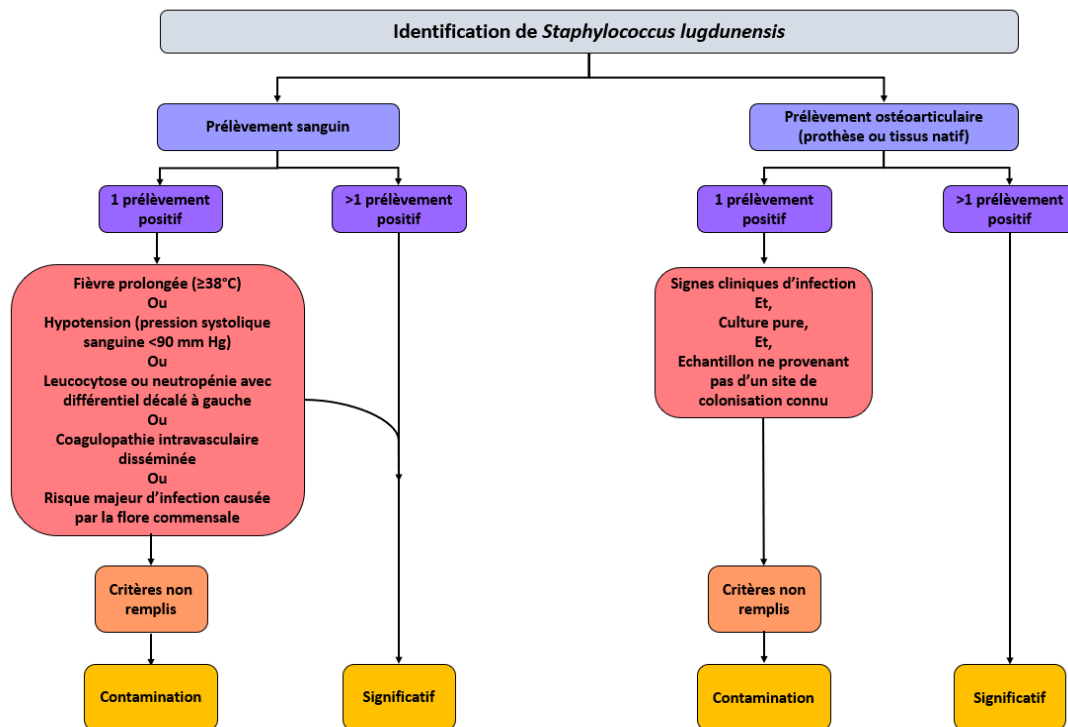


Figure 6 : Recommandations concernant l'isolement de *Staphylococcus lugdunensis*

Les recommandations préconisées par notre équipe est de considérer comme significative une infection à *Staphylococcus lugdunensis* lorsqu'un seul échantillon, prélevé dans les couches profondes de l'organisme (sang, os, prothèse), est positif. En revanche, ils conseillent d'être mesuré dans le cas d'un prélèvement superficiel positif à proximité des zones susceptibles d'abriter la bactérie (peau et tissus mous). Schéma traduit de l'anglais d'après Argémi *et al.*⁶⁷

A) Infections de la peau et des tissus mous

Staphylococcus lugdunensis peut développer des infections plus ou moins sévères chez son hôte. Les premières traces d'infections attribuées à *S. lugdunensis* sont notamment des infections superficielles. La pathogénicité de la bactérie fut révélée par une grande étude rétrospective réalisée sur 491 patients⁶⁸. L'équipe Danoise a observé que la majorité des infections (56%) étaient localisées sous la taille même si une grande variété de sites sont

infectés. Cette étude avait pour objectif d'alerter les cliniciens sur la pathogénicité de cette bactérie. En effet, suite à cette étude l'incidence des infections à *S. lugdunensis* a augmenté de 5 à 53 infections pour 100.000 habitants. Lors de leur enquête, la bactérie a majoritairement provoqué l'apparition d'abcès, d'infections liées à une blessure ainsi que des panaris ou des otites (moyenne et externe). Des panaris et des abcès ont également été rapportés dans d'autres séries cliniques^{69,70}. Il est intéressant d'observer que dans ces derniers cas, les patients ont subi un drainage et un traitement antibiotique pendant 10 jours pour être soulagés de l'infection. Cependant, pour les raisons que nous avons évoquées précédemment (manque d'une méthodologie et de critères cliniques strictes) cette large étude est remise en question par certains auteurs⁷¹. Ils critiquent notamment l'identification de *Staphylococcus lugdunensis* en coculture avec d'autres micro-organismes dans 45% des prélèvements. Ils soulignent ainsi la difficulté d'interpréter des résultats lors d'une étude rétrospective. Cette réflexion est intéressante puisque dans l'étude prospective VISLISI (pour « Virulence in *Staphylococcus lugdunensis* in severe infections ») réalisée par notre équipe, les infections de la peau et des tissus mous ne semblent pas être les infections les plus représentées²⁶. Cependant, *Staphylococcus lugdunensis* peut, dans de plus rares cas, causer des infections plus sévères telle qu'une mastoïdite^{72,73} ou être associé à des ulcères⁷³ ou des fasciites nécrosantes⁷⁴.

B) Endocardites infectieuses

Les premiers rapports cliniques décrivant des endocardites développées par *Staphylococcus lugdunensis* remontent à la fin des années 1980^{75,76} bien qu'en cette période l'identification de la bactérie était encore laborieuse (*S. lugdunensis* y est décrit comme une espèce proche de *S. hominis*). Comme précédemment, une grande revue rassemblant les données de 27 séries cliniques rédigées entre 1988 et 2008 fut publiée⁷⁷. Dans cette revue, les auteurs constatent que 67% des endocardites sont contractées en dehors de l'hôpital sans qu'une porte d'entrée soit clairement identifiée. De plus, les endocardites concernent majoritairement les valves cardiaques natives (80.6%), les valves prothétiques (11.9%) et les pacemakers (7.5%). Malgré les biais inhérents à une analyse rétrospective, ces chiffres sont similaires à ceux observés dans d'autres séries cliniques plus récentes (avec respectivement 10 infections sur valves natives pour 2 sur prothèses et 3 sur pacemakers)⁷⁸. Le taux de

mortalité sur l'ensemble des séries cliniques de la revue est évalué à 38.8%, avec 68.7% des patients ayant subi un double traitement, antibiotique et chirurgical. Ce taux semble très inquiétant pour un CoNS, puisque chez *Staphylococcus aureus*, le taux de létalité est plutôt de l'ordre de 20%⁷⁹ et de 16% chez les CoNS en général⁸⁰. *Staphylococcus lugdunensis* a donc acquis une réputation particulière parmi les CoNS. Ceci se confirme au regard des pourcentages d'interventions nécessaires, ainsi qu'au taux de mortalité imputable à *Staphylococcus lugdunensis*. Une publication compare, par exemple, les endocardites provoqué par *S. aureus* à celles provoquées par les CoNS en général⁸¹. Malgré le fait que les CoNS ne soient responsables que de 8% des endocardites, ils démontrent que ces bactéries provoquent de manière fréquente le développement d'abcès intracardiaques pouvant conduire à un arrêt cardiaque (plus de 40% de la cohorte) voire la mort. De plus, les patients ayant contracté une endocardite à CoNS sont plus susceptibles de subir une intervention chirurgicale qu'avec une infection à *S. aureus*. Cela est d'autant plus vrai avec *S. lugdunensis* puisque les patients subissent dans 70% des cas une intervention chirurgicale contre 60 % pour *Staphylococcus epidermidis* et 20 % pour *Staphylococcus aureus*. De même, le taux de mortalité associé à *S. lugdunensis* semble bien supérieur aux autres (50 % contre 20% et 7% pour *S. epidermidis* et *S. aureus* respectivement)⁸². D'autres publications relatent également des taux de mortalité très élevés (42% sur valves natives et 78% sur prothèses de valves)⁸².

C) Infections ostéoarticulaires

Staphylococcus lugdunensis est également réputée pour provoquer des infections ostéoarticulaires. Une première étude clinique rétrospective évalue les caractéristiques cliniques de ces infections sur 22 patients (pour un total de 28 infections)⁸³. Ils observent alors que l'infection ciblait dans la grande majorité des cas une prothèse située sur au niveau du genou. Les autres patients souffraient d'une infection à la hanche (11%). Ceci est confirmé par une étude rétrospective plus récente (sur 84 patients) décrivant que 69 % des infections relatées dans la littérature concernent les genoux, 28.6% pour les hanches¹⁸. Ils soulignent également que respectivement 43.5% patients ont subi une deuxième intervention chirurgicale malgré le traitement antibiotique qui suivit la première. Une étude rétrospective réalisée par notre équipe observe que ce sont 80% des patients (60/70) qui ont eu recours à une intervention chirurgicale⁸⁴. Cette seconde revue souligne également la présence régulière

de petites colonies variantes (SCV) présentes en coculture avec *S. lugdunensis*¹⁸. Il s'agit de souches de cette même bactérie possédant un métabolisme amoindri. Ces SCV semblent notamment apparaître suite à un traitement antibiotique et sont associés à des symptômes chroniques^{18,85}. Pour finir, une étude rétrospective compare la sévérité de 88 infections ostéoarticulaires (respectivement 28, 30 et 30 pour *S. lugdunensis*, *S. aureus* et *S. epidermidis*)⁸⁶. Les auteurs constatent que les symptômes cliniques (douleurs, fièvre, inflammation) sont similaires entre *Staphylococcus lugdunensis* et *S. aureus* et bien supérieurs à ceux développés par *S. epidermidis*. De plus, le délai entre la survenue de l'infection et l'intervention chirurgicale ainsi que les interventions adoptées pour stopper les infections dues à *S. lugdunensis* sont tout à fait similaires à *S. aureus*.

D) Autres infections

Parcourir les différentes séries cliniques permet également de constater que *Staphylococcus lugdunensis* possède un tropisme infectieux très large. En effet, les trois types d'infections citées précédemment sont considérées comme majoritaires. Cependant, *S. lugdunensis* est régulièrement impliqué dans des infections urinaires^{26,87,88}. Des personnes développant un abcès intracrânien ont également été rapportées^{89,90}. Pour finir, un cas de pneumonie accompagné d'une septicémie a aussi été observé⁹¹.

E) Résistance aux antibiotiques

Afin de conclure ce chapitre sur les manifestations cliniques des infections à *Staphylococcus lugdunensis*, il semble important d'analyser plus en détail la résistance aux antibiotiques de cette bactérie. Comme évoqué précédemment, l'utilisation des antibiotiques est souvent nécessaire pour contrôler les infections. Pour faciliter la compréhension, les différentes résistances aux antibiotiques détectées lors des séries cliniques les plus importantes citées dans ce manuscrit, seront répertoriées dans un tableau récapitulatif (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des résistances aux antibiotiques chez *Staphylococcus lugdunensis*

Ce tableau regroupe cinq séries cliniques ayant étudié la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus lugdunensis* isolées à l'hôpital. Bien que ces cas cliniques répertoriés ne sont qu'un échantillon du large éventail de cas disponibles dans la littérature, ils restent représentatifs de la situation globale. Pour finir, les antibiogrammes réalisés dans ces différentes séries cliniques ne concernent pas toujours les mêmes molécules (la série n°2 n'identifie que la résistance à la pénicilline par exemple).

N° série clinique	Nombre de patients	Infections de la peau et des tissus mous	Endocardites	Infections ostéoarticulaires	Autres infections	Sensibilité aux antibiotiques	Références
1	491	413	0	2	76	80% Pénicilline 100% Oxacilline	Bocher et al.⁶⁸
2	67	0	67	0	0	82% Pénicilline	Liu et al.⁷⁷
3	10	0	10	0	0	84% Pénicilline 94% Méthicilline	Anguera et al.⁸²
4	28	0	0	28	0	50% Pénicilline 68% Fosfomycine 100% Oxacilline	Lourtet et al.⁸⁵
5	22	0	0	22	0	58% Oxacilline 73% β-lactamines 100% Vancomycine	Shah et al.⁸³

Il apparaît clairement que les souches de *Staphylococcus lugdunensis* sont dans la majorité des cas sensibles à la plupart des antibiotiques utilisés^{68,77,82,83,86}. Malgré de grandes disparités selon les études, la production d'une β-lactamase est souvent rapportée. Celle-ci confère une résistance à la pénicilline, mais sa fréquence varie selon les sites étudiés. En effet, une étude Américaine a démontré que 45 % des souches isolées étaient résistantes à la pénicilline et l'ampicilline⁹². Une étude Taiwanaise a quant à elle relevé des taux de résistance de respectivement 87% et 20% pour la pénicilline et l'oxacilline⁹³. A l'inverse des études Danoise et Suédoise n'identifient que 20% et 25% respectivement de souches résistantes à cette molécule^{68,94}. Il est possible également d'observer des niveaux importants de résistance à la fosfomycine (68%⁸⁶). D'autres résistances ponctuelles à différents antibiotiques, tels qu'à l'acide fusidique⁶⁸, l'érythromycine^{68,92}, à la fluoroquinolone⁸⁶, à la tétracycline⁸⁶ sont à relever.

Staphylococcus lugdunensis apparaît donc comme une espèce sensible à la plupart des antibiotiques utilisés en clinique. Malgré ce constat général, des résistances semblent émerger en certains endroits. Cependant, les molécules concernées, pénicilline et oxacilline, sont des antibiotiques de première intention rarement utilisés de nos jours. En comparaison, *Staphylococcus aureus* est bien plus résistante à la pénicilline G (respectivement 80% et 92%) et la tétracycline (respectivement 38.6% et 33.2%) par exemples^{95,96}. *Staphylococcus*

lugdunensis apparaît également relativement sensible aux antibiotiques au regard des autres CoNS. Ainsi, dans certaines études il est possible d'observer chez *Staphylococcus epidermidis* et *S. haemolyticus* des taux de résistance à la pénicilline de 95% ou encore à l'érythromycine de 71% et 64%, respectivement, ainsi qu'à d'autres molécules (tétracycline, gentamicine etc)^{97,98}. L'étude d'Argémi *et al.* illustre également ces différences de sensibilité aux antibiotiques⁹⁹. En effet, dans cette étude, respectivement 71%, 87% et 2% des souches de *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. lugdunensis* sont résistantes à l'oxacilline/méticilline.

3) Conclusion

Dans l'ensemble, les cliniciens de ces nombreuses études s'accordent à dire que la pathogénicité de *Staphylococcus lugdunensis* n'est pas à sous-estimer. Ainsi, de nombreux rapports estiment à raison les infections de la peau et des tissus mous à *S. lugdunensis* similaires à celles développées par *Staphylococcus aureus*^{26,68,69}. *Staphylococcus lugdunensis* est également un agent pathogène susceptible de causer de graves endocardites^{77,78,82}. Bien que leur incidence soit rare, la sévérité des infections est similaire voire supérieure à celle de *S. aureus*. De la même façon, les symptômes et le comportement des infections ostéoarticulaires à *Staphylococcus lugdunensis* sont bien plus similaires à ceux de *S. aureus* qu'à ceux des autres CoNS⁸⁶. Les cliniciens encouragent donc vivement à distinguer les infections à *S. lugdunensis* des infections aux autres CoNS, afin d'adapter au mieux le protocole thérapeutique^{67,84}. Malgré une sensibilité importante aux antibiotiques, *Staphylococcus lugdunensis* peut donc développer des infections graves, qui peuvent nécessiter des pratiques chirurgicales lourdes pour le patient. Ces infections sont la conséquence de l'expression notamment de toute une batterie de facteurs de virulence. Ces différents acteurs vont permettre à la bactérie d'acquérir des diverses compétences/caractéristiques, d'adhésion, de protection contre le système immunitaire lui permettant de coloniser et de persister dans différents milieux.

Facteurs de virulence synthétisés par *Staphylococcus lugdunensis*

Staphylococcus aureus est de loin le Staphylocoque le plus étudié. Ceci s'explique à la fois par le rôle historique qui a été attribué à cette bactérie, et ce dès la découverte du genre « *Staphylococcus* », ainsi qu'à son pouvoir pathogène. En effet, *Staphylococcus aureus* s'est taillé une réputation particulière en milieu hospitalier vis-à-vis de la sévérité des infections qu'il développe. Pour lutter contre sa pathogénicité, de nombreuses études ont été réalisées sur les facteurs de virulence qu'il produit. Cela a notamment permis d'ériger des tableaux cliniques des infections permettant ainsi de relier facilement des symptômes cliniques à la production d'un facteur précis.

Ce constat n'est malheureusement pas tout à fait valable pour *Staphylococcus lugdunensis*. En effet, à cause de sa découverte plutôt récente et les problèmes d'identification, les infections à *Staphylococcus lugdunensis* furent longtemps sous-estimées. Il est possible d'observer que ce n'est qu'à partir des années 2000 que les considérations cliniques et donc scientifiques ont changé à propos de cette bactérie. Pour exemple, il faudra attendre 2010 pour que le premier génome de *Staphylococcus lugdunensis* (souche HKU09-01) soit séquencé partiellement¹⁰⁰. Cette publication, bien qu'importante, ne s'attarde cependant pas dans l'annotation des potentielles protéines ou de facteurs de virulence. Il faudra donc attendre un an pour que des auteurs séquencent un génome complet qui servira de référence pour de nombreuses publications (souche N920143)¹⁰¹. Ils décrivent ainsi un génome de 2.6 Mpb présentant sur ses 2447 séquences codantes, respectivement, 77.8%, 74.7% et 78.3% de réciprocity avec *Staphylococcus aureus* (souche MRSA252), *Staphylococcus epidermidis* (souche RP62a) et *Staphylococcus haemolyticus*. Cette étude a surtout démontré que *Staphylococcus lugdunensis* possédait potentiellement un grand nombre de facteurs de virulence favorisant sa survie ainsi que son potentiel infectieux. Avec le temps, d'autres génomes se sont ensuite ajoutés à la liste. Notre équipe a, par exemple, séquencé un total de sept génomes provenant de l'étude VISLISI^{26,102}. Cette étude a permis d'identifier notamment des éléments génétiques mobiles tels que des prophages et des plasmides, dont certains sont

similaires à ceux trouvés chez *Staphylococcus aureus*. De potentiels transferts horizontaux de gènes entre ces deux espèces semblent donc envisageables confortant ainsi le regard singulier porté à *Staphylococcus lugdunensis* au cours du chapitre précédent. En effet, ce genre d'éléments codent notamment pour des molécules permettant à *S. aureus* d'échapper au système immunitaire (staphylokinase, staphylococcal inhibitor of complement (SCIN) etc)¹⁰³. Malgré certaines similarités, *Staphylococcus lugdunensis* ne possède tout de même pas l'arsenal offensif de *Staphylococcus aureus*⁷⁶.

Pour ces raisons, les facteurs de virulence étudiés au cours de ce chapitre seront regroupés selon leurs conséquences physiologiques (probables ou avérées). Dans de nombreux cas et par manque de connaissances sur cette bactérie, des analogies avec *Staphylococcus aureus* ou d'autres bactéries sont réalisées.

1) Facteurs d'adhésion

La capacité d'une bactérie à adhérer à son environnement influe grandement sur sa pathogénicité. La fixation de *Staphylococcus lugdunensis* sur différentes surfaces est permise, comme pour les autres staphylocoques, par la production d'adhésines de la famille des MSCRAMM (composant de la surface microbienne reconnaissant les molécules matricielles adhésives)¹⁰⁴. Afin d'appréhender la virulence potentielle de cette bactérie, une première publication évalue sa capacité à adhérer à certaines protéines de la matrice extracellulaire. Ainsi, les auteurs démontrent la remarquable capacité de cette bactérie à fixer (sous leurs formes solubles et immobilisées) le collagène, la laminine, la vitronectine, le fibrinogène et dans une moindre mesure la fibronectine¹⁰⁵.

Le séquençage complet du génome de la souche N920143 a permis de mettre en évidence la probable production de treize protéines ancrées à la membrane¹⁰¹. Cependant, bien que des homologies existent avec d'autres protéines sept de ces protéines, appelées SIs (pour *S. lugdunensis* surface proteins) n'ont jamais été caractérisées jusqu'à présent chez *Staphylococcus lugdunensis*. Ces gènes semblent coder des protéines de tailles et de structures diverse mais leurs fonctions restent encore inconnues. La caractéristique commune à la plupart de ces protéines est un motif « LPXTG » localisé au niveau de leur extrémité C-terminale¹⁰¹. Ce motif est notamment reconnu par une transpeptidase, nommée sortase A,

similaire à celle produite par *Staphylococcus aureus*. Lors de la fixation, ce motif est clivé entre la thréonine et la glycine permettant ainsi l'attachement du groupe carboxylique de la thréonine au peptidoglycane¹⁰⁶. Seules deux des treize protéines contiennent un motif NKQPN, spécifique d'une sortase de type B similaire à celle de *Staphylococcus aureus* et dont la structure a été caractérisée¹⁰⁷.

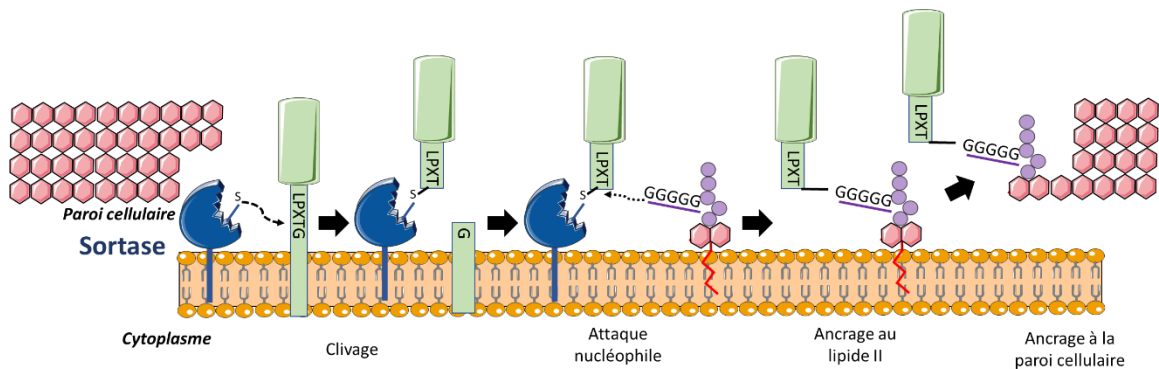


Figure 7 : Mécanisme d'ancrage par la sortase A chez *Staphylococcus lugdunensis*

Les sortases sont des protéines intégrées dans la membrane. Les protéines de surfaces sont synthétisées puis exportées par l'intermédiaire d'un peptide signal qui sera éliminé par le système de sécrétion Sec. Une fois à la membrane, les protéines de surfaces sont clivées au niveau d'un motif de reconnaissance spécifique LPXT/G (Sortase A). Une attaque nucléophile intervient ensuite entre le domaine N-terminal de la pentaglycine du lipide II et l'extrémité C-terminale de la thréonine libérée. La protéine de surface est ensuite incorporée à la paroi par une réaction de transpeptidation. Schéma traduit et adapté de Hendrickx *et al.*¹⁰⁸

Parmi ces protéines ancrées à la paroi par les sortases A et B, seulement 6 ont été partiellement caractérisées. Il s'agit de quatre protéines impliquées dans la capture du fer et dont le fonctionnement sera étudié plus tard dans ce chapitre. Les deux autres protéines sont des protéines d'adhésion au fibrinogène et au facteur Von Willebrand.

A) La protéine d'adhésion au facteur Von Willebrand

Le facteur Von Willebrand (VWf) est une protéine constituée de 2813 acides aminés (peptide signal inclus) pouvant s'oligomériser en complexe d'une taille comprise entre 500 et 20000 KDa. Le VWf possède notamment la propriété d'adhérer aux collagènes (types 1 à 6) ainsi qu'aux plaquettes. En cas de lésions vasculaires, la force du flux sanguin varie grandement entre le centre et les parois des vaisseaux, entraînant ainsi des forces de

cisaillement importantes. Dans ces conditions, le Vwf, exposé au flux sanguins, change de conformation et expose des domaines permettant de recruter et d'immobiliser les plaquettes au niveau du site lésé^{109,110}.

Une première protéine d'adhésion au facteur Von Willebrand (VWfbp) fut découverte par la technique du phage display¹¹¹. Au cours de cette première étude, les auteurs montrent que l'adhésion entre la VWfbp et le Vwf s'effectue au niveau de dix répétitions de 67 acides aminés. Ils étudient également la distribution du gène (*vwfbp*) codant cette protéine. Dans leur série, ils constatent que 100 % des souches possèdent ce gène qui semble donc largement répandu parmi l'espèce. Une autre étude sur les facteurs de virulence confirme ces observations puisque 81.6 % des souches de cette publication possèdent le gène¹¹². Pour finir, une étude publiée en 2016 explore plus en détails ce mécanisme d'adhésion. Ils confirment ainsi que *Staphylococcus lugdunensis* adhère au Vwf sans avoir recours aux plaquettes. De plus, la VWfbp favorise grandement l'adhésion de la bactérie au collagène. Finalement, ils démontrent avec des modèles *in vitro* et *in vivo*, que *Staphylococcus lugdunensis* devient capable d'adhérer aux cellules endothéliales et donc aux parois des vaisseaux sanguins lorsqu'ils sont activés. Grâce à cette propriété, la bactérie est capable de résister aux pressions de cisaillements, favorisant ainsi l'apparition d'endocardite, et se démarque encore un peu plus des autres CoNS¹¹³.

B) La protéine d'adhésion au fibrinogène

Avant de s'intéresser à ce facteur de virulence, il convient de rappeler le rôle du fibrinogène au sein de l'organisme. Il s'agit d'une protéine hexamérique complexe de 340 kDa composée de six chaînes polypeptidiques (chaînes A α , 2 chaînes B β , et 2 chaînes γ) présente en très grande quantité dans le plasma (entre 2 et 5 mg.mL⁻¹). Pour résumé très brièvement, le fibrinogène est converti en fibrine (protéine insoluble) par différents clivages réalisés par la thrombine. La création de fibrine permet ensuite de former un réseau plus ou moins dense de fibres permettant notamment la formation de caillot sanguins localisés au site de blessure, et préservant ainsi l'hôte d'une potentielle hémorragie^{114,115}.

Il a été démontré à deux reprises que *Staphylococcus lugdunensis* produisait une protéine d'adhésion au fibrinogène^{25,116}. Avec 58% d'identité (parfois jusqu'à 62% d'identité au niveau de la région de fixation du fibrinogène), ces deux publications caractérisent une

protéine similaire au facteur d'agglutination A (Clumping factor A, ClfA) produit par *Staphylococcus aureus*. Ils démontrent ainsi que cette protéine membranaire adhère au fibrinogène et que son activité est inhibée par des anticorps anti ClfA^{25,116}. Pour finir, les seconds auteurs rapportent également que l'expression de ce gène *fbl*, codant la protéine d'adhésion au fibrinogène, chez *Lactobacillus lactis* permet de promouvoir l'adhérence au fibrinogène immobilisé et la formation d'agrégats cellulaire avec du fibrinogène en solution²⁵. Globalement, le comportement de la Fbl semble tout à fait similaire à celui du ClfA bien que son affinité pour le fibrinogène soit dix fois inférieure à celle de son homologue chez *Staphylococcus aureus*. Cette dernière affirmation est par contre contestée par une autre publication. De plus, cette étude démontre que la Fbl se lie au domaine C-terminal de la chaîne γ du fibrinogène à l'instar du ClfA¹¹⁷. Bien qu'aucune étude n'est publiée à ce jour sur l'impact de la protéine d'adhésion au fibrinogène de *Staphylococcus lugdunensis*, certains travaux réalisés sur *Staphylococcus aureus* pourraient laisser supposer qu'elle joue un rôle dans le développement d'endocardite¹¹⁸. En effet, cette étude démontre qu'une souche de *S. aureus* mutée (Δ ClfA) en plus de perdre sa capacité d'adhésion, perd également la possibilité de coloniser et donc d'endommager les valves cardiaques. Pour finir, une équipe a pu observer que la protéine Fbl n'était pas impliquée dans l'invasion de cellules endothéliales ou épithéliales (avec, respectivement, les lignées EA.hy 926 ou 5637)¹¹⁹. En effet, ils ne constatent pas de différence dans l'invasion de ces cellules entre une souche sauvage (Fbl +) et une souche mutée (Δ Fbl). Selon ces auteurs, un autre mécanisme, potentiellement dépendant d'une protéine d'adhésion à la Fibronectine, est impliqué dans ce phénomène.

Pour conclure cette partie, il est possible de constater un manque global de connaissances vis-à-vis de ces protéines d'adhésion. Bien que certaines ont été partiellement caractérisées, telles que les protéines d'adhésion au fibrinogène ou au facteur Von Willebrand, beaucoup d'éléments restent à caractériser. Ainsi, de nombreux essais ont été réalisés avec la bactérie entière, démontrant ainsi une capacité globale d'adhérence de la bactérie plutôt que l'effet d'une protéine en particulier. De plus, de nombreuses protéines restent encore à caractériser. Ainsi une étude évaluant l'impact d'une délétion des gènes *fbl*, et *VWfbp* démontre que des délétions d'un seul gène codant une protéine de surface n'influent que très légèrement sur la virulence des endocardites. En revanche, la mutation du

gène codant la sortase A amoindri significativement la virulence de la souche par rapport à la souche sauvage¹²⁰. Ainsi, cette étude démontre un effet global dû à l'inactivation de la capacité d'ancrage des protéines de surface plutôt qu'à une protéine en elle-même.

2) Peptides cytolytiques / Hémolysines

Le génome de *Staphylococcus lugdunensis* code pour deux hémolysines ; une delta-like hémolysine¹²¹ (similaire à *Staphylococcus aureus*) et une potentielle hémolysine III¹⁰¹. Cette première étude démontre l'existence d'un gène similaire à la δ -hémolysine de *S. aureus* bien que les gènes codant les alpha, beta et gamma hémolysines semblent absents. Cet auteur démontre par la suite que contrairement à la δ -hémolysine de *Staphylococcus aureus*, celle-ci n'est pas codée dans le locus *agr*¹²². L'activité hémolytique des souches isolées en clinique est par ailleurs souvent observée (90% des souches) au cours de séries cliniques¹²³. La δ -hémolysine, qu'elle soit synthétisée par *S. lugdunensis* ou par *S. aureus*, est un peptide de 26 acides aminés structurés sous la forme d'une hélice α unique. La δ -hémolysine appartient à une catégorie de peptides aux propriétés similaires regroupés sous le terme de PSM (« phenol-soluble modulins »). De par leurs compositions (et leurs charges), ces peptides amphipathiques peuvent s'intégrer aux membranes et former des pores transitoires. De telles structures déstabilisent l'intégrité cellulaire et conduisent à sa lyse¹²⁴. Il a également été démontré que les PSMs de type α produits par *Staphylococcus aureus* permettent également de lyser les neutrophiles suite à la phagocytose de la bactérie¹²⁵.

Staphylococcus lugdunensis produit également trois peptides de 43 acides aminés (PSMs de type β) nommés SLUSHA, SLUSHB et SLUSHC¹²⁶. Bien qu'ils ne présentent pas de réelle homologie avec la δ -hémolysine, ces peptides exercent une activité hémolytique en synergie avec la δ -like hémolysine. Ces quatre peptides, de par leur activité hémolytique, peuvent également libérer l'hémoglobine en lisant les érythrocytes et permettre à *Staphylococcus lugdunensis* de pourvoir à ses besoins en fer¹²⁴.

3) Compétition pour le fer

Afin d'appréhender au mieux cette partie, il semble important de rappeler que le fer est un nutriment essentiel au bon développement bactérien. Il s'agit d'un élément essentiel

dans de nombreux processus biochimiques (respiration, cofacteur enzymatique). Paradoxalement, c'est également un élément très peu biodisponible à l'état soluble dans l'organisme puisqu'il est majoritairement séquestré par des molécules chélatrices (hème, lactoferrine, transferrine). Pour finir, l'hôte organise en condition d'infection une immunité nutritionnelle orchestrant ainsi toute une série de processus aboutissant à une réduction de la concentration en fer¹²⁷. Il devient donc vital pour la bactérie de produire des molécules capables d'extirper le fer de l'organisme pour le transporter jusque dans son cytoplasme¹²⁸.

Le séquençage du génome de la souche N920143 a permis de mettre en évidence une première singularité de *Staphylococcus lugdunensis*¹⁰¹. En effet, cette bactérie est la seule parmi les CoNS à posséder un locus codant des protéines de surface régulées par le fer (locus *Isd* pour iron surface determinants). Bien que l'ensemble du mécanisme ne soit pas résolu, le rôle de certaines protéines a été élucidé. Quatre protéines (IsdB, IsdC, IsdJ et IsdK) ont pour fonction de fixer l'hème. L'interaction entre ces protéines et l'hémoglobine est localisée au niveau de domaines NEAT (near iron transporter). Parmi ces quatre protéines, deux sont encrées à la membrane et la paroi par les sortases A et B (IsdB et IsdC) tandis que les deux autres (IsdJ et IsdK) semblent avoir une localisation membranaire. Les auteurs théorisent donc que l'hème est capté par des hémophores (IsdX1 et IsdX2) avant d'être transporté puis capté par IsdB qui est ancrée à cette paroi. Un transfert du complexe vers IsdC se met en place afin de faciliter le transport à travers la paroi cellulaire. Le complexe hème-fer est ensuite potentiellement transporté à travers la membrane par l'intermédiaire d'un transporteur ABC et composé des protéines IsdDEF chez *S. aureus*¹²⁹. Ensuite, la protéine IsdG, une hème oxygénase, va dégrader le complexe hème-fer dans le cytoplasme afin de libérer le fer chélaté¹³⁰. Elle est également surexprimée pour faciliter la survie de *Staphylococcus lugdunensis* en milieu carencé en fer¹³⁰. De plus, IsdJ possède également la capacité de fixer le fibrinogène et possède une activité protectrice contre l'acide linoléique¹³¹. Une équipe a aussi démontré l'implication d'IsdP, une autolysine dont la synthèse est aussi régulée par le fer. Cette enzyme peut dégrader le peptidoglycane et donc remodeler la structure de la paroi cellulaire. En clivant certains domaines du peptidoglycane, IsdP permet notamment d'accroître les zones d'ancrage d'IsdC et facilite la capture du complexe hème-fer¹³². *Staphylococcus lugdunensis* s'assure ainsi de récupérer un maximum de fer en provenance du

milieu extérieur. Pour finir, il a été démontré que la duplication du locus *isd* confère à la bactérie un avantage significatif en condition de carence en fer¹³³.

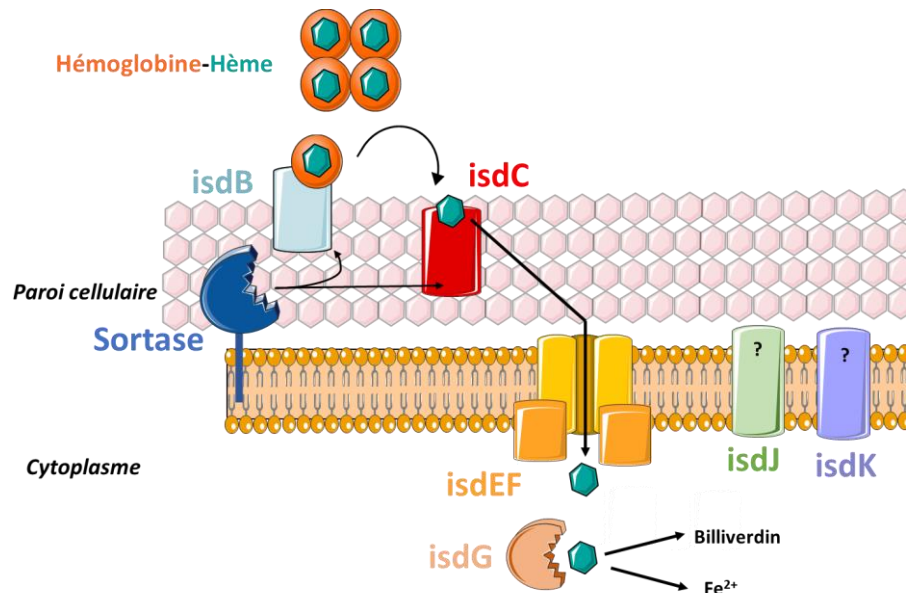


Figure 8 : Schéma représentatif des interactions entre les différentes protéines Isd mise en évidence dans diverses publications

Staphylococcus lugdunensis possède également dans son génome le locus *sst* dupliqué¹⁰¹. Malheureusement, ce locus n'a été étudié que chez *Staphylococcus aureus*. Brièvement, il s'agit d'un opéron codant quatre gènes *sstA*, *sstB*, *sstC* et *sstD*. SstA et B sont deux protéines membranaires (perméases) tandis que SstC est une ATPase (les trois formant ainsi le transporteur ABC)¹³⁴. SstD, quant à elle, est ancrée à la membrane, dirigée vers l'extérieur, afin de capter les sidérophores synthétisés par *Staphylococcus aureus* mais aussi des sidérophores exogènes (entérobactine, salmochéline S4)¹³⁵. Ce type de transporteur de sidérophores pourrait donc renforcer la persistance de *Staphylococcus lugdunensis* en milieu carencé.

A l'heure actuelle, aucune publication ne mentionne le transport d'autres éléments, tel que le zinc, chez *Staphylococcus lugdunensis* bien que des gènes codants des transporteurs de zinc soient annotés sur le génome.

4) Production de biofilm

De manière générale, le genre *Staphylococcus* est réputé pour sa production de biofilm. Un biofilm se définit comme une communauté microbienne agrégée dans une matrice extracellulaire complexe, fixée à une surface biotique ou abiotique, ou sous forme d'agrégats libres en solution¹³⁶. La formation d'un biofilm se déroule en plusieurs étapes distinctes impliquant ainsi une grande variété de facteurs bactériens.

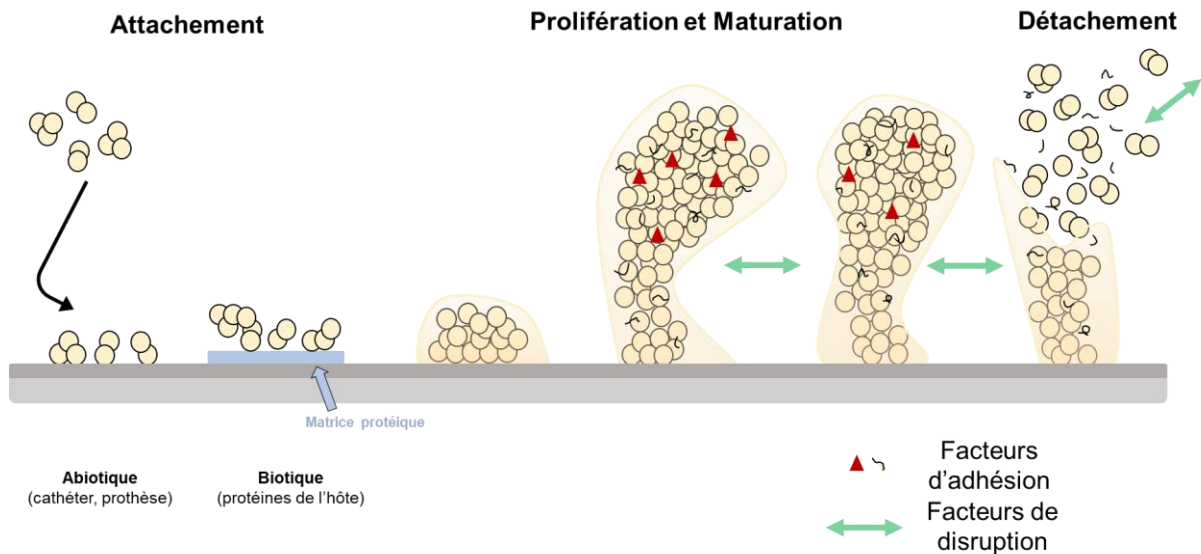


Figure 9 : Schéma représentatif du développement d'un biofilm Staphylococcique
Schéma traduit de l'anglais et inspiré de Michael Otto¹³⁶.

Staphylococcus lugdunensis ne fait pas exception puisque différentes études permettent d'observer que la majorité des souches utilisées sont productrices de biofilm bien que l'on puisse constater d'importantes variations entre certaines souches^{137,138}. Il apparaît alors clairement que la capacité à former un biofilm peut être associée à certaines pathologies. En effet, des souches isolées à partir d'infections ostéoarticulaires à l'hôpital de Strasbourg produisent très rapidement un biofilm¹³⁸. Un constat similaire est réalisé lors d'une autre étude¹¹². En effet, bien que seulement 38 % des souches étudiées soient productrices de biofilm, la plupart des souches associées à des infections sur prothèses partagent un phénotype positif.

Quoi qu'il en soit, la capacité de production d'un biofilm par *Staphylococcus lugdunensis* est à considérer avec une attention particulière. Il a notamment été démontré que de telles structures amélioreraient la survie de la bactérie face aux antibiotiques ou aux

molécules anti staphylococciques, les concentrations bactéricides sur biofilm (BBCs) étant bien supérieures à celles observées sur des formes planctoniques¹³⁹. Ainsi notre équipe suggère, par exemple, de réaliser une antibiothérapie immédiate lors d'un échange de prothèse en une étape¹³⁸. Le but étant d'éviter qu'un délai trop important s'écoule, afin d'empêcher l'installation d'un biofilm.

A) Etape d'adhésion

Dans un premier temps, *Staphylococcus lugdunensis* doit adhérer à une surface. Dans le cadre d'une surface biotique, cet attachement nécessite la production de facteurs d'adhésion représentés chez *Staphylococcus lugdunensis* par des protéines telles que les facteurs d'adhésion au fibrinogène ou au facteur de Von Willebrand. Ces protéines de la famille des MSCRAMMs, ainsi que d'autres protéines non caractérisées chez *Staphylococcus lugdunensis*¹⁰¹, permettent à la bactérie d'adhérer aux cellules endothéliales ou à adhérer à la matrice extracellulaire de l'hôte. Bien que la formation de biofilm chez *Staphylococcus lugdunensis* ne soit pas aussi étudiée que chez certains homologues tels que *Staphylococcus aureus* ou *S. epidermidis*, certaines études ont pu démontrer l'implication de protéines ne faisant pas partie de la famille des protéines d'adhésion. Ainsi, la protéine IsdC, impliquée dans la capture du fer, est capable d'induire la formation de biofilm en condition de carence en fer¹⁴⁰. Dans cette étude, les auteurs constatent qu'IsdC promeut l'attachement initial sur le polystyrène (boîte de Pétri) et cela en condition de carence en fer. Cette dernière condition favorise notamment l'expression des protéines Isd, dont IsdC, qui semblent être sous la dépendance du régulateur transcriptionnel Fur. Ainsi, la faible disponibilité en fer maximise l'abondance de la protéine IsdC à la surface cellulaire. De plus, IsdC est capable de former des homodimères, facilitant potentiellement les interactions entre deux bactéries adjacentes. Une autolysine, produite sous le nom d'AtIL et présentant des homologies avec les autolysines, AtIA (*S. aureus*) et AtIE (*S. epidermidis*), semble également favoriser l'étape d'attachement^{141,142}. En effet, la mutation de cette grande protéine (1278 résidus d'acides aminés) inhibe grandement la formation de biofilm dans ces deux études. Les auteurs démontrent aussi qu'AtIL permet d'adhérer avec une forte affinité à la vitronectine et dans une moindre mesure au fibrinogène et à la fibronectine¹⁴¹. De plus l'autolysine AtIL favorise également l'adhésion à certaines cellules humaines (lignées EA.hy926 (cellules endothéliales)

et 5637 (cellules épithéliales))¹⁴¹. Ainsi, l'autolysine, par l'intermédiaire de régions répétées favorise l'adhésion initiale de *Staphylococcus lugdunensis* en se liant aux protéines de l'hôte.

L'attachement aux surfaces abiotiques, tels qu'un cathéter ou une prothèse, fait intervenir des interactions hydrophobes ou ioniques non spécifiques¹⁴³.

B) Prolifération et maturation du biofilm

Au cours de cette étape, les bactéries ayant adhéré sur une surface commencent à proliférer. En parallèle, ces bactéries vont produire et sécréter un ensemble de molécules qui vont permettre de constituer une matrice. De manière générale, la matrice des biofilms produits par le genre *Staphylococcus* est composée de protéines, de polysaccharides et d'ADN extracellulaire (ADNe)¹³⁶.

Staphylococcus lugdunensis possède, comme les autres staphylocoques, un locus *icaADBC* dans son génome¹⁰¹. Cet opéron fut séquencé chez *Staphylococcus lugdunensis* et se compose de quatre gènes, *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC* et d'un potentiel cinquième gène codant une enzyme à activité glycoside hydrolase (cadre ouvert de lecture de 4750 pb). Chez *Staphylococcus aureus*, cet ensemble de gènes permet la synthèse et la sécrétion de poly-*N*-acétylglucosamine (PNAG), également retrouvé sous le terme de polysaccharide d'adhésion intercellulaire (PIA). Dans ce système, *icaR* code une protéine de répression de la transcription de l'opéron. Cependant, ce gène semble être absent dans le génome de *Staphylococcus lugdunensis*¹³⁷. Malgré la présence de ce locus *icaADBC*, le PNAG ne représente pas le composant majeur de la matrice. En effet, des tests d'immunomarquage ont démontré que le biofilm produit par *Staphylococcus lugdunensis* contenait beaucoup moins de PNAG que certaines souches réputées pour leur production abondante (*S. epidermidis*, souche RP62A). A l'inverse, la détection de protéines par SYPRO Ruby révèle une importante quantité de protéines agrégées dans le biofilm¹³⁷. Ces mêmes auteurs confirment l'importance des protéines en démontrant que le biofilm produit par *S. lugdunensis* pouvait être détaché par l'action de protéases plutôt que par l'action de molécules dégradant les carbohydrates (sodium métaperiodate). Ces observations sont partiellement confirmées par une étude analysant la composition des biofilms synthétisés par 22 souches de *Staphylococcus lugdunensis*¹⁴⁴. En effet, la plupart de ces 22 souches (19/22 souches, dont la souche N920143) produisent un biofilm majoritairement protéique. En comparaison, les trois souches dont le

PNAG est majoritaire produisant de très grandes quantités de biofilm. D'autres publications rapportent aussi des biofilms de composition majoritairement protéique¹⁴⁰. Malheureusement, aucune protéine composant cette matrice ne fut caractérisée au cours de ces expérimentations.

Le biofilm de *Staphylococcus lugdunensis* est également renforcé par de l'ADN extracellulaire. Au cours de cette même étude, les auteurs révèlent que le biofilm de toutes les souches étudiées contient de l'ADNe¹⁴⁴. Face à ce constat, une publication expose l'importance de l'ADNe pour l'intégrité du biofilm par des tests de digestion par la DNase I¹⁴⁵. Les auteurs démontrent ainsi qu'un traitement préventif aboli la formation de biofilm chez *Staphylococcus lugdunensis*, contrairement à des souches dont le PNAG est majoritaire (*S. epidermidis*, souche RP62A). De plus, ils démontrent également l'importance de l'opéron *comE* pour la présence d'ADNe à l'intérieur du biofilm. Cet opéron, chez *Staphylococcus lugdunensis*, est constitué de trois gènes, *comEA*, *comEB* et *comEC*, mais les produits ne sont pas caractérisés. Des manipulations génétiques ont permis de mettre en évidence que cet opéron intervient dans le relargage d'ADNe et ce, de manière totalement indépendante d'une lyse cellulaire¹⁴⁵.

C) Détachement du biofilm

L'ultime étape dans l'existence du biofilm est représentée par la dissémination des bactéries dans l'hôte qui les abrite. La dégradation de la matrice créée précédemment fait intervenir différents facteurs tels que des peptidases et des nucléases. Le rôle de ces enzymes est d'hydrolyser ces éléments structuraux, afin de perturber l'organisation tridimensionnelle du biofilm. D'autres éléments comme les PSMs agissent aussi comme agents surfactants responsables de la rupture d'interactions non covalentes¹³⁶.

Cependant, aucune étude ciblant particulièrement ce processus n'est encore réalisée sur *Staphylococcus lugdunensis*. Compte tenu de la haute teneur en protéines des biofilms, ainsi que des publications précédemment citées, le biofilm de *Staphylococcus lugdunensis* semble particulièrement sensible à l'action de peptidases. En effet, quelques études réalisant des tests de détachement constatent que les protéases telle que la protéinase K permettent de décrocher les bactéries de leur matrice^{137,140}. Cependant, ces études ne permettent pas

l'identification d'un facteur enzymatique précis qui s'avère être responsable du détachement par hydrolyse des protéines structurant du biofilm.

5) Autres facteurs de virulence

A) Streptolysine S-like.

Le génome de *Staphylococcus lugdunensis* code potentiellement un locus permettant la synthèse et l'export d'une toxine de type streptolysine S¹⁰¹. Cet opéron fut caractérisé chez *Streptococcus pyogenes* (streptocoque du groupe A) et contient un ensemble de 9 gènes dont l'un, *sagA*, code le précurseur de 53 acides aminés de la streptolysine S. Les autres gènes de l'opéron permettent les modifications post traductionnelles, et l'export de la toxine (clivage du peptide signal, transport à travers la membrane)¹⁴⁶. La streptolysine S est considérée comme un véritable facteur de virulence puisqu'elle participe au quorum sensing, à la destruction des leucocytes, des plaquettes ainsi que des érythrocytes. Elle est aussi impliquée dans l'apparition de dommages tissulaires, ainsi que dans l'invasion des tissus¹⁴⁶. Bien qu'étudiée chez *Staphylococcus aureus*¹⁴⁷, aucune étude ne fut réalisée sur *Staphylococcus lugdunensis*. Malgré les similarités entre les deux facteurs, il est difficile de conclure quant à l'impact réel de ce facteur.

B) La catalase

Comme évoqué lors des tests d'identification phénotypique, *Staphylococcus lugdunensis* produit, à de très rares exceptions près¹⁴⁸, une catalase. Bien que son impact n'ait pas été étudié chez *Staphylococcus lugdunensis*, la production d'une catalase est souvent interprétée comme la production d'un facteur de virulence^{148,149}. En effet, la catalase de *Staphylococcus aureus* (KatA) est impliquée par exemple dans la résistance au stress oxydatif, et par conséquent favorise l'évasion face au système immunitaire¹⁵⁰, ainsi que dans la colonisation nasale de la bactérie¹⁵¹.

C) La toxine β ou sphingomyélinase C

Le génome de *Staphylococcus lugdunensis* code également une enzyme (sphingomyélinase) similaire à celle synthétisée par *Staphylococcus aureus*. Bien que la structure de la toxine- β ¹⁵² fut résolue chez ce dernier, relativement peu d'informations sont disponibles à son sujet. Il s'agit d'une enzyme de 35 KDa interagissant avec les érythrocytes tout en provoquant leur lyse, mais uniquement à 4°C. Il a surtout été démontré que la toxine- β pouvait moduler la réponse immunitaire par une action cytotoxique sur les lymphocytes T¹⁵², les monocytes¹⁵³ et certains leucocytes¹⁵⁴.

D) La lugdunine

Une équipe a découvert en 2016 qu'une souche de *Staphylococcus lugdunensis* (souche IVK28), isolée à partir d'un prélèvement nasal, entraîne une inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus*¹⁵⁵. La molécule incriminée dans l'inhibition bactérienne est alors nommée Lugdunine. Cette équipe découvre également que la synthèse de cette molécule est la conséquence de l'expression notamment de quatre gènes (*lugA*, *lugB*, *lugC* et *lugD*) organisés en opéron. Ces gènes codent des enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (NRPS). L'opéron *lug* code également l'ensemble des protéines nécessaires au transport et l'export de la lugdunine à travers la membrane (*lugE-H*, codant un potentiel transporteur ABC etc). Compte tenu du % de G/C et de l'omniprésence de cet opéron dans une collection de souches, les gènes *lug* semblent avoir été acquis par un transfert de gène horizontal et sont spécifiques de l'espèce *S. lugdunensis*¹⁵⁵.

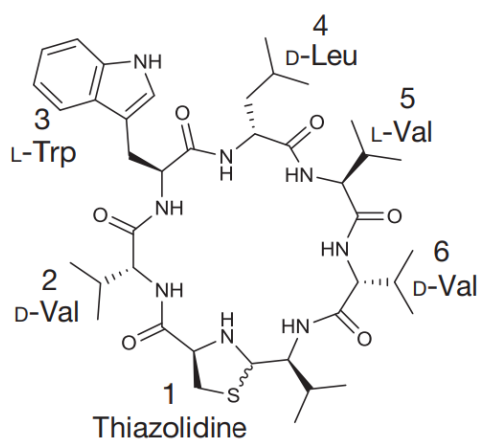


Figure 10 : Structure de la lugdunine

La lugdunine est un peptide cyclique constitué de cinq acides aminés : D-Valine, L-Tryptophane, D-Leucine, L-Valine et D-Valine, ainsi que d'un groupement thiazolidine. Bien que son mode d'action ne soit pas encore élucidé, la lugdunine exerce une activité antimicrobienne in vitro contre de nombreuses bactéries à Gram + pathogènes, et notamment des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline ou partiellement résistantes aux

glycopeptides, ainsi que des souches d'*Enterococcus* résistantes à la vancomycine. Cette

activité antimicrobienne a également été prouvée, *in vivo*, sur un modèle d'infection à *Staphylococcus aureus* (Souris C57BL/6). En effet, après développement d'une infection cutanée, les souris traitées avec une pommade à base de lugdunine montrent une réduction importante voire une éradication complète de *S. aureus* au niveau des zones cutanées et plus profondes¹⁵⁵. Les avantages de cette molécule sont multiples. Tout d'abord, la lugdunine ne semble pas avoir d'impact négatif sur les cellules humaines. Ainsi, les neutrophiles et les érythrocytes ne sont pas lysés et le métabolisme d'une lignée cellulaire de monocytes (lignée HL60) ne semble pas affecté par la présence de lugdunine¹⁵⁵. De plus, cette molécule amplifie la réponse immunitaire humaine en induisant une surexpression des peptides antimicrobiens humains HBD-1 et 2, ainsi que celle du peptide LL37 par les kératinocytes. La lugdunine favorise également la production et la sécrétion de l'interleukine 8 induisant alors le recrutement de cellules phagocytaires telles que les monocytes et les neutrophiles¹⁵⁶.

E) Modifications de la paroi bactérienne

Les systèmes de modification de la paroi cellulaire sont largement répandus chez les staphylocoques. *Staphylococcus lugdunensis* ne fait pas exception puisque son génome code notamment le gène *oatA* responsable de la synthèse d'une peptidoglycane O-acétyltransférase (OatA). Ce gène est homologue à celui de *Staphylococcus aureus* et code une protéine membranaire constituée par dix domaines transmembranaires potentiels. Cette enzyme catalyse l'acétylation du peptidoglycane et confère, ainsi à la bactérie une résistance au lysozyme¹⁵⁷. Le lysozyme est une peptidoglycane N-acétylmuramoylhydrolase responsable de l'hydrolyse des liaisons β -1,4-glycosidiques du peptidoglycane et localisées entre l'acide N-acétylmuramique et le N-acétylglucosamine¹⁵⁸. Par ailleurs, il a été démontré que cette enzyme favorise grandement la survie de *Staphylococcus lugdunensis* à la phagocytose ce qui permet à la bactérie de persister à l'intérieur des macrophages¹⁵⁹.

Le séquençage du génome de *Staphylococcus lugdunensis* a également mis en évidence l'existence de l'opéron *dltABCD* et du gène *mprF*¹⁰¹. Chez *Staphylococcus aureus*, l'opéron *dltABCD* code quatre protéines impliquées dans l'activation puis le transport et l'intégration de D-Alanine (chargé positivement) dans la paroi cellulaire¹⁶⁰. Le gène *mprF*, quant à lui, code une protéine de modification du phosphatidylglycérol (PG). Cette enzyme permet d'incorporer de la L-Lysine par une réaction d'estérification du PG permettant ainsi

d'obtenir une membrane lipidique constituée de lysyl-PG, chargée positivement¹⁶¹. Il a été démontré chez *Staphylococcus aureus* que l'inactivation de l'opéron *dltABCD* et du gène *mprF* accentue grandement la sensibilité de la bactérie pour les peptides antimicrobiens humains. En effet, l'accumulation de charges positives à la paroi et la membrane bactérienne permet d'amoinrir les effets antimicrobiens de peptides tels que LL37, HBD1 ou HBD 2^{160,161}. Malheureusement, aucune étude évalue l'importance de ces gènes directement chez *Staphylococcus lugdunensis*.

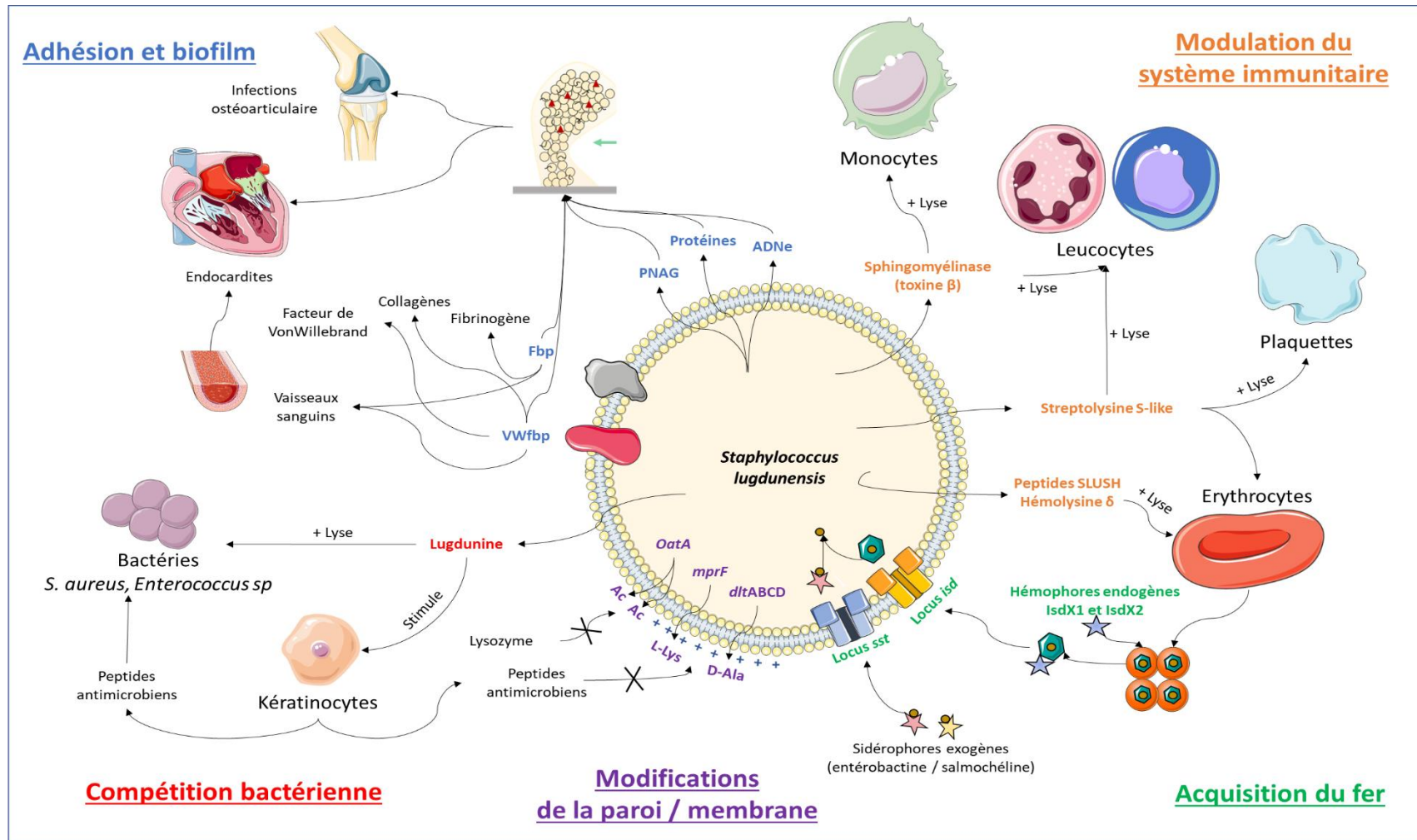


Figure 11 : Principaux facteurs de virulence associés à *Staphylococcus lugdunensis*

Les différents facteurs de virulence sont regroupés par un code couleur représentant leurs activités probables, ou avérées.

6) Conclusion et mise en contexte de la thèse

L'état des connaissances à propos des facteurs de virulence synthétisés par *Staphylococcus lugdunensis* souffre de nombreuses lacunes. Il en résulte donc un ensemble de données éparses dont la précision varie selon l'intérêt apporté au sujet. Ainsi, la lugdunine ou encore les méthodes d'acquisition du fer ont fait l'objet d'études poussées^{101,130,132,133,155,156}. En revanche, un grand nombre de facteurs de virulence sont restés à l'état d'éléments potentiels. Les analogies avec d'autres bactéries du genre *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis* étant les plus étudiés) restent nombreuses. Ainsi, des éléments de régulations, comme le locus *agr*, n'est décrit chez *Staphylococcus lugdunensis* qu'à travers le prisme de son homologue *S. aureus*. C'est en partie pour cette raison que ce système ainsi que d'autres éléments n'ont pas été traités dans ce manuscrit. En effet, une analyse par analogie de structure primaire ou de fonction probable peut comporter certaines limites. Par exemple, bien que présent dans 100 % des souches, le locus *ADBC*, responsable de la production de PNAG dans les biofilms staphylococciques, ne semble pas être un élément majeur dans la conception de la matrice¹³⁷. La présence d'un ensemble de gènes n'est pas toujours synonyme de l'expression ou de l'activité de leurs produits, tout du moins jusqu'à ce que des manipulations génétiques ne le confirment. Les résultats présentés ci-dessus sont donc à prendre avec précaution.

Afin de continuer dans cette démarche, notre équipe a mis au point, par l'intermédiaire du Dr Xavier Argémi, une étude prospective, nommée VISLISI²⁶. Cette étude regroupe un total de 81 infections avérées à *Staphylococcus lugdunensis* et traitées au Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg sur une période de 4 ans (2013-2016). Les infections les plus fréquemment rencontrées au cours de cette étude sont les infections ostéoarticulaires (28/81), sur prothèse (16/81) ou sur tissus natifs (12/81). Dans l'optique d'associer un facteur de virulence à la survenue d'une infection, différents tests d'identification ont été réalisés : identification de la protéine d'adhésion au fibrinogène, de facteurs hémolytiques et leucotoxiques, de protéases extracellulaires et de résistances aux antibiotiques. C'est de cette manière que l'importance d'une peptidase extracellulaire fut révélée. En effet, le test d'identification de protéases, réalisés avec un substrat peu spécifique, l'azocaséine, révèle que 50 des 81 souches VISLISI développent une activité protéolytique dans leur surnageant de culture. De plus, la production

d'une protéase active est fortement associée à la survenue d'infections profondes (pr = 0,97), aux bactériémies (pr = 0,90) ainsi qu'aux infections ostéoarticulaires, sur prothèse ou tissu natif (pr = 0,91). Par la suite, la quantification de la quantité de cette protéase nous indiqua qu'elle représentait environ 30 % des protéines présentes dans le surnageant de culture. De telles quantités nous permirent donc de mettre au point un protocole de purification suffisamment discriminant pour initier un séquençage par spectrométrie de masse. La séquence primaire ainsi obtenue correspond à une potentielle zinc métallopeptidase dont un gène parent, nommé *shp1* (*Staphylococcus hyicus protease 1*), fut initialement décrit dans le génome N920143. Cette appellation est due aux similarités retrouvées entre les deux gènes. Pour une meilleure compréhension, ce gène fut donc renommé *slp1* dans le génome VISLISI_22, séquencé au cours de cette même étude. Cette peptidase fut nommée lugdulysine en rapport à son homologue caractérisée chez *Staphylococcus hyicus*. L'hycolysine est la seule zinc métallopeptidase de la famille M30 identifiée et caractérisée¹⁶². Cependant, la seule publication relative à l'Hycolysine et plus généralement à cette famille date de 1994 et ne s'avère être qu'une caractérisation partielle avec des outils moléculaires peu précis. L'absence de données précises pour définir la famille M30 nous a donc conduit à enquêter sur l'impact d'une telle enzyme lors du processus infectieux. Cependant, nous avons été rapidement confrontés à l'absence de données de référence (structure tridimensionnelle, études *in vitro*...). A l'inverse, une rapide étude bibliographique des métalloprotéases bactériennes révèle une multitude d'activités pathologiques. Leurs propriétés et modes d'action seront résumés dans le prochain chapitre, afin de mieux appréhender la démarche scientifique suivie au cours de cette thèse.

La place des métallopeptidases bactériennes en tant que facteurs de virulence

Ce chapitre a pour objectif principal de rassembler et de résumer un maximum d'informations à propos des enzymes et plus particulièrement des métallopeptidases. Ces protéines particulières peuvent être définies, de manière très simplifiée, comme des protéines qui déclenchent et accélèrent une réaction biologique. Ainsi, un phénomène se produisant sur plusieurs années peut être résolu en quelques secondes grâce à l'intervention de l'enzyme (Figure 12).

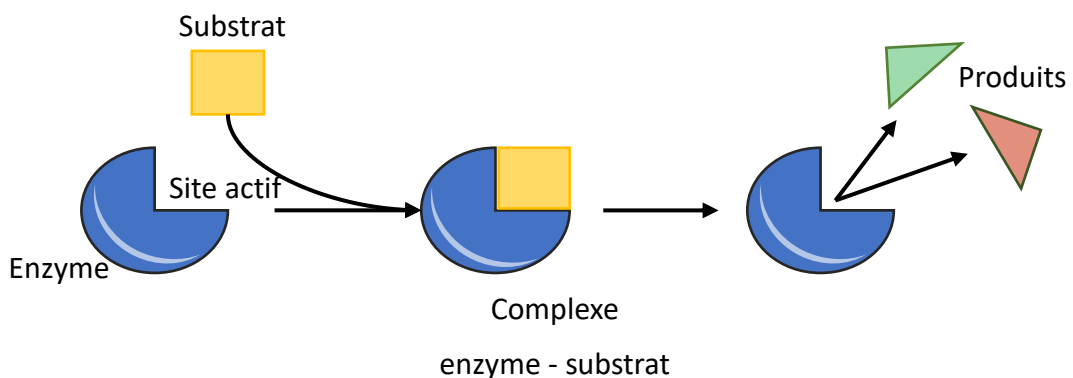


Figure 12 : Schéma simplifié d'une réaction enzymatique selon le modèle « clef-serrure »

Le substrat (en jaune) entre dans un premier temps dans le site actif de l'enzyme. Un complexe transitoire enzyme – substrat se forme. Le substrat est alors transformé en produit (dans cet exemple, le substrat est clivé en deux produits distincts).

Ce chapitre s'intéresse longuement à la nomenclature des métallopeptidases, et plus généralement des enzymes, tout en s'efforçant de respecter au mieux la terminologie recommandée. Ainsi, le terme « peptidase » est à privilégier aux termes de « protéases » ou « protéinases ». Ces éléments de langage peuvent parfois entraîner des confusions. Des enzymes comme la Thermolysine, l'Hycolysine ou encore la Lugdulysine, par exemple, n'entraînent pas une lyse au sens strict du terme, mais bien une hydrolyse de liaisons

peptidiques. De plus, se conformer au terme de peptidase favoriserait grandement la recherche par mots clefs. Cela permet également de s'affranchir des termes utilisés à leur origine pour des enzymes précises et qui ne s'accommodent pas toujours aux nouvelles enzymes découvertes. Une fois les éléments de classifications énoncés, ce chapitre traitera des éléments fonctionnels essentiels des métallopeptidases comme le site actif et la poche catalytique. Pour finir, les mécanismes catalytiques et d'inhibitions seront abordés.

1) Les peptidases, quelques points de nomenclature et de classification

A) Classification EC.

Le « Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology » (NC-IUBMB) divise les enzymes en 7 catégories distinctes. Les oxydoréductases (EC 1), les Transférases (EC 2), les Hydrolases (EC 3), les Lyases (EC 4), les Isomérases (EC 5), les Ligases (EC 6), les Translocases (EC 7). Les enzymes organisées selon la classification EC sont consultables dans l'Enzyme Database (<https://www.enzyme-database.org>). ExplorEnz est un serveur mis en place par le Trinity College Dublin^{163,164}. Cette classification s'appuie notamment sur le fonctionnement des enzymes répertoriées et attribue à chaque enzyme une numérotation de quatre chiffres précédés de la mention EC (EC.X.X.X.X). Les hydrolases (EC 3.), par exemple, catalysent le clivage de diverses liaisons covalentes en impliquant la participation d'une molécule d'eau. Ces grandes familles sont ensuite subdivisées en sous catégories selon leur cibles privilégiées. Ainsi, parmi les hydrolases pas moins de treize sous catégories ont été formulées :

- EC 3.1 : Enzymes actives sur les liaisons ester
- EC 3.2 : Glycosylases
- EC 3.3 : Enzymes actives sur les liaisons éther
- EC 3.4 : Enzymes actives sur les liaisons peptidiques
- EC 3.5 : Enzymes actives sur les liaisons C-N (autres que les liaisons peptidiques)
- EC 3.6 : Enzymes actives sur les anhydres d'acide
- EC 3.7 : Enzymes actives sur les liaisons carbone-carbone
- EC 3.8 : Enzymes actives sur les liaisons halogènes
- EC 3.9 : Enzymes actives sur les liaisons P-N

- EC 3.10 : Enzymes actives sur les liaisons S-N
- EC 3.11 : Enzymes actives sur les liaisons P-C
- EC 3.12 : Enzymes actives sur les liaisons S-S
- EC 3.13 : Enzymes actives sur les liaisons C-S

Les protéases, enzymes protéolytiques, protéinases ou encore peptidases, dont la Lugdulysine fait partie, sont autant de termes décrivant les enzymes appartenant à la catégorie EC 3.4. Cette instance internationale recommande l'utilisation du terme « peptidase » pour décrire les enzymes catalysant l'hydrolyse de liaisons peptidiques, les autres termes faisant références historiquement à d'autres sous catégories enzymatiques. La classification EC se ramifie encore (EC 3.14.X, dont X est un chiffre associé à chacune des 14 sous catégories présentes). A ce stade de la ramification, la classification distingue les peptidases selon leur mécanisme enzymatique et selon les résidus d'acides aminés impliqués dans la catalyse. Pour exemple, les métallopeptidases sont divisées en deux groupes Métallocarboxypeptidases (EC 3.4.17) et en Métalloendopeptidases (EC 3.4.24). Chacun de ces sous-groupes contient alors les différentes enzymes dont les mécanismes enzymatiques ont été validés. Le quatrième chiffre correspond alors au nom donné à une enzyme : EC 3.4.24.27 correspond spécifiquement à la Thermolysine.

Bien qu'intéressante, la nomenclature EC souffre de lacunes inhérentes à la grande variété de peptidases caractérisées. En effet, si certaines peptidases possèdent une très grande spécificité de substrat (clivage d'un substrat unique), d'autres peptidases ne possèdent pas cette spécificité et leur mode d'action reste flou. Par conséquent, certaines enzymes peu caractérisées, comme l'Hycolysine, ne sont pas référencées dans l'Enzyme database.

B) La classification MEROPS

Une seconde classification, complémentaire de la première, a vu le jour en 1993¹⁶⁵. En cette période, les auteurs analysent les séquences primaires de 600 peptidases. Les enzymes partageant des homologies vis-à-vis de l'intégralité de leurs séquences, ou tout du moins, avec des sites actifs communs, sont rassemblées en familles. Ils observent également que certaines de ces familles ont évolué à partir d'ancêtres communs, même si les séquences primaires de

ces enzymes varient fortement, et façonnent ainsi des clans. Ces travaux sont à la base de la création de la banque de données connue sous le nom de MEROPS Database (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). Actuellement, la MEROPS Database est une source d'informations formidable en ce qui concerne les peptidases (et uniquement les peptidases, EC 3.4.X.X) ainsi que leurs substrats et leurs inhibiteurs¹⁶⁶. Entre 1993 et 2018, la quantité d'informations disponibles sur les peptidases a grandement évolué. Ainsi, la MEROPS Database regroupe désormais ces enzymes selon l'« espèce » (chaque « espèce » est représentée par un identifiant à une lettre unique). Il est possible de distinguer les peptidases à acide aspartique (A), à cystéine (C), à acide glutamique (G), les métallopeptidases (M), à asparagine (N), les peptidases mixtes (P), les sérine peptidases (S), les thréonine peptidases (T) et les peptidases inconnues (U).

A l'intérieur de ces vastes affiliations, les peptidases sont groupées en « familles » dont les séquences primaires présentent des homologues significatives. Pour être affiliées à une même famille, deux enzymes doivent au moins posséder un site catalytique similaire. En parallèle, différentes familles peuvent être associées en « clans » lorsqu'elles regroupent des enzymes aux structures tertiaires similaires. Lorsque les structures tridimensionnelles ne sont pas résolues, les clans regroupent des enzymes dont le site actif et les résidus catalytiques sont identiques. Chaque famille et chaque clan peuvent également être subdivisés et sont annotés respectivement par un chiffre et une lettre.

[2\) Les métallopeptidases, caractéristiques générales et classification](#)

A) Eléments de classification

Les métallopeptidases sont des enzymes synthétisées par la plupart des organismes, Procaryotes comme Eucaryotes^{167,168}. Dans l'ensemble, les métallopeptidases représentent à elles-seules, 29 % de l'ensemble des peptidases sécrétées dans les différents règnes du vivant¹⁶⁷. Les auteurs de cette étude démontrent également l'existence d'un corpus de 7 familles de métallopeptidases commun à l'ensemble des formes de vie cellulaire. Une large étude prospective, basée sur l'analyse de 2191 génomes bactériens et 147 génomes d'archées, confirme l'abondance des métallopeptidases sécrétées dans ces génomes¹⁶⁹. En effet, 80 % des 55.072 peptidases analysées appartiennent aux superfamilles des sérine

peptidases, des cystéine peptidases ou des métallopeptidases. Parmi l'ensemble des peptidases bactériennes observées, environ 30 % sont apparentées aux zinc métallopeptidases (contre environ 45 % de sérine peptidases). Cette étude s'intéresse également au nombre de métallopeptidases sécrétées par génome. Chez les Firmicutes, par exemple, de grandes disparités existent entre les génomes, avec des souches pouvant synthétiser jusqu'à 90 métallopeptidases différentes. Une telle présence se traduit également par une grande diversité de structures et de fonctions. Selon la classification MEROPS, les métalloprotéases sont réparties en 14 clans distincts et 74 familles. Chaque clan regroupe des enzymes de différentes familles avec un site actif identique ou tout du moins fortement similaires. Le [Tableau 4](#) résume cette classification.

[Tableau 4](#) : Classification des métallopeptidases selon la MEROPS Database

Parmi les 14 clans définis, cinq (MF, MG, MH, MN et MQ) regroupent des enzymes avec un site co-catalytique et possèdent donc deux ions métalliques. Dans certains cas (clans MS et MT et familles non assignées), les enzymes n'ont pas été complètement caractérisées et les motifs de coordination ne sont donc pas clairement définis. Dans le cas contraire, les résidus d'acides aminés en gras correspondent aux éléments de coordination de ou des ions métalliques. Les résidus d'acides aminés impliqués dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques ne sont pas représentés. Lorsque plusieurs résidus d'acides aminés peuvent être observés au sein d'une séquence consensus, ceux-ci sont représentés par un symbole « X ».

Clans	Sous clans	Motifs de coordination des ions métalliques	Familles
MA	MA (E)	His-Glu-X-X-His + Glu	M1, M2, M3A, M3B, M4, M5, M9A, M9B, M13, M26, M27, M30, M32, M34, M36, M41, M47, M48A, M48B, M49, M56, M60, M61, M78, M85
	MA (M)	His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His/Asp	M6, M7, M10A, M10B, M10C, M11, M12A, M12B, M35, M43A, M43B, M54, M57, M64, M66, M72, M80, M84

Clans	Sous clans	Motifs de coordination des ions métalliques	Familles
MC		His-X-X-Glu + Arg/Glu	M14A, M14B, M14C, M14D
MD		His-(X)₆-Asp + D/E-X-X-His	M15A, M15B, M15C, M15D, M74
ME		His-X-X-Glu-His + Glu/His	M16A, M16B, M16C, M44
MF		Gly-Lys-(Gly/Ser)-X-(Thr/Ile/Val)-X-Asp-(Ser/Thr/Ala)-Gly-Gly + Met-X-X-Asp-(Met/Lys)-X-Gly-(Ala/Ser/Gly)-(Ala-Gly) + Asn-Thr-Asp-Ala-Glu-Gly-Arg-Leu	M17
MG		Asp + Asp + His + Glu + Glu	M24A, M24B
MH		His + Asp + Glu + Asp + His	M18, M20A, M20B, M20C, M20D, M28A, M28B, M28C, M28E, M42
MJ		His + His/Asp + Lys/Glu + His + His	M19, M38
MK		His-Met-Glu-Gly-His + Asp	M22
MM		His-Glu-X-X-His + Asp	M50A, M50B
MN		Asp + Glu + His + His + Glu	M55
MO		His-X₃₋₆-Asp + His/Glu-X-His	M23A, M23B
MP		His-Ser-His-Pro-X₉-Asp	M67A, M67B, M67C
MQ		Glu + Glu + His + His + Asp	M29
MS		His-X-X-Glu + ?	M75
MT		/	M81
Non assigné		/	M73, M76, M77, M79, M82

Comme évoqué lors de la conclusion du chapitre précédent, la Lugdulysine est apparentée avec 62,5 % d'identité à l'hyicolysine (n° d'accèsion MEROPS : MER0001182). En suivant la classification MEROPS à la lettre, la Lugdulysine s'apparente donc aux métallopeptidases (M) et à la famille M30. Cette même famille est incluse à l'intérieur du clan MA et plus particulièrement dans la subdivision MA(E). A l'heure actuelle, la famille M30 ne contient que l'hyicolysine (toutes les autres métallopeptidases M30 n'étant pas caractérisées à ce jour). En revanche, le clan MA regroupe une très grande variété d'enzymes (avec pas moins de 45 familles distinctes) aux propriétés catalytiques hétérogènes. L'enzyme de

référence de ce clan est la Thermolysine (*Bacillus thermoproteolyticus*, n° d'accèsion MEROPS : MER0001026, pdb 1TLP).

L'absence de caractérisation précise de la famille M30 dans la littérature nous contraint, par conséquent, à travailler par analogie avec certaines enzymes apparentées du clan MA(E). Compte tenu de l'importance de ces métallopeptidases dans les processus infectieux, les mécanismes catalytiques, leur cibles physiologiques et leurs structures, ont fait l'objet d'études poussées. La transposition des propriétés de ces enzymes vers la Lugdulysine reste donc un exercice tout à fait pertinent. Pour finir, ces enzymes MA(E) représentent un bon modèle car elles partagent une sphère de coordination du zinc identique à la Lugdulysine.

B) Le site actif, élément clef du fonctionnement enzymatique

Comme la classification MEROPS présentée si dessus le suggère, l'élément essentiel d'une métallopeptidases est son site actif. Ces sites actifs, particulièrement conservés à travers les différentes familles, sont formés par un motif en résidus d'acides aminés responsable de l'activité protéolytique. Le site actif contient notamment des résidus d'acides aminés responsables de la coordination du ou des ions métalliques, et de résidus d'acides aminés dits « catalytiques » impliqués dans la réaction d'hydrolyse des liaisons peptidiques. Il est possible de distinguer deux types de sites actifs, les sites catalytiques et co-catalytiques. Le premier ne contient qu'un seul ion métallique tandis que le second se caractérise par la présence de deux ions métalliques identiques (Figure 13).

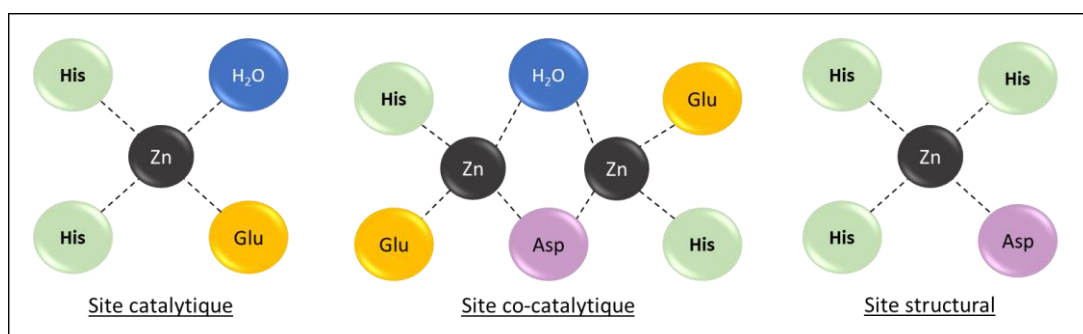


Figure 13 : Représentation des trois types de sites de fixation de l'ion métallique

Dans un site catalytique, l'ion métallique (représenté par un atome de zinc (Zn)) est coordonné par trois résidus d'acides aminés (deux résidus histidine (His) et un acide glutamique (Glu)). Le quatrième ligand est une molécule d'eau. Les ions métalliques d'un site co-catalytique sont coordonnés par cinq résidus d'acides aminés (dans cet exemple, l'acide aspartique (Asp) établit une liaison avec les deux atomes de zinc). Lorsqu'il est qualifié de structural, l'ion

métallique est coordonné par quatre résidus d'acides aminés. De telles structures, bien qu'inactives sont courantes dans la nature (protéines à doigts de zinc¹⁷⁰). inspiré et traduit de Barrett et *al.*¹⁷¹

Bien que la majorité des métallopeptidases possède dans leur site actif un atome de zinc, il est possible de retrouver d'autres ions métalliques tels que le cobalt, le manganèse ou le nickel. Ces derniers sont localisés la plupart du temps à l'intérieur de sites co-catalytiques (Figure 14). De plus, il est intéressant de constater que des métallopeptidases d'une même famille ne possèdent pas nécessairement le même ion métallique : la famille M29, par exemple, regroupe des métallopeptidases dépendantes du zinc ou du cobalt.

Indépendamment de leur nature, les ions métalliques des sites catalytiques sont coordonnés par un nombre restreint d'acides aminés. Il s'agit des résidus Histidine ainsi que des résidus d'Acides Glutamique et Aspartique. Les résidus Histidine sont les acides aminés les plus souvent rencontrés dans un site actif, avec un ratio de quatre résidus Histidine pour un Acide Glutamique ou Aspartique. L'interaction entre le zinc et ce résidu s'établit à l'aide de l'un des atomes d'azote localisés dans le cycle imidazole de sa chaîne latérale. La prédominance de ce résidu s'explique notamment par sa capacité à disperser les charges intermédiaires (apparaissant lors du processus d'hydrolyse) via la formation de liaisons hydrogènes avec l'azote non lié au zinc. Dans le cas des résidus d'acides glutamique et aspartique, les liaisons à l'atome métallique s'établissent avec l'un des oxygènes de leur groupement carboxyle (-COOH) à l'extrémité de leur chaîne latérale. La charge négative ainsi apportée réduit la charge de l'atome métallique, prévenant ainsi une ionisation trop aisée de cet ion métallique lié à la molécule d'eau. Pour finir, les interactions ions métalliques – cystéines sont particulières et ne sont observables uniquement dans les structures non maturées. D'un point vu architectural, les sites catalytiques sont formés autour de deux premiers ligands, généralement espacés d'une courte distance, et d'un troisième ligand, localisé plus loin sur la séquence primaire. L'espace entre ces deux premiers ligands dépend notamment de la structure secondaire du site actif. Lorsqu'ils sont localisés sur une hélice α , ces résidus sont séparés par 3 résidus, comme dans le site actif (**HisGluXXHis**) de la thermolysine (Figure 14-A). S'ils sont placés dans un feuillet β , ces ligands ne sont espacés que par un seul résidu.

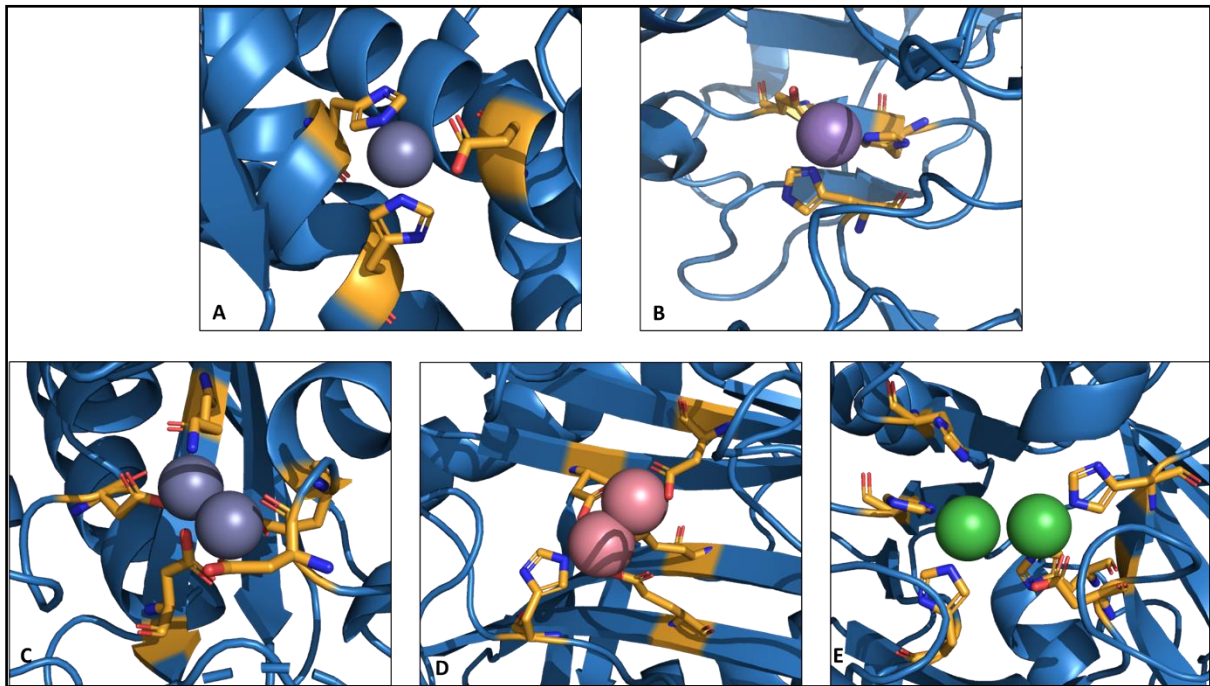


Figure 14 : Diversité des ions métalliques au cœur de différents sites catalytiques

Les sites actifs de cinq métallopeptidases ont été modélisés et capturés à partir de PyMol. Les structures tertiaires, en bleues, sont visualisées selon la représentation « cartoon ». Les différents résidus d'acides aminés impliqués dans la coordination des ions métalliques sont coloriés en orange. Pour plus de clarté, les molécules d'eau ne sont pas représentées à l'intérieur de ces sites. A) Site actif de la thermolysine (pdb : 2TLX)¹⁷². L'ion zinc (en gris) est coordonné par deux résidus His¹⁴² et His¹⁴⁶ et un résidu Glu¹⁶⁶. B) Site actif d'une isatine hydrolase A (pdb : 5NNA)¹⁷³. L'ion manganèse (en mauve) est coordonné par les résidus His69, His73 et Asp75. C) Site actif de la leucine aminopeptidase bovine (pdb : 1BLL)¹⁷⁴. Les deux ions zincs sont respectivement coordonnés par les résidus Asp²²⁵, Asp³³², Glu³³⁴ et Asp²⁷³, Glu³³⁴ et Lys²⁵⁰. D) Site co-catalytique d'une méthionine aminopeptidase (pdb : 1MAT)¹⁷⁵. Les deux ions cobalt sont coordonnés par les résidus Asp⁹⁷, Asp¹⁰⁸, His¹⁷¹, Glu²⁰⁴ et Glu²³⁵. E) Site co-catalytique d'une uréase (pdb : 1EJR)¹⁷⁶. Les deux ions nickel sont coordonnés par les résidus His¹³⁴, His¹³⁶, His²¹⁷, His²⁴⁶ et His³⁶⁰.

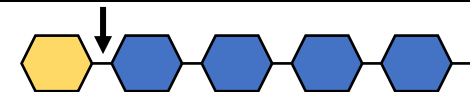
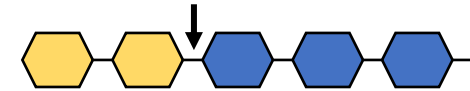
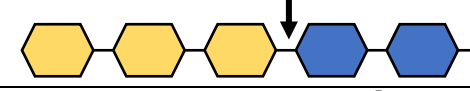

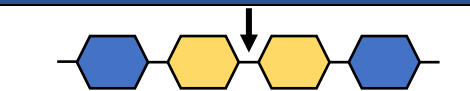
Les sites co-catalytiques, quant à eux, possèdent des propriétés différentes. Les deux ions métalliques peuvent être coordonnés par un ensemble plus ouvert de résidus d'acides aminés. Les résidus Histidine, d'acide Glutamique et Aspartiques sont toujours majoritaires et sont secondés par des ligands plus faibles, tels que les résidus Sérine, Thréonine, Tyrosine ou Lysine. Dans ce cas, la répartition et l'espacement des différents ligands, généralement 5 résidus d'acides aminés coordonnant deux ions métalliques, ne suivent pas de règle particulière. Les acides aminés sont donc disséminés tout au long de la séquence de l'enzyme.

C) Mécanisme catalytique des zinc métallopeptidases.

Les zinc métallopeptidases étant les enzymes les plus abondantes, il est logique que leur mécanisme d'action soit le plus étudié dans la littérature. De manière générale, une première distinction est faite entre les métallo-endopeptidases et les métallo-exopeptidases (Tableau 5). Les exopeptidases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse d'un, deux ou trois résidus d'acides aminés à partir des extrémités N-terminale ou C-terminale. A l'inverse, les endopeptidases hydrolysent une liaison peptidique directement à l'intérieur du substrat. Ces dernières peuvent néanmoins présenter des spécificités variables. Il n'est donc pas rare de constater que certaines zinc métallopeptidases privilégient l'hydrolyse de liaisons peptidique entre certains résidus d'acides aminés spécifiques, tandis que d'autres semblent bien plus permissive vis-à-vis de leur substrat.

Tableau 5 : Schématisation des grands mécanismes d'activité enzymatique

Les résidus d'acides aminés sont représentés par des hexagones. Les résidus de la chaîne de la chaîne polypeptidique sont représentés en bleu tandis que les hexagones jaunes représentent les résidus dont les liaisons peptidiques sont clivées au cours du processus enzymatique. Schéma adapté et reproduit à partir de Rao *et al.*¹⁶⁸.

Enzymes	Mode d'action	Classification EC
Exopeptidases		
Aminopeptidases		EC 3.4.11
Dipeptidases		EC 3.4.13
Tripeptidyl peptidases		EC 3.4.14
Métallocarboxypeptidases		EC 3.4.17
Endopeptidases		
Métalloendopeptidases		EC 3.4.24

Les métallopeptidases du clan MA, et plus particulièrement MA(E), apparentées à la Lugdulysine appartiennent à la catégorie des endopeptidases (EC 3.4.24). Ainsi, seuls les mécanismes enzymatiques de ce clan seront traités au cours de cette thèse. En tant que référence, la Thermolysine a servi de modèle à l'établissement d'un certain nombre d'entre eux. La complexité de ces mécanismes ainsi que les résidus impliqués et leurs modes d'actions peuvent varier grandement selon les études. Pour simplifier la compréhension, un unique mécanisme sera proposé et ce malgré les différentes propositions rencontrées dans la littérature. Si les mécanismes enzymatiques de la thermolysine et de la Lugdulysine peuvent être partiellement transposables, c'est parce que ces deux enzymes possèdent un domaine de coordination du zinc identique. Les trois résidus His241, His245 et Glu268, ainsi que les résidus catalytique potentiels, Glu242 et Tyr315 se retrouvent donc impliqués dans les deux cas.

Cependant, les environnements proches des sites actifs de la Lugdulysine et des TLPs sont différents. De manière générale, le site actif des zinc métallopeptidases est localisé à l'intérieur d'une poche catalytique. Les différents résidus d'acides aminés constituant cette poche, et donc à proximités des résidus du site actif, ont pour fonction de fixer temporairement le substrat. Cette poche joue donc un rôle crucial dans la spécificité de l'enzyme. Cette notion fut introduite dès la fin des années 1960 grâce à une étude réalisée sur la Papaïne¹⁷⁷. Dans cette publication, les auteurs découvrent un certain nombre de sous-sites, localisés dans la poche catalytique, et dont les structures tridimensionnelles déterminent la spécificité vis-à-vis du substrat. A cause des contraintes stériques imposées par ces sous-sites, le nombre de substrats potentiels devient donc limité. En effet, les chaînes latérales des résidus du substrat doivent être adaptées à la configuration de la poche (Figure 15).

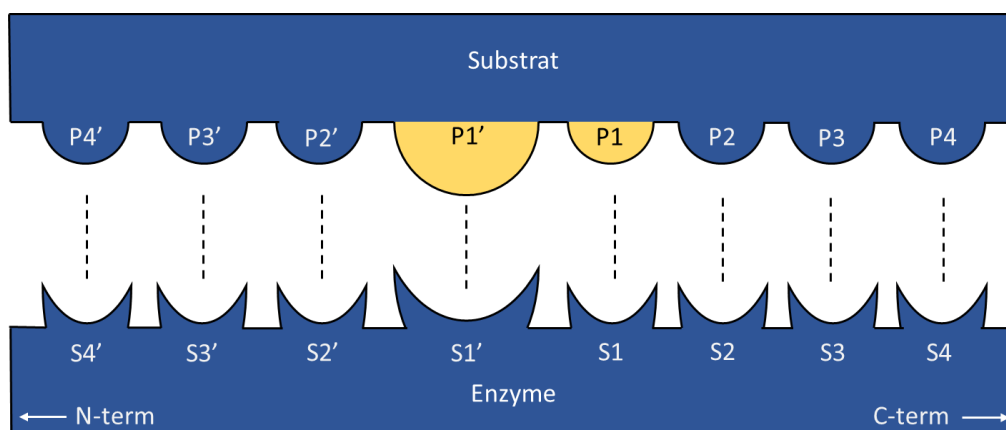


Figure 15 : Représentation schématique de la poche catalytique de la thermolysine

Les sous-sites présents dans la poche catalytique sont numérotés de S4' à S4. Ils représentent des invaginations permettant au substrat et ses aspérités (notées de P4' à P4) de se fixer temporairement avec une grande affinité. L'hydrolyse intervient alors entre les résidus P1' et P1 (en jaune). Schéma traduit de l'anglais et inspiré par Adekoya et Sylte¹⁷⁸.

Les différentes chaînes latérales des résidus d'acides aminés qui constituent l'architecture du substrat ont donc un impact majeur sur sa capacité à intégrer la poche catalytique. Cela semble d'autant plus vrai lorsque le substrat est imposant. Dans le cas de la Thermolysine et des enzymes apparentées telles que l'Auréolysine, cette poche catalytique accepte notamment des résidus hydrophobes en position P1' (Phe, Leu, Ile, Tyr, Val, Met)^{178,179}. Cependant, il est possible de constater que cette spécificité peut varier selon la taille du substrat utilisé. Lorsqu'il est de taille réduite, l'entrée du substrat semble moins dépendante de ces interactions, et des sites de clivage secondaires, moins favorisés apparaissent. Ainsi, la Thermolysine peut également hydrolyser des liaisons peptidiques de résidus Met, His, Ala, Asn, Ser, Gly, Glu localisés en position P1'¹⁷⁹. Ces observations sont confirmées par des études comparatives (alignement de séquences) et mutationnelles (mutation ponctuelle dans la poche catalytique) entre la thermolysine et l'auréolysine^{180,181}. En effet, les auteurs constatent dans un premier temps que des différences observables dans les séquences primaires de la thermolysine et de l'auréolysine ne présagent pas d'une variation de spécificité, les deux enzymes ayant une affinité similaire pour un substrat identique. En revanche, des variations locales de la poche catalytique, induite par la mutation Phe133Leu, entraînent d'importantes modulation de la spécificité¹⁸⁰. Ces mêmes auteurs parviennent également à démontrer que la poche S1' de la thermolysine est spécialement adaptée à la fixation d'un résidu leucine. En réalisant diverses mutations au niveau de cette poche, constituée par les résidus Phe130, Leu33, Val139, Leu202, ces auteurs constatent qu'il est possible de modifier la spécificité de l'enzyme. Ainsi, en réduisant la taille du résidu Leu202 (remplacée par des résidus Val, Ala ou Gly), la thermolysine, qui favorisait les résidus Leucine en position P1', favorise désormais les résidus Phe localisés en position P1'¹⁸¹. Cette sélectivité peut également s'exercer à partir de différents sous-sites. Les Subtilysines développent leur spécificité par l'intermédiaire des sous-sites S1 et S4¹⁸² tandis que les caspases semblent établir une sélectivité stricte à travers le sous-site P1¹⁸³.

Bien que la spécificité d'une zinc métallopeptidase semble variable, le mécanisme catalytique reste le même. Une fois qu'un substrat adapté entre dans la poche, une fixation temporaire se met en place grâce aux différents sous-sites. Cela permet d'orienter le substrat et de le placer à une distance suffisante de l'ion zinc qui pourra alors catalyser l'hydrolyse de la liaison peptidique entre les résidus P1' et P1. De nombreuses études se sont donc concentrées pour établir un schéma général de la catalyse enzymatique (Figure 16)^{184,185}.

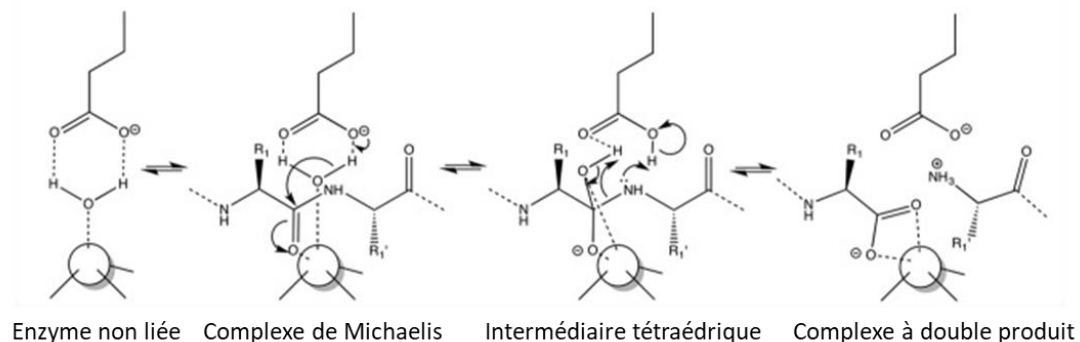


Figure 16 : Schéma général du mécanisme catalytique des métallopeptidases à site catalytique

A) Ce modèle commence par l'enzyme seule. Dans cette configuration, l'ion métallique (cercle blanc) est coordonné par trois résidus d'acides aminés et une molécule d'eau. Cette dernière, le solvant, est également lié au résidu catalytique (chaîne latérale d'un résidu d'acide glutamique dans cet exemple). B) Lorsque le substrat pénètre et s'accommode à la poche catalytique, le complexe de Michaelis se forme. Chez les métallopeptidases, la fixation du substrat s'effectue généralement par l'intermédiaire du sous site S1'¹⁸⁶. Des transferts de charges et une interactions s'établissent alors entre le groupement carbonyle de la liaison peptidique, l'ion métallique et la molécule d'eau. C) Une fois le substrat lié, le groupement carbonyle, polarisé par l'ion zinc, subit une attaque nucléophile exercée par le solvant. Cela entraîne le transfert d'un proton vers le résidu d'acide glutamique et la formation d'un intermédiaire tétraédrique stabilisé à la fois par l'ion métallique mais aussi par les résidus d'acides aminés à proximité. D) Il en résulte donc une rupture de la liaison peptidique accompagnée par un transfert de protons vers l'extrémité N-terminale du nouveau produit. Une fois la réaction terminée, les deux produits sont libérés et laissent la place à un nouveau substrat. Schéma traduit de l'anglais et issu de N. Cerdà-Costa et F. Gomis-Ruth¹⁸⁵.

Ce schéma général est volontairement simplifié afin de s'accommoder à la plupart des métallopeptidases. Dans le détail, la réaction de catalyse enzymatique fut particulièrement étudiée chez la Thermolysine et la Carboxypeptidase A car ce sont les deux premières métallopeptidases dont les structures furent résolues¹⁸⁵. Au moins trois mécanismes détaillés ont été proposés pour le fonctionnement de la Thermolysine^{178,187}. Seul le mécanisme correspondant au mécanisme général, publié récemment, sera présenté (Figure 16).

Globalement, la réaction d'hydrolyse est complexe puisqu'elle fait intervenir un grand nombre de résidus d'acides aminés localisés dans les sous-sites de la poche catalytique. De manière identique, l'ion zinc est impliqué dans la polarisation du groupement carbonyle du substrat et dans la facilitation de la déprotonation de la molécule d'eau. Ce mécanisme se démarque donc du précédent par l'implication d'un certain nombre de résidus d'acides aminés. Il a été démontré par exemple que l'Asn112 est impliqué dans la réaction par mutagenèse dirigée¹⁸⁸. La mutation du résidu Tyr157 diminue aussi grandement l'activité enzymatique^{189,190}. Cependant, ce mécanisme détaillé ne s'accommode pas facilement aux métallopeptidases de la famille M30. En effet, un alignement de séquences révèle des divergences entre les séquences primaires. Ainsi, il est fort probable que le mécanisme détaillé pour la Lugdulysine diverge de celui de la thermolysine présenté ci-dessous.

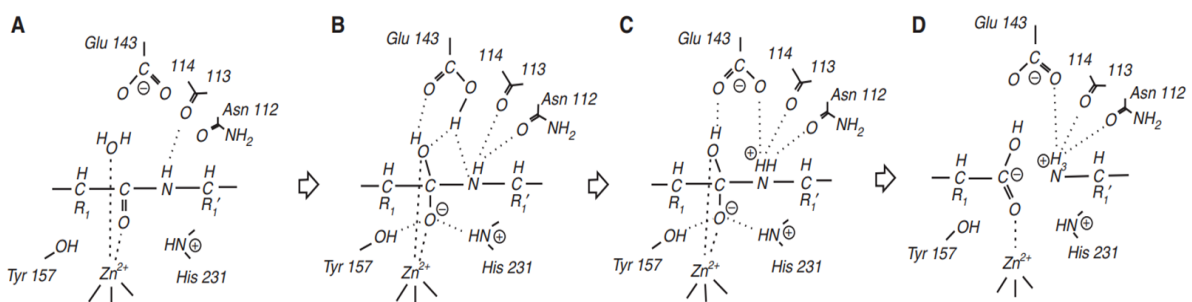


Figure 17 : Mécanisme catalytique détaillé de la Thermolysine

A) L'entrée du substrat déplace la molécule d'eau, encore liée au zinc, vers le résidu catalytique (Glu143) du motif HisGluXXHis. B) La liaison entre les deux protons du solvant et le résidu Glu143 augmente sa nucléophilie. L'oxygène de la molécule d'eau s'oriente alors vers le substrat pour réaliser l'attaque nucléophile. Un intermédiaire se forme tandis que l'attaque est réalisée. C) L'un des protons est ensuite transféré vers l'atome d'azote qui sera clivé. Les chaînes latérales des résidus Asn112 et Ala113 stabilisent l'azote doublement protoné formé. D) Le second proton est alors transféré depuis le résidu Glu143 pour finaliser le clivage de la liaison peptidique. Schéma tiré d'Adekoya et Sylte¹⁷⁸.

D) Régulation de l'activité des zinc métallopeptidases

Les métallopeptidases, de par l'irréversibilité de leur activité, doivent être finement régulées. L'objectif de cette régulation est de prévenir toute activité prématurée et dommageable pour la cellule productrice et l'organisme. Logiquement, de nombreux systèmes ont été mis en place par les différents organismes Eucaryotes comme Procaryotes afin de réprimer l'activité de ces enzymes. Il est possible de considérer deux grands types

d'inhibition ; une inhibition exogène, exercée par divers facteurs, et une inhibition endogène, directement liée à la structure de la métallopeptidase.

Chez l'homme, par exemple, l'expression des métallopeptidases matricielles (MMPs) subit une régulation transcriptionnelle. Les promoteurs des gènes codant les MMPs contiennent divers éléments permettant la fixation d'activateurs tels qu'AP-1, PEA3 ou encore NF- κ B¹⁹¹. Ces activateurs de la transcription permettent d'activer l'expression de ces enzymes suite à la captation de signaux extracellulaires. Des mécanismes de régulation post transcriptionnelle, par augmentation de la durée de vie des ARNm, ont également été mis en évidence¹⁹¹. L'activité des MMPs est également régulée par une compartimentation cellulaire stricte, favorisant le rapprochement entre l'enzyme et son substrat¹⁹². Pour finir, les MMPs peuvent aussi être régulée par des protéines appelées TIMPs (Tissue inhibitors of metallopeptidases). Les interactions entre ces protéines et les MMPs ont été caractérisées par cristallographie par rayons X permettant de mettre en évidence une liaison entre les TIMPs et le site actif des MMPs (notamment par des interactions via les différents sous-sites des MMPs)¹⁹³. L'expression des métallopeptidases bactériennes peuvent également être soumises à des régulations transcriptionnelles. La synthèse de l'auréolysine, produite par *Staphylococcus aureus*, est sous le contrôle négatif du système à deux composants *sae*¹⁹⁴. En effet, l'expression de cette zinc métallopeptidase est fortement réprimée par le système *saeR*-*P* puisque l'inactivation de ce système entraîne une augmentation (par huit) de sa synthèse par rapport à une souche sauvage¹⁹⁵.

Dans une grande majorité des cas, les métallopeptidases sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs, appelés zymogènes ou encore proenzymes. Pour cela, ces enzymes sont produites avec un domaine, généralement localisé à l'extrémité N-terminale de l'enzyme, appelé propeptide et qui a pour fonction d'inhiber l'activité catalytique. Cette localisation permet notamment d'empêcher toute activité intempestive lors de la synthèse de l'enzyme¹⁸⁴. Tout comme il existe une grande variété de métallopeptidases, il existe une grande diversité de propeptides. En effet, il est possible de constater d'importantes variations au sein d'enzymes d'une même famille. Ainsi, deux types de propeptides sont présents chez la thermolysine et les enzymes apparentées (Thermolysine like peptidases, TLPs, famille M4). Ces TLPs sont synthétisées et distinguées selon la taille de leur prodomaine. Environ 30% des précurseurs possèdent un propeptide court, d'environ 50 résidus d'acides aminés, tandis que

les autres sont synthétisées avec un propeptide d'environ 200 résidus d'acides aminés^{196,197}. Les propeptides les plus courts ne semblent pas posséder de motif particulier à l'instar des propeptides longs. Ces derniers contiennent deux régions conservées, un domaine FTP (Fungalysin/Thermolysin propeptide) et un domaine PepSY (Peptidase propeptide et YpeB de *Bacillus subtilis*)¹⁹⁸.

Les propeptides des métallopeptidases possèdent deux propriétés fondamentales expliquant leur fonction inhibitrice. L'inhibition peut être provoquée par un encombrement stérique de la poche catalytique ou par l'interaction entre un quatrième acide aminé avec l'ion métallique, ou par les deux propriétés réunies. Dans le cas des TLPs (Figure 18-A/C et B/D), le propeptide exerce une inhibition structurale en interagissant fortement avec la poche catalytique et ses nombreux sous-sites. La représentation de surface permet de visualiser les zones accessibles au solvant et aux substrats ainsi que de constater l'encombrement stérique exercé par ces propeptides. Dans le cas de la protéolysine mutée (Figure 18-B/D), le propeptide interagit avec les différents sous-sites du domaine catalytique mais ne semble pas interagir directement avec l'ion zinc¹⁹⁷. L'encombrement de la poche catalytique permet d'empêcher la formation du complexe de Michaelis (Figure 16), nécessaire pour l'activité catalytique^{184,199}.

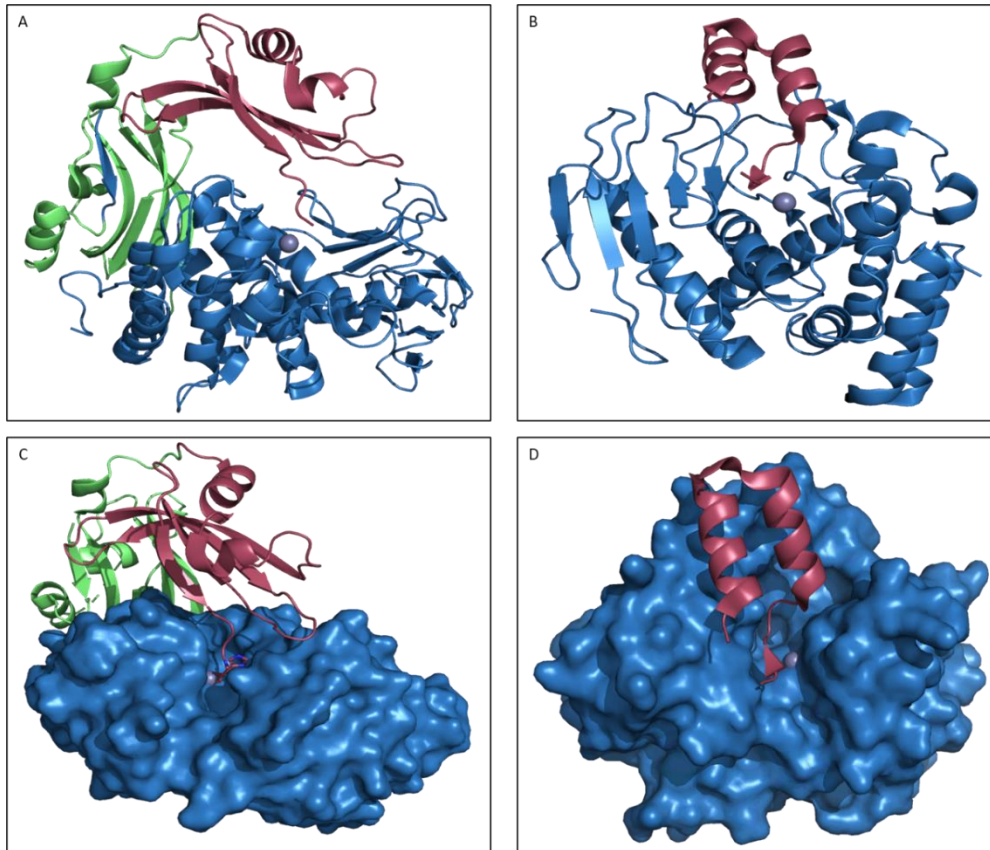


Figure 18 : Structures tridimensionnelles des précurseurs de la MCP-02 et de la Protéalysine
 A et C) Structure de la MCP-02 mutée (Glu346Ala) sous sa forme proenzyme (PDB : 3NQY) en représentation « cartoon » et de surface. Le domaine FTP est représenté en vert, le domaine PepSY est représenté en rouge et le domaine catalytique en bleu¹⁹⁸. B et D) Le propeptide de la Protéalysine mutée (Glu163Ala) est représenté en rouge tandis que le domaine catalytique est représenté en bleu (PDB : 2VQX) sous une forme « cartoon » et de surface¹⁹⁷. Les structures et leurs différents domaines ont été modélisés avec PyMol.

Le domaine PepSY de la proMCP-02 mutée interagit à la fois avec la poche catalytique et avec l'ion zinc par l'intermédiaire du résidu His204 localisé à l'extrémité C-terminale du propeptide¹⁹⁸. D'autres métallopeptidases comme la Proastacine sont maintenues dans un état de latence à l'aide d'un mécanisme similaire. Sous sa forme immature, le domaine catalytique est attaché à un petit propeptide de 34 résidus d'acides aminés dont l'un, Asp21, interagit avec l'ion zinc²⁰⁰. L'ion zinc de la Proméprine β est également fixé par un résidu Asp²⁰¹. Les structures de la Propappalysine et des MMPs révèlent que c'est un résidu Cys, présent à l'intérieur du motif conservé PRCGXPD (X représente n'importe quel résidu), qui interagit directement avec l'ion zinc. Ce type d'interaction, sous-entendue dans la [Figure 13](#) (site structural) est largement représenté chez les métallopeptidases. L'interaction acide

aminé – ion métallique la plus souvent étudiée concerne les résidus cystéines et, dans une moindre mesure, l'acide aspartique. Les processus de maturation concernés pour éliminer ces interactions sont rencontrés dans la littérature sous les termes de « cystéine switch » ou « d'aspartate switch ». Dans ces cas particuliers, un acide aminé remplace la molécule d'eau en tant que quatrième ligand (Figure 19). Hormis ces liaisons organométalliques, les interactions entre le propeptide et la poche catalytique peuvent être nombreuses. En effet, un ensemble de 21 interactions impliquant respectivement 44 et 20 résidus d'acides aminés du domaine catalytique et du propeptide sont présentes dans la structure de la propappalysine¹⁹⁹. Ces autres interactions permettent notamment de maintenir, tel un système velcro, le propeptide à proximité du site actif.

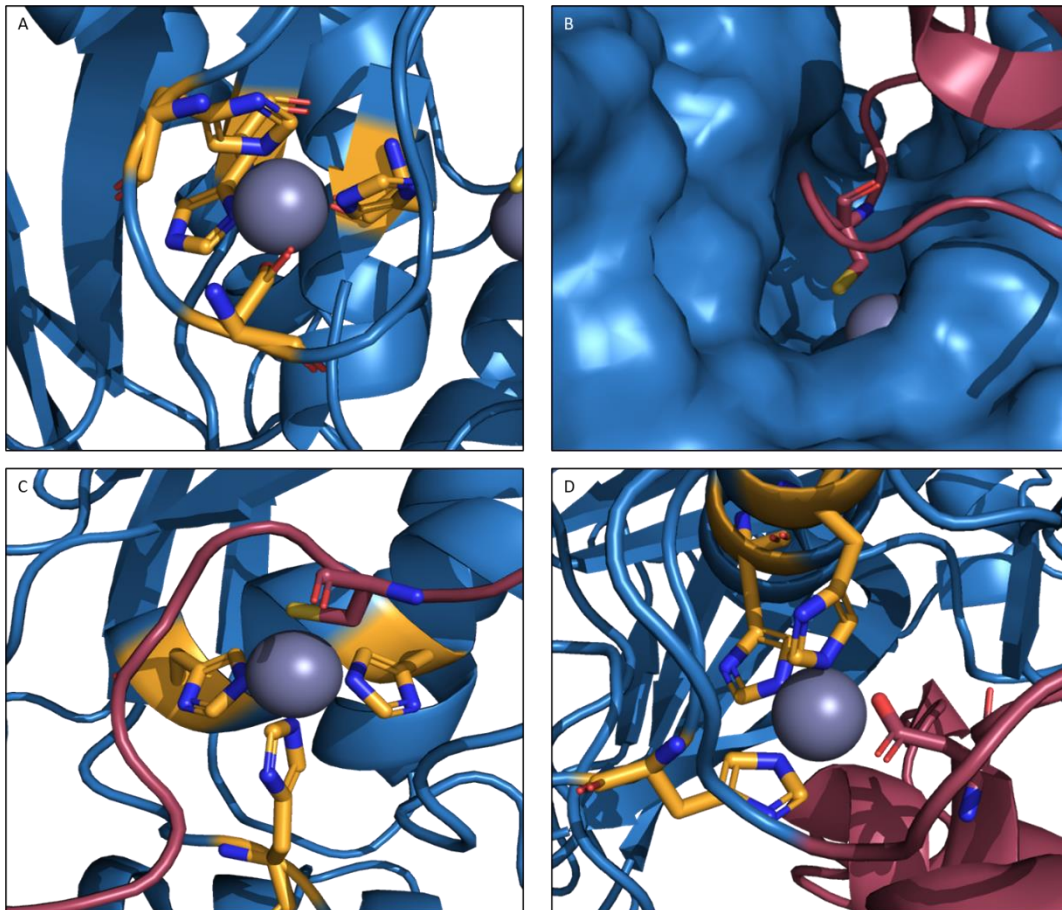


Figure 19 : Structures et coordinations tétraédrique de l'ion zinc dans divers sites catalytiques

A) Exemple de site de coordination d'un ion zinc structural, représenté en gris, à l'intérieur de la proMMP1 (PDB : 1SU3)²⁰². L'ion est coordonné par les résidus His149, Asp151, His164 et His177 représentés en orange. B) Représentation de l'encombrement stérique exercé par le propeptide, en rouge, dans la poche catalytique de la proMMP1. Le propeptide interagit étroitement avec les sous-sites proches de l'ion métallique. C) Structure du site catalytique de la proMM1. L'ion zinc, en gris, de ce site catalytique est coordonné par les résidus His218,

His222 et His228, représentés en orange, du domaine catalytique ainsi que par le résidu Cys92 du propeptide, en rouge. D) Structure du site catalytique de la proméprine β (PDB : 4GWM)²⁰¹. L'ion zinc est coordonné par les trois résidus His130, His134 et His140 du site actif (représentés en orange), et par le résidu Asp30 du propeptide (représenté en rouge).

La différence majeure entre une interaction structurale (Figure 19-A) et inhibitrice (Figure 19-C et D) se joue au niveau de la temporalité. Dans le premier cas, l'ion zinc est coordonné de manière permanente par les quatre résidus d'acides aminés. Ces sites structuraux permettent de rigidifier et stabiliser les structures tertiaires des protéines²⁰³. Dans cette configuration l'ion zinc sert également d'interface entre deux chaînes polypeptidique²⁰⁴. Dans ce dernier cas, l'ion zinc permet d'établir une liaison intermoléculaire entre deux monomères, permettant l'assemblage d'un complexe fonctionnel. Les interactions établit sont alors permanentes et la dénaturation d'une liaison de ce site entraîne une déstabilisation structurale de la ou des protéines impliquées. Lorsque l'interaction est qualifiée d'inhibitrice, la coordination du zinc par quatre acides aminés est transitoire. La maturation de l'enzyme, c'est-à-dire le passage d'une forme pro-enzyme à un domaine catalytique actif, consiste alors à éliminer la liaison entre le zinc et le résidu du propeptide. Pour cela, différents mécanismes interviennent afin de déstabiliser puis éliminer le propeptide. Généralement ce dernier est ensuite digéré, partiellement ou intégralement, par la peptidase nouvellement activée (Figure 20).

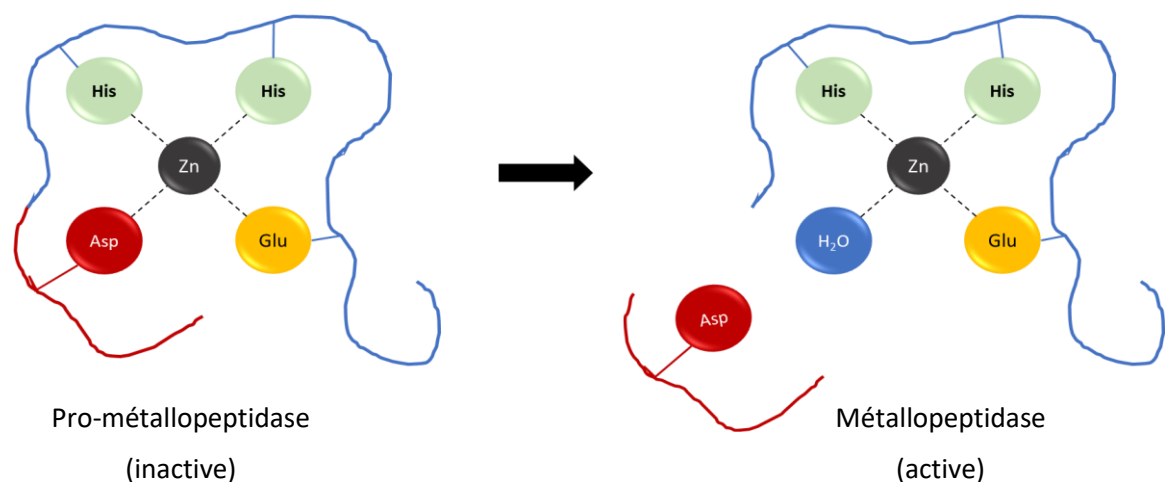


Figure 20 : Représentation schématique d'un « aspartate / cystéine switch »

Au cours de la maturation, le propeptide, en rouge est clivé, libérant ainsi le résidu Asp (ou Cys) de son interaction avec l'ion zinc. Une molécule d'eau, futur solvant pour l'hydrolyse,

remplace alors le résidu d'acide aminé. L'ion zinc, coordonné ainsi, devient réactif et l'enzyme est activée. Schéma inspiré de Barrett *et al.*¹⁷¹

Bien que les mécanismes de libération de l'ion métallique ne soient pas systématiquement élucidés, deux grands types de maturation opposés ont été définis. La maturation endogène, ou automaturation, est réalisée par la pro-enzyme elle-même sans avoir recours à un intermédiaire. C'est le cas chez les TLPs possédant un propeptide long. Le domaine FTP joue un rôle essentiel dans le processus d'activation de ces enzymes^{198,205}. Le mécanisme fut particulièrement étudié pour l'enzyme MCP-02. Comme démontré précédemment, (Figure 17-A et C), la forme immature contient un propeptide fixé dans la poche catalytique. Ce propeptide est clivé par l'enzyme elle-même entre les résidus His204 et Ala205 mais reste un élément inhibiteur en interagissant avec l'ion zinc via l'interaction entre l'ion zinc et le résidu His204. Un changement conformationnel important permet alors de libérer ce propeptide résiduel du site catalytique afin qu'il soit dégradé par l'intermédiaire de deux premiers sites de clivage situés après les résidus Val50 et Leu58¹⁹⁸. Ce mécanisme semble être conservé au sein de la famille des TLPs puisqu'il est également décrit pour la Proauréolysine de *Staphylococcus aureus*²⁰⁵. Les auteurs démontrent également qu'une rupture d'une liaison localisée dans ce domaine FTP permet une activation rapide de l'enzyme et la libération du propeptide.

A l'inverse, une maturation exogène fait intervenir une peptidase extérieure. Les cas de maturation par des éléments extérieurs ont été particulièrement étudiés chez les MMPs. Ainsi il a été démontré que les MMPs, une fois sécrétées dans le milieu extérieur, peuvent être activées par d'autres MMPs déjà maturées ou certaines peptidases à sérine, telles la plasmine ou la furine²⁰⁶. Ces enzymes vont donc libérer le propeptide des MMPs par un clivage protéolytique au niveau de certaines zones de ce domaine. La structure de la proMMP1 a permis d'émettre l'hypothèse que certaines zones flexibles du propeptide, absente des cartes de densité électronique, pourraient servir de régions appâts. En effet, ces régions, peu structurées, sont exposées à l'extérieur de la structure et favoriseraient ainsi l'action d'enzymes telles la trypsine ou la plasmine. Dans le cas de la proMMP1, le clivage du motif EKRRN permettrait de déstabiliser les interactions entre le propeptide et le domaine catalytique. Cela pourrait entraîner un réarrangement de la conformation du propeptide et donc favoriser d'autres clivages protéolytiques. Cette hypothèse semble être appuyée par la

présence d'une seconde région flexible, localisée après le motif de « cysteine switch », et constituée par les résidus Gln80 à Asn87. En effet, la forme mature de la MMP1 débute au résidu Phe81, inclus dans le motif, suggérant que la forme maturée de l'enzyme est obtenue suite à un clivage exogène de cette zone²⁰².

Toutefois, il est resté difficile de transposer l'un de ces mécanismes d'activation à la Lugdulysine. Aucune étude d'activation ne fut réalisée sur un membre de la famille M30. Cependant, le propeptide de la Lugdulysine ne possédant pas de domaine distinct, il est possible qu'une activité exogène soit nécessaire pour l'activer.

E) Conclusion et impact des métallopeptidases lors de la pathogénèse

La mise au point sur la nomenclature et la terminologie réalisée au début de ce chapitre peut sembler fastidieuse mais reflète des expériences personnelles, notamment lors de congrès. Cela traduit également une volonté réelle, probablement nécessaire, d'uniformiser pour simplifier au maximum la compréhension et les échanges dans ce domaine. Dans ce sens, un travail admirable fut accompli par la rédaction des différentes éditions du « Handbook of proteolytic enzymes »¹⁷¹ permettant de regrouper une quantité d'informations formidable. La MEROPS Database¹⁶⁶ est également un outil essentiel pour les chercheurs du monde entier souhaitant travailler sur les peptidases et leurs inhibiteurs.

Parcourir ces différentes banques de données permet de constater la diversité extraordinaire qui règne dans le monde des métallopeptidases. Les divergences évolutives ont permis d'aboutir à une étonnante diversité, tant du point de vue structural, que fonctionnel. L'accumulation de connaissances ces dernières années a permis de mettre en évidence des mécanismes catalytiques et régulateurs de plus en plus complexes. La Thermolysine étant l'une des première structure résolue²⁰⁷, un effort particulier pour caractériser cette famille a été produit. Les mécanismes décrit à l'intérieur de ce tapuscrit, sur les mécanismes enzymatiques et les méthodes de maturation ne reflètent cependant qu'une petite partie des mécanismes observables dans la littérature²⁰⁸. Ainsi, de nombreux autres mécanismes de maturation, se déroulant en plusieurs étapes et aboutissant la formation de complexes intermédiaires, n'ont pas pu être abordé^{171,184}.

Pour finir, les métallopeptidases développent des activités diverses et variées. Certaines enzymes ont ainsi un simple rôle alimentaire et permettent la récupération d'acides aminés²⁰⁹, tandis que d'autres ont un impact très important lors de la pathogénèse²¹⁰. Les toxines tétaniques et botuliques possèdent, par exemple, une activité métallopeptidase localisée sur leur chaîne légère. Suite à l'internalisation de la toxine entière par endocytose et l'acidification de l'endosome, le pont disulfure reliant les chaînes lourdes et légères est réduit. La chaîne lourde forme alors un pore transmembranaire permettant le passage de la chaîne légère dans le cytosol. Une fois entrée, le domaine catalytique cible des protéines spécifiques : la synaptobrevine (ou « Vesicular Associated Membrane Protein », VAMP)²¹¹, la protéine SNAP-25 (« Synaptosomal-Associated Protein – 25 KDa »)²¹² et la syntaxine^{213,214}. La conséquence de l'hydrolyse de ces protéines est dramatique puisqu'elle entraîne un blocage du relargage de neurotransmetteurs et conduit à la paralysie puis la mort de l'hôte en cas d'absence de traitement^{213,214}. D'autres métallopeptidases sont également connues pour favoriser la survie de la bactérie productrice. La Lysostaphine est capable de cliver les ponts pentaglycine, composants essentiels du peptidoglycane, et nécessaires à l'intégrité cellulaire de *Staphylococcus aureus*^{215,216}. Son activité d'hydrolyse sur les polypeptides de résidus Gly entraîne la lyse de *S. aureus* et confère à la bactérie sécrétrice un avantage pour sa croissance. Certaines métallopeptidases, dont l'Auréolysine (synthétisée et sécrétée par *Staphylococcus aureus*²¹⁷), jouent un rôle dans l'évasion immunitaire en clivant certaines fractions du complément²¹⁸. Cette métallopeptidase (de la famille M4) contribue également à la maturation d'autres peptidases extracellulaire telle que la « V8 protéase »²¹⁹. Finalement, l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* facilite l'invasion des tissus infectés par la bactérie^{210,220}. Ces différents exemples ne représentent qu'une fraction des activités développées par les métallopeptidases bactériennes. Il est donc difficile de concevoir, à partir de ces données seules, le fonctionnement et l'impact de la Lugdulysine. Ce travail bibliographique témoigne cependant de la démarche et de l'intérêt scientifique d'étudier une telle enzyme.

Objectifs de la thèse

Cette thèse a pour objectif d'étudier une zinc métallopeptidase produite par *Staphylococcus lugdunensis*, la Lugdulysine. Les travaux réalisés sur cette enzyme, apparentée aux peptidases M30 (selon la Classification MEROPS¹⁶⁶), sont basés sur ceux réalisés lors de la caractérisation de l'Hycolysine, seule peptidase M30 étudiée à ce jour. Nous avons donc entrepris une série de caractérisations complémentaires à celles déjà mis en place pour décrire le fonctionnement de cette famille de peptidases.

1) **Caractérisation génétique** : Le travail de thèse consiste, dans un premier temps, à étudier le gène *slp1* chez les 81 souches *S. lugdunensis* VISLISI. Il s'agit alors de détailler la composition de ce gène ainsi que de comprendre pourquoi certaines souches ne développent pas d'activité protéolytique au niveau de leur surnageant de culture.

2) **Caractérisation structurale** : L'objectif principal de ce travail de thèse est de résoudre la structure tridimensionnelle de la Lugdulysine. La famille des métallopeptidases M30 ne possédant pas de référence structurale, ces travaux pourraient permettre d'appréhender le fonctionnement de ce type de peptidases. Une attention est portée également sur la structure de la Prolugdulyline, afin de comprendre les mécanismes de maturation de cette famille M30. Les manipulations sont réalisées en collaborations avec l'équipe « Biologie Structurale Intégrative » (IGBMC, Strasbourg).

3) **Caractérisation biochimique** : Les paramètres physico-chimiques optimaux de l'Hycolysine, obtenus avec l'azocaséine, servent aujourd'hui de références. L'objectif de ce travail est de confirmer, voire d'améliorer, ces observations par la création de nouveaux substrats plus sensibles. Nous espérons ainsi déterminer les constantes cinétiques définissant l'activité enzymatique, le k_{cat} , le K_m , et la V_{max} . Ces manipulations ont été menées en collaboration avec l'UMR-7021 (Faculté de Pharmacie, Strasbourg).

4) **Caractérisation fonctionnelle** : Le but de ce travail de recherche consiste également à caractériser le fonctionnement et la spécificité de la Lugdulysine. Il s'agit donc de trouver un ou plusieurs substrats physiologiques. Ainsi, nous espérons expliquer la corrélation entre la survenue d'infections ostéoarticulaires et la synthèse d'une Lugdulysine fonctionnelle et l'impact d'une telle peptidase au cours du processus infectieux.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Milieux de culture et conditions de culture

En milieu liquide, les souches de *Staphylococcus lugdunensis* sont cultivées en routine dans un milieu riche Cœur cerveau (BHI, Difco), composé de 9,8 g.L⁻¹ de cœur de bœuf, 10 g.L⁻¹ de protéose peptone, 2 g.L⁻¹ de dextrose, 5 g.L⁻¹ de chlorure de sodium et 2,5 g.L⁻¹ de phosphate disodique. Pour les besoins d'une manipulation, les souches de *Staphylococcus lugdunensis* peuvent également être cultivées dans un milieu Lysogeny Broth (LB, Difco) dont la composition est de 10 g.L⁻¹ de tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extraits de levure et 10 g.L⁻¹ de NaCl ou un milieu Mueller Hinton (MH, Difco), composé de 2 g.L⁻¹ d'extrait de bœuf, de 17,5 g.L⁻¹ de digestion acide de caséine et d'1,5 g.L⁻¹ d'amidon. Comme pour l'Hyicolysine¹⁶², ces milieux sont complétés par 0,5 mM de CaCl₂ (LB^{Ca}/ BHI^{Ca}/ 2TY^{Ca}). Les cultures sont réalisées à 37°C sous agitation (220 rpm). Les souches de *Staphylococcus lugdunensis* sont aussi cultivées sur gélose Columbia au sang de mouton (Oxoid). Au besoin, les bactéries sont ensemencées sur des géloses LB / MH / BHI, complétées avec 10 g.L⁻¹ d'agar (LBA / MHA / BHIA).

Les souches d'*E. coli* utilisées dans la production de Lugdulysine recombinante (Tableau 6) ont été cultivées dans un milieu LB^{Ca} complété avec l'antibiotique adapté au maintien du plasmide. Des solutions stocks sont préparées dans l'eau à 100 mg.mL⁻¹ pour l'ampicilline (Sigma) ou dans l'éthanol à une concentration de 100 µg.mL⁻¹ pour le chloramphénicol (Sigma). Les souches sont également conservées sur géloses avec un milieu LBA complété avec l'antibiotique adapté LBamp (milieu LBA complété avec 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline) et LBchl (milieu LBA complété en chloramphénicol).

Protocoles généraux

Les différents protocoles principaux relatifs à la manipulation d'ADN, de protéines et de bactéries, sont détaillés dans ce chapitre. Il s'agit donc de regrouper des protocoles classiques qui serviront de références tout au long du [Matériels et Méthodes](#). Bien que les protocoles soient rédigés dans leurs sens le plus large afin de correspondre à l'ensemble des conditions testées, des distinctions peuvent être faites lorsque cela s'avère nécessaire.

1) Manipulation de l'ADN.

Protocole n°1 : Purification de l'ADN génomique

L'ADN génomique des différentes souches de *Staphylococcus lugdunensis* de la collection VISLISI ou Rouennaises (généreusement transmise par l'UR 2656, Gram 2.0 : Groupe de recherche sur l'adaptation microbienne) a été extrait, afin de séquencer le gène *slp1* codant la Lugdulysine ([Tableau 6](#)). Pour cela, les souches ont été mises en culture dans 10 mL de milieu LB à 37°C, sous agitation (220 rpm) et pendant une nuit. Le lendemain, les ADNg sont extraits et purifiés à l'aide du kit MasterPure™ Gram Positive DNA purification (Epicentre) selon le protocole recommandé par le fabricant. La pureté et la concentration des échantillons ont été mesurées avec un spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific).

Protocole n°2 : Réaction de polymérisation en chaîne

Les réactions d'amplification des gènes d'intérêt sont réalisées avec la Taq DNA polymérase et l'ensemble des réactifs du kit *Taq* PCR (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Les différentes amorces utilisées ainsi que les températures d'hybridation associées sont répertoriées dans le [Tableau 7](#). La purification des produits de digestion PCR est réalisée soit directement en solution ou soit après un prélèvement sur gel d'agarose (1%), à partir du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean up (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant. La pureté et la concentration ont été mesurées avec un spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific). Les produits amplifiés par PCR ont été séquencés par l'intermédiaire d'une entreprise (Eurofins Genomics). Pour être séquencés, les amplicons mélangés aux amorces ont été conditionnés et transférés selon les recommandations du prestataire.

Protocole n°3 : PCR sur colonies bactériennes

Des PCR sur colonies ont également été réalisées afin de vérifier la séquence des inserts clonés dans les plasmides pGEX6P1 ou pHEN6. Pour cela une colonie isolée est prélevée à l'aide d'un cône de pipette et solubilisée dans 50 µL d'eau. Cinq µL de la suspension sont utilisés pour ensemercer une goutte isolée sur gélose LB Amp (100 µg.mL⁻¹). Le reste de la suspension est chauffé 10 min à 95°C afin de lyser les bactéries. 2 µL de cette suspension sont alors utilisés comme matrice ADN pour la réaction d'amplification détaillée dans le [Protocole n°2](#). Les produits amplifiés par PCR sont séquencés par l'intermédiaire d'Eurofins Genomics.

Protocole n°4 : Amplification et purification des plasmides

Pour purifier les différents plasmides de cette étude ([Tableau 8](#)), les souches d'*E. coli* sont cultivées dans 5 mL de milieu LB complété en antibiotique pendant 1 nuit à 37°C et sous agitation (220 rpm). Les plasmides sont ensuite purifiés à l'aide du kit Monarch® Plasmid Miniprep (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La pureté et la concentration ont été mesurées avec un spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific).

2) Manipulation des protéines

A) Production d'anticorps anti-Lugdulyisine

Protocole n°5 : Immunisation de l'animal

a) Préparation de la Lugdulysine

La Lugdulysine purifiée ([Protocole n°17](#)) est concentrée à une concentration de 0,832 mg.mL⁻¹ avec un filtre Amicon Ultra-15 (Merck) selon les recommandations du fournisseur puis dessalée sur une colonne PD10 (Cytiva Life) contre un Tampon PBS 1X, 2 mM CaCl₂. La moitié du volume final (soit 1,18 mL) est mélangé à 31,9 µL d'HCOH 37 %. L'ensemble est incubé 48 h à 37°C. Suite à l'étape de dénaturation, la solution est de nouveau dessalée sur une colonne PD10 (Cytiva Life) contre un Tampon PBS 1X, 2 mM CaCl₂. L'activité résiduelle de la Lugdulysine est alors testée selon le [Protocole n°4.6](#). La Lugdulysine inactivée est ensuite stockée à -20°C.

b) Immunisation du lapin

Le lapin immunisé est un Lapin New Zealand (3,5 Kg, Hypharm) élevé dans l'animalerie de l'Institut de Bactériologie de Strasbourg. La première immunisation nécessite 950 μ L (soit 440 μ g) de Lugdulysine traitée mélangés à 950 μ L d'adjuvant complet de Freund. La peau du dos du lapin est ensuite rasée sur une surface d'environ 10 cm^2 et le mélange Lugdulysine – adjuvant est alors injecté en cinq points différents. Une deuxième, troisième et quatrième immunisations sont réalisées à 1 mois d'intervalle. Ces fois-ci, 950 μ L (soit respectivement, 441 μ g, 454 μ g et 454 μ g) de Lugdulysine inactivée sont mélangés 950 μ L d'adjuvant incomplet de Freund avant injections.

c) Récupération du sérum de lapin

Le lapin immunisé avec la Lugdulysine inactivée est anesthésié par voie intramusculaire avec 1,2 mL de Kétamine et 0,4 mL de xylazine. Un cathéter est posé sur l'artère de l'oreille puis le lapin bloqué dans une cage de rétention. L'autre oreille est incisée au scalpel dans l'artère centrale et le sang recueilli dans un Erlenmeyer de 250 mL. La récolte du sang est facilitée par l'action du pompe à vide. Une fois le sang prélevé, le lapin est euthanasié avec deux injections de 5 mL de Doléthal à travers le cathéter. Le sang est ensuite placé à 37°C pendant 4 h puis 1 nuit à 4°C pour la rétractation du caillot. Le sérum est alors clarifié par centrifugation (5.000 x g, 5 min, 4°C), aliquoté et stocké à -20°C. La présence d'anticorps anti-Lugdulyisine est vérifié par un test d'Ouchterlony.

Protocole n°6 : Purification des anticorps

a) Préparation de la Lugdulysine

La Lugdulysine purifiée ([Protocole n°17](#)) est dialysée contre 2 Litres de Tampon de dialyse (200 mM NaHCO_3 , 500 mM NaCl, pH 8,3) pendant 1 nuit à 4°C, afin de limiter la concentration en Tris-HCl pouvant interagir avec la colonne de purification. Une deuxième étape de dialyse est réalisée avec 2 L de ce même Tampon de dialyse pendant 4 h à 4°C. La Lugdulysine est ensuite concentrée à 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ avec un filtre Amicon Ultra-15 (Merck) selon les recommandations du fournisseur.

b) Couplage de la Lugdulysine à la colonne NHS HiTrap™

L'éthanol de la colonne HP activées au NHS HiTrap™ (1 mL, Cytiva Life) est chassé par trois injections de 2 mL d'une solution conservée à 4°C de 10 mM HCl, pH 3,0. Une fois rincée, les 6,3 mg de Lugdulysine (volume final 1.0 mL) sont directement injectés dans la colonne.

L'ensemble est laissé incubé 30 min à température ambiante. Les protéines non adhérentes sont éliminées par un lavage isocratique de 2 mL de tampon (200 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3). Les groupements réactifs en excès, n'ayant pas été couplés à la Lugdulysine, sont lavés et désactivés par 3 injections de 2 mL de Tampon A (500 mM éthanolamine, 500 mM NaCl, pH 8,3) suivies de 3 injections de 2 mL de Tampon B (100 mM acétate de sodium, 500 mM NaCl, pH 4,0), également suivies de trois nouvelles injections de 2 mL de Tampon A. La colonne est alors laissée 30 min à température ambiante. Cette première étape est suivie par une autre série d'injections, 3 injections de 2 mL de Tampon B puis 3 injections de 2 mL de Tampon A et finalement 3 injections de 2 mL Tampon B.

c) Purification des anticorps avec la colonne NHS couplée à la Lugdulysine

La colonne NHS-Lugdulyisine est équilibrée avec 5 mL de PBS 1X puis 5 mL de Tampon C (100 mM Glycine, 200 mM NaCl, pH 2,5) et pour finir 10 mL de PBS 1X. Afin de maximiser la quantité d'anticorps purifiés, des injections successives de 5 mL de sérum recueilli précédemment ([Protocole n°5](#)) sont appliquées à la colonne. Chaque injection de sérum est suivie d'un lavage isocratique de 10 mL de PBS 1X. Après ce lavage, le Tampon B est introduit dans la colonne jusqu'à élution complète des anticorps anti-Lugdulyisine. Le pH de la solution contenant les anticorps est directement neutralisé après la récolte des fractions d'intérêts avec un Tampon D (1 M Tris-HCl, pH 9,0). Une fois la purification terminée, la colonne NHS-Lugdulyisine est lavée avec 10 mL de PBS 1X puis stockée à 4°C dans une solution de PBS 1X complémentée avec 0,1 % (poids/volume) d'azide de sodium.

B) SDS-PAGE et « Western Blot »

Protocole n°7 : SDS-PAGE

Un dosage de Bradford peut être réalisé pour déterminer les quantités de protéines présentes dans un surnageant de culture avant le dépôt. Lorsqu'elle la concentration est connue, 5 µg de protéines sont déposées au maximum. Avant d'être déposées, les protéines sont dénaturées dans un Tampon de Laemmli (BioRad) complémenté avec 1 mM d'EDTA et par chauffage à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite introduits dans un gel Mini-PROTEAN® TGX™ Precast 4-15% (BioRad). La migration s'effectue à 200 V et 80 mA, pendant 1 h. Une fois terminée, le gel peut être conservé pour réaliser un Western Blot ([Protocole n°8](#)).

Dans le cas contraire, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie (BioRad) selon les recommandations du fabricant.

Protocole n°8 : « Western Blot »

Après migration sur SDS-PAGE, les protéines sont transférées en milieu liquide sur une membrane de nitrocellulose 0,2 μm (Amersham) pendant 1 h à 30 V. Une fois le transfert terminé, la membrane de nitrocellulose est saturée pendant une nuit à 4°C avec 30 mL d'une solution de PBS + BSA 3% (poids/vol). La membrane est ensuite lavée 5 min avec 20 mL de PBS complété avec 0.05 % Tween 20 (vol/vol) (PBSTween). L'anticorps primaire (2 mg.mL⁻¹), purifié selon le [Protocole n°6](#), est ensuite ajouté à une dilution de 1/400^{ème} dans 15 mL d'une solution de PBSTween complétée avec 1 % (poids/volume) de BSA. Après 1 h d'incubation à température ambiante, la membrane est rincée trois fois 5 min avec 20 mL de PBSTween. Suite à cela, l'anticorps secondaire, anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la biotine (Sigma) est introduit par l'intermédiaire de 20 mL de solution PBSTween complétée avec 1 % (poids/volume) de BSA à une dilution de 1/2000^{ème}. Après 1 h d'incubation à température ambiante, la membrane est rincée par trois lavages successifs de 5 min avec 20 mL de PBSTween. Une troisième molécule, de la streptavidine couplé à la peroxydase (SA-POD, Sigma) est ajoutée à une dilution d'1/50^{ème} dans 15 mL de PBSTween + 1 % (poids/volume) BSA. L'ensemble est incubé 30 min à température ambiante puis rincée par trois lavages successifs de 5 min avec 20 mL de PBSTween. La présence de Lugdulsine est révélée à l'aide du Kit Opti4CN (BioRad) selon les recommandations du fabricant.

3) Manipulation des bactéries

Différentes manipulations visant à transformer des souches d'*E. coli* ont été réalisées au cours de ce travail. Les manipulations décrites dans ce paragraphe, la préparation de cellules compétentes et la transformation par choc thermique ont été utilisées sur les quatre souches d'*E. coli* et leur plasmides correspondants.

Protocole n°9 : Protocole de compétence par traitement au CaCl₂

Les souches d'*E. coli* ([Tableau 6](#)) ont été repiquées sur géloses LBA moins de 48 h avant le début du protocole. Cent mL de milieu LB sontensemencés à partir de quelques colonies et laissés incubés à 37°C, sous agitation (220 rpm) et pendant 18 h. A partir de la préculture 250 mL de milieu LB sont ensuiteensemencés à D.O._{600nm} égale à 0,05 et placés à 37°C, sous agitation (220 rpm). Une fois une D.O._{600nm} équivalente à 0,5 atteinte, le milieu de culture est

refroidi sur la glace pendant 15 min. Le milieu est centrifugé pendant 10 min à 4 °C et 3.000 x *g* puis le surnageant éliminé. Les bactéries sont re-suspendues dans 62.5 mL d'un tampon stérile composé de 200 mM MgCl₂ et l'ensemble est placé 1 h sur la glace. Le milieu est de nouveau centrifugé selon les mêmes conditions et le surnageant éliminé. Les bactéries sont re-suspendues dans 31,25 mL de tampon 100 mM CaCl₂ et placées 30 min sur la glace. Les cellules sont de nouveau centrifugées 10 min à 4°C et 3.000 x *g*. Après élimination du surnageant, les bactéries sont resolubilisées dans 10,6 mL de tampon 100 mM CaCl₂ et 1,9 mL de Glycérol 87 % (vol/vol) stérile. Des aliquotes de 100 µL sont ensuite placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et congelés immédiatement dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

Protocole n°10 : Transformation des souches d'E. coli par choc thermique

Les quatre souches d'*E. coli* (Tableau) ont été rendues chimiquement compétentes par l'intermédiaire du [Protocole n°9](#). Les aliquotes contenant 100 µL de la souche adéquates sont décongelés doucement dans la glace. Une fois décongelées 50 µL de bactéries compétentes sont mises en contact avec 50 ng de plasmides, pGEX-6P1 (*E. coli* BL21 et *E. coli* XL1 Blue) ou pHEN6 (*E. coli* TOP10 et *E. coli* WK6). Une fois mélangé, l'ensemble est placé 30 min sur la glace. Un choc thermique est ensuite réalisé à 42°C pendant 30 sec avant que les bactéries soient replacées 30 min sur la glace. Cinq cent µL de milieu LB sont introduits dans chaque tube Eppendorf et le mélange est placé 1 h à 37°C. Une fois l'incubation terminée, des milieux gélosés LB supplémentés en ampicilline (100 µg.mL⁻¹) sontensemencés avec 40 µL et 200 µL pour s'assurer de la présence de colonies isolées. Les géloses sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 h. La présence de l'insert et sa séquence sont vérifiées à l'aide d'une PCR sur colonie bactérienne ([Protocole n°3](#)).

Production et purification de la Lugdulysine

La production de Lugdulysine, sous sa forme mature et active fut un élément essentiel au bon déroulement de ces travaux de thèse. En effet, toutes les manipulations réalisées nécessitent l'utilisation d'une enzyme fidèle à celle produite naturellement. Par conséquent, des systèmes d'expression de Lugdulysines recombinantes ou de purification directement depuis le surnageant de la souche de *Staphylococcus lugdunensis* VISLISI_22 ont été mis en place. De plus, les expérimentations visant à déterminer la structure tri-dimensionnelle de la Lugdulysine nécessitent une enzyme purifiée avec grand soin, afin de faciliter la formation de cristaux. A cette fin, une grande attention fut portée à la mise au point d'un système de production et d'un protocole de purification suffisamment optimisés pour permettre une reproduction fidèle des résultats d'une purification à l'autre. Par la suite, notre équipe a cherché à purifier la forme immature (Prolugdulysine) de l'enzyme. De la même façon, diverses tentatives de purification ont été réalisées, de la purification de Prolugdulysine mutée à partir d'un surnageant de culture de *Staphylococcus lugdunensis*, jusqu'à l'expression de Prolugdulysine mutée et taguée.

1) Premier essai de production de Lugdulysine recombinante

A) Choix des souches et construction des plasmides pGEX

Les souches *E. coli* BL21 (New England Biolabs) et *E. coli* XL1 Blue (Agilent) ont été utilisées pour respectivement, l'expression et la conservation des plasmides. La première tentative d'expression et de purification de Lugdulysine sous une forme recombinante (Lugdulysine-GST) fut réalisée avec le plasmide pGEX6P1. Les constructions plasmidiques (pGEX6P1-proLL et pGEX6P1-LL) ont été réalisées par l'entreprise GeneCust à partir des séquences codant la Prolugdulysine et la Lugdulysine mature. Une fois reçus, les plasmides pGEX6P1proLL et pGEX6P1LL ont été solubilisés dans un tampon 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 à une concentration de 100 ng.μL⁻¹. Les manipulations permettant d'aboutir à l'obtention des souches d'*E. coli* BL21 – pGEX6P1-proLL (Clones P) et *E. coli* BL21 – pGEX6P1-LL (Clones M) sont détaillées dans le [Protocole n°9](#) et le [Protocole n°10](#).

B) Mise au point des conditions de culture et dosage de l'activité GST

La mise au point des conditions de culture est effectuée sur plusieurs colonies à la fois. La production de Lugdulysine-GST est évaluée grâce à l'activité de la Glutathione-S-transferase (GST). En effet, il est possible de quantifier par spectrophotométrie ($D.O_{.340nm}$) l'accumulation d'un produit (1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) conjugué au glutathion réduit (GSH)) issu de l'activité catalytique de la GST. Cet essai sera également confirmé par un test d'activité protéolytique selon le [Protocole n°4.6](#).

Protocole n°11 : Evaluation initiale de la production de Lugdulysine-GST des différents clones M et P

Les clones numérotés P1 à P6 ainsi que les clones M1 à M6 sont ensemencés dans 5 mL de milieu 2TY complété en ampicilline ($100 \mu g \cdot mL^{-1}$) et incubés une nuit à $37^\circ C$, sous agitation (220 rpm). Cent mL de milieux de culture 2TYAmp sont ensuite ensemencés avec 3 mL de préculture. Une fois une $D.O_{.600nm}$ comprise entre 0.5 et 0.7, l'expression est induite pendant 16 h à $35^\circ C$ par l'ajout d'une concentration finale en IPTG de 0,5 mM. Les cultures sont centrifugées 10 min à $2.500 \times g$. Après élimination du surnageant, le culot est resolubilisé dans 3 mL de PBS complété avec 5 mM d'EDTA. Un mL est ensuite transféré dans un microtube Eppendorf de 1,5 mL, afin d'être soniqué ($110 J \cdot W^{-1} \cdot s^{-1}$). Le lysat bactérien est centrifugé 5 min à $10.000 \times g$ et le culot éliminé.

La concentration en protéine recombinante est évaluée par l'ajout de 10 μL du surnageant obtenu dans une solution contenant 100 mM KH_2PO_4 , 1 mM CNDNB, 1 mM GSH, pH 6,5 (volume final 1 mL). La variation de la $D.O_{.340nm}$ est lue toutes les minutes pendant 5 min. L'activité des différentes souches est comparée à un témoin négatif (sans GST) et un témoin positif (plasmide avec la GST seule).

Dans l'objectif d'améliorer les quantités de protéines produites les conditions de culture ont fait l'objet d'un grand nombre de modifications. Pour résumer, nous avons fait varier la concentration en IPTG (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM et 2 mM), le temps (1 h, 2 h, 4 h, 18 h) et la température d'induction (24°C, 35°C, et 37°C). Après ces différentes étapes d'optimisations, et quelques clones analysés, un protocole d'expression et de purification fut mis au point avec les clones P1 et M6.

Protocole n°12 : Expression et purification de Lugdulysine-GST

a) Conditions de culture et d'expression de la Lugdulysine-GST

Le clone *E. coli* BL21pGEX6P1-LL n°M6 est repiqué sur gélose 2TYAmp (100 µg.mL⁻¹) 24 h avant le début de la manipulation. La préculture de 600 mL en milieu 2TY complétement en ampicilline (100 µg.mL⁻¹) estensemencée à partir de quelques colonies et incubés à 37°C, sous agitation (220 rpm) et pendant 18 h. Le lendemain, les 4,8 L, répartis en 12 Erlenmeyer de 400 mL, de milieu 2TYAmp (100 µg.mL⁻¹) sontensemencés avec 50 mL de préculture par Erlenmeyer. Les cultures sont incubées jusqu'à atteindre une D.O._{600nm} comprise entre 0,5 et 0,7. Une fois atteinte, l'expression de la protéine recombinante est induite pendant 4 h à 37°C et sous agitation (220 rpm) avec une concentration finale de 0,1 mM en IPTG. Une fois l'induction terminée, les cultures bactériennes sont centrifugées 10 min à 4°C et 7.000 x g. Le surnageant est alors éliminé et le culot re-suspendu dans 100 mL de Tampon A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,2). Les bactéries sont ensuite lysées par French Pressure Press à 700 psi. Le lysat bactérien est enfin centrifugé 25 min à 4°C et 27.000 x g.

b) Chromatographie d'affinité et quantification de la Lugdulysine-GST

L'avantage de la production de Lugdulysine-GST est de pouvoir capter l'enzyme par l'intermédiaire de son partenaire. A cette fin, une colonne PD10 (GE Healthcare) fut montée avec 4 mL de Gel Glutathione Sepharose® 4B (GE Healthcare). L'éthanol est d'abord chassé avec 10 mL de Tampon A puis équilibrée avec 10 mL de Tampon B (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2mM CaCl₂, 30 mM GSH, pH 8,0) puis 20 mL de Tampon A. Le gel est ensuite resolubilisé dans 4 mL de Tampon A et mis en contact avec le surnageant du lysat cellulaire issu de French Pressure Press. L'ensemble est mis à 4°C sous agitation (220 rpm) pendant 30 min. Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4°C et 200 x g. L'ensemble est laissé à décanter avec 5 mL de lysat au-dessus du gel. L'ensemble est de nouveau homogénéisé puis centrifugé 5 min à 4°C et 200 x g. Une fois le filtre supérieur remplacé, une élution isocratique est réalisée avec 20 mL

de Tampon A. L'élution est réalisée avec le tampon B pour obtenir 6 fractions de 2 mL. La méthodologie du dosage de l'activité de la GST utilisée est identique à celle du [Protocole n°11](#). Le tag GST est ensuite éliminé par incubation entre 6 mL de lysat contenant de la Lugdulysine-GST avec 2 µL de PreScission Protease (Cytiva life) pendant une nuit à 4°C. Les produits de digestion sont analysés en gel SDS-PAGE comme le décrit le [Protocole n°7](#).

2) Deuxième système d'expression de Lugdulysine recombinante

A) Choix des souches et construction des plasmides pHEN6.

Les souches *E. coli* WK6 et *E. coli* TOP10 (généreusement fournies par Marc Ruff, IGBMC) ont été utilisées pour respectivement, l'expression et la propagation des plasmides. Cette seconde tentative vise à exprimer et purifier les formes recombinantes de la Lugdulysine et de la Prolugdulysine (pro/Lugdulysine-Strep). Le vecteur d'expression utilisé est le plasmide pHEN6 (transmis par Marc Ruff, IGBMC). Ce dernier permet une expression périplasmique des protéines recombinantes, grâce à l'insertion à l'extrémité C-terminale d'une séquence codant le peptide signal (*pelB*) d'*E. coli*. Les six gènes d'intérêts ont été synthétisés par l'entreprise GenScript. Les constructions plasmidiques ([Tableau 8](#)) ont été clonées par la méthode de digestion / ligation.

Protocole n°13 Construction des plasmides pHEN6

Les gènes provenant de GenScript sont conditionnés et insérés dans un plasmide pUC57. Afin de conserver les plasmides, la souche *E. coli* TOP10 est transformée selon le [Protocole n°10](#). Les plasmides sont amplifiés et purifiés selon la méthode décrite dans le [Protocole n°4](#). Une fois purifiés, 5 µg de plasmides pUC57-Clones 1 à 6 et 5 µg de plasmide pHEN6 sont digérés 3 h à 37°C par les enzymes de restrictions FastDigest *NcoI* et *EcoRI* (ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Les produits de digestions sont ensuite séparés et purifiés sur gel d'agarose selon le [Protocole n°2](#). Une fois purifiés et quantifiés les gènes digérés (Clones 1 à 6) et le plasmide pHEN6 linéarisé sont mélangés selon un rapport massique de 1 : 1 (100 ng d'insert pour 100 ng de plasmide) et mis en contact avec la T4 DNA Ligase (1 Unité / 20 µL de réaction) (Thermo Scientific™) selon les recommandations du fournisseur. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plasmides obtenus sont transformés dans la souche intermédiaire *E. coli* TOP10 selon le [Protocole n°10](#). Les plasmides pHEN6-clones1 à 6 sont

ensuite amplifiés et purifiés à partir des souches d'*E. coli* TOP10 comme détaillé dans le [Protocole n°4](#). Une fois purifiés, les plasmides sont transformés dans la souche *E. coli* WK6 compétente ([Protocole n°9](#)) selon les instructions du [Protocole n°10](#).

B) Purification de la Prolugdulyisine-Strep

Cette fois encore, notre équipe a cherché à optimiser les conditions de culture des souches *E. coli* pHEN6-Clones 1 à 6. De cette façon diverses températures, temps d'expression, et concentrations en IPTG ont été testés. Seul le protocole final, découlant de ce travail d'optimisation, sera détaillé.

Protocole n°14 : Expression et purification de la E242Q-Y315F Prolugdulyisine-STREP (Clone 4)

a) Conditions de culture et d'expression de la Prolugdulyisine-Strep

La souche *E. coli* WK6-pHEN6Clone4 est repiquée sur milieu gélosé LB complétement en ampicilline ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) moins de 48 h avant le début des manipulations. Une préculture de 100 mL de milieu LB^{Ca}Amp ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) estensemencée à partir d'une colonie et incubée à 37°C, sous agitation (220 rpm) jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} égale à 1. Le milieu LB^{Ca}Amp ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) de 800 mL est alorsensemencé avec 80 mL de préculture. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une D.O._{600nm} comprise entre 0,5 et 0,7. L'expression est alors induite sur la nuit et à température ambiante, par l'ajout d'1 mM d'IPTG. Le lendemain, les 800 mL de suspension bactérienne sont centrifugés 15 min à 4°C et 15.000 x g. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris dans 35 mL de tampon 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0. Les bactéries sont alors lysées à l'aide d'une French Pressure Press (environ 600 psi). L'ensemble est ensuite centrifugé 15 min à 4°C et 15.000 x g. Le surnageant est alors conservé et placé à 4°C.

b) Chromatographie d'affinité

Avant d'introduire l'échantillon, la colonne est lavée puis équilibrée avec 30 mL de Tampon A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0). Le surnageant est clarifié par centrifugation pendant 20 min à 4°C et 10.000 x g puis introduit dans une colonne en verre afin de préparer son passage dans une colonne chargée avec 10 mL de gel StrepTactin Sepharose® High Performance (GE Healthcare). Un lavage isocratique est ensuite réalisé avec 20 mL de Tampon A. L'élution est réalisée en une seule injection d'environ 30 mL de Tampon

B (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mM desthiobiotine, pH 8,5). La fraction de 7 mL recueillie dans des tubes en verre est alors mise en contact avec 2 μ L de PreScission Protease (Cytiva life) pendant une nuit à 4°C.

c) Chromatographie par échange d'ions

La Prolugdulyisine recombinante digérée est ensuite diluée quatre fois dans un Tampon C (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0), afin de limiter la concentration de NaCl résiduelle. La colonne MonoQ HR16/10 (Cytiva life) est équilibrée avec 80 mL de Tampon D (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 M NaCl, pH 8,0) puis 40 mL de Tampon C. Les injections de l'échantillon, réalisées en deux étapes, sont suivies d'un lavage isocratique de 16 mL avec du Tampon A. Une élution est réalisée pour chaque injection avec 10 mL de Tampon D. Les différentes fractions sont ensuite rassemblées avant que la quantité de Prolugdulyisine soit estimée lecture de l'absorbance à D.O._{.280nm}.

Protocole n°15 : Expression et purification de la S412F Prolugdulyisine-STREP (Clone 6)

a) Conditions de culture et d'expression de la Prolugdulyisine-Strep

La souche *E. coli* WK6-pHEN6Clone6 est repiquée sur milieu gélosé LB complété en ampicilline (100 μ g.mL⁻¹) moins de 48 h avant le début des manipulations. Une préculture de 400 mL de milieu LB^{Ca}Amp (100 μ g.mL⁻¹) estensemencée à partir d'une colonie et incubée à 37°C, sous agitation (220 rpm) pendant 18 h. Le milieu LB^{Ca}Amp (100 μ g.mL⁻¹) de 4,8 L est alorsensemencé à partir de la préculture, afin d'obtenir une D.O._{.600nm} de 0,05. Les bactéries sont cultivées à température ambiante, sous agitation (220 rpm), jusqu'à atteindre une D.O._{.600nm} comprise entre 0,5 et 0,7. L'expression est alors induite sur la nuit et à température ambiante, par l'ajout d'0,5 mM d'IPTG. Le lendemain, les 4,8 L de suspension bactérienne sont centrifugés 15 min à 4°C et 15.000 x g. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris dans 250 mL de tampon 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0. Les bactéries sont alors lysées à l'aide d'une French Pressure Press (environ 600 psi). Le lysat bactérien est ensuite centrifugé 15 min à 4°C et 15.000 x g. Le surnageant est alors conservé et placé à 4°C.

b) Chromatographie d'affinité

Avant d'introduire l'échantillon, la colonne est lavée puis équilibrée avec 30 mL de Tampon A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0). Le surnageant est centrifugé pendant

20 min à 4°C et 10.000 x *g*. Le lysat clarifié est mis en contact avec les 10 mL de gel StrepTactin Sepharose® High Performance (GE Healthcare) démoulés de la colonne pendant 1 h, à 4°C, sous agitation (100 rpm). Le mélange est ensuite centrifugé 3 min, à 4°C, 500 x *g*. Le gel est ensuite recoulé dans la colonne puis lavé avec 50 mL de Tampon A. La Prolugdulyisine mutée et étiquetée est éluée par l'introduction de 50 mL de Tampon B (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mM desthiobiotine, pH 8,5). Les produits purifiés sont analysés sur un gel SDS-PAGE (Protocole n°7).

3) Purification de la Lugdulysine sauvage

Historiquement, la Lugdulysine fut caractérisée grâce à une purification en deux étapes, une première chromatographie d'interaction hydrophobe suivie d'une chromatographie par échange d'ions. Cependant, les différentes expérimentations nous ont poussés à améliorer le protocole initial, laborieux et peu reproductible. La souche *S. lugdunensis* VISLISI_22²⁶ fut sélectionnée pour son profil protéolytique. En effet, il s'agit de la souche dont le surnageant développe la plus forte activité parmi l'ensemble des 81 souches de cette étude (Protocole n°18). De plus, et pour respecter les premiers travaux sur son homologue Hycolyisine, nous avons décidé d'incorporer dans l'ensemble de nos tampons une certaine concentration de calcium (sous forme de CaCl₂). Le but recherché est de ne pas modifier les paramètres environnementaux pour ne pas provoquer une dénaturation prématurée de l'enzyme. Pour finir, l'activité de la Lugdulysine est confirmée à chaque étape de purification à l'aide d'un test enzymatique sur azocaséine (Protocole n°23).

Protocole n°16 : Purification initiale de la Lugdulysine mature (VISLISI_22)

a) Culture et préparation de la Lugdulysine

Au maximum 48 h avant sa mise en culture, la souche VISLISI_22 de *Staphylococcus lugdunensis* est repiquée sur gélose au sang de mouton. Le milieu BHI (2800 mL) est stérilisé par autoclavage puis complété avec une concentration finale en CaCl₂ de 2 mM. La préculture est ensuiteensemencée avec 2-3 colonies de la souche VISLISI_22 et incubée 6 h à 37°C et sous agitation (220 rpm). Une fois l'incubation terminée, les milieux de cultures sontensemencés à partir de 9 mL de préculture. L'ensemble est ensuite incubé sur la nuit à 37°C et sous agitation (220 rpm).

Le lendemain, la culture est centrifugée 15 min à 7.000 x *g* à 4°C et le surnageant obtenu est stérilisé à partir de filtres 0.45 µm (Nalgène® vacuum filtration system, Fisher Scientific). La solution obtenue est ensuite complétée avec 1,2 M d'ammonium sulfate, afin de préparer la première chromatographie.

b) Chromatographie d'interactions hydrophobes

La colonne PHE Source 15 (GE Healthcare / Cytiva) est préalablement équilibrée avec 40 mL de Tampon B (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0) puis 80 mL de Tampon A (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, 1,2 M Sulfate d'ammonium, pH 8,0). Compte tenu de son volume (1200 mL), l'échantillon est ensuite injecté en une étape, et ce, directement par l'intermédiaire de la pompe A. L'injection est réalisée sur la nuit à un débit réduit. Les protéines et molécules faiblement accrochées sont ensuite éliminées par un lavage isocratique réalisé avec 40 mL de Tampon A. L'élution de la Lugdulysine est réalisée dans un gradient décroissant et linéaire d'AS afin de passer d'une concentration de 1,2 M à 300 mM sur une base de 12 mL / mL de gel (soit un gradient du Tampon A vers de le Tampon B de 108 mL).

c) Chromatographie par échange d'ions

La deuxième étape de purification débute par la préparation de l'échantillon recueilli précédemment pour la chromatographie par échange d'ion (IEC). Pour cela, l'échantillon est dialysé (Spectra/Por™, Fisher Scientific), sur la nuit, à 4°C et sous agitation douce contre 4 L de Tampon C (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0).

La colonne MonoQ HR16/10 (8 mL, GE Healthcare) est équilibrée avec 80 mL de Tampon D (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 M NaCl, pH 8,0) et 40 mL de Tampon C (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0). L'échantillon est ensuite injecté en deux étapes successives à l'aide d'une colonne en verre. L'injection est suivie par un lavage isocratique réalisé avec 16 mL de Tampon C. L'élution de la Lugdulysine est réalisée en un gradient linéaire et croissant de 0 à 300 mM NaCl en 86 mL. Une fois les différentes fractions de Lugdulysine collectées dans des tubes en verre, la D.O._{280nm} des différents échantillons est mesurée, afin d'estimer la quantité d'enzyme obtenue. La pureté de l'échantillon est ensuite analysée en SDS Page ([Protocole n°7](#)).

Ce premier protocole, bien que suffisant pour l'application qui en découle souffrait de nombreux problèmes nuisant à la reproductibilité des profils d'élution. Tout d'abord, nous

avons pu constater que les conditions de stérilisation du milieu de culture pouvait influencer le profil d'éluion de la colonne Phe15 Source. En effet, la pigmentation du milieu varie fortement selon le cycle d'autoclave utilisé. Pour pallier à ce problème, nous avons décidé de ne stériliser le milieu de culture que par filtration sur filtre 0,45 µm. Nous avons également cherché à optimiser les quantités de Lugdulysine produites en réalisant des tests de production à partir de différents milieux de culture (MH^{Ca}, LB^{Ca}, BHI^{Ca}, 2TY^{Ca}, TSB^{Ca}). Cependant, il s'est avéré que c'est le milieu BHI^{Ca}, utilisé initialement, permettait une production optimale d'enzyme. En vue des manipulations de cristallisation, la concentration finale en calcium a été réduite au maximum. Ainsi, l'ensemble des solutions tampons utilisées désormais ne contiennent plus que 0,5 mM de CaCl₂ plutôt que 2 mM, comme utilisé précédemment¹⁶². Pour finir, d'importantes améliorations ont été apportées afin de limiter le temps d'injection de l'échantillon. Afin de réduire les volumes accumulés après la production, une étape de précipitation au sulfate d'ammonium (AS) fut ajoutée. La saturation au sulfate d'ammonium est une méthode consistant à ajouter une certaine quantité d'AS, afin de faire sortir de solution les protéines de l'échantillon. Par ce procédé, les protéines vont précipiter selon leur solubilité, les plus hydrophobes précipitant avant les plus hydrophiles. Une première mise au point fut donc nécessaire pour déterminer le pourcentage de saturation optimale afin de capturer la Lugdulysine tout en laissant en solution le maximum de protéines contaminantes. Par conséquent, nous avons appliqué différents pourcentages de saturation sur des surnageants de culture (50%, 60%, 70%, 80%, 90% de saturation) et avons pu constater que la Lugdulysine commençait à précipiter avec une saturation de 60 %, mais qu'il fallait atteindre au moins 70 % de saturation en AS pour piéger l'intégralité des molécules.

Protocole n°17 : Méthode finale de purification de la Lugdulysine mature (VISLISI_22)

a) Culture et précipitation au sulfate d'ammonium

Au maximum 48 h avant production, la souche VISLISI_22 de *Staphylococcus lugdunensis* est repiquée sur gélose au sang de mouton (Oxoid). Le milieu BHI^{Ca} (2180 mL) est stérilisé par filtration sur filtre 0,45µm (Nalgène® vacuum filtration system, Fisher Scientific) puis réparti en douze Erlenmeyers de 2 L. Pour la préculture, 120 mL de milieu BHI^{Ca} sont également filtrés et placés dans un Erlenmeyer de 1 L. La préculture est ensuiteensemencée avec 2-3 colonies de la souche VISLISI_22 et incubée 6 h à 37°C et sous agitation (220 rpm). Une fois l'incubation

terminée, les milieux de cultures sontensemencés à partir de 9 mL de préculture. L'ensemble est ensuite incubé sur la nuit à 37°C et sous agitation (220 rpm).

Le lendemain, la culture est centrifugée 15 min à 7.000 x g à 4°C. Les protéines du surnageant sont ensuite précipitées avec une saturation de 70 % en sulfate d'ammonium (AS) (soit 472 g d'AS pour 1 Litre de surnageant). Le précipité est alors incubé sur la nuit à 4°C et sous une agitation très douce. Après formation, le précipité est centrifugé 15 min à 15.000 x g et 4°C. Suite à l'élimination du surnageant, le culot est resolubilisé dans un tampon Tris-HCl 30 mM, CaCl₂ 0,5 mM, pH 8,0 avec 1/20^{ème} du volume de surnageant mesuré avant précipitation à l'AS. La solution obtenue est clarifiée par centrifugation à 5000 x g, pendant 5 min et à 4°C.

b) Chromatographie d'interactions hydrophobes

L'échantillon clarifié obtenu précédemment est ensuite préparé pour la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC). Pour cela, il est complété avec un Tampon 30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, 3,9 M sulfate d'ammonium, pH 8,0, afin d'obtenir une concentration finale en AS de 1.2 M (en tenant compte de la concentration résiduelle en AS d'environ 100-150 mM). L'échantillon obtenu est alors centrifugé 10 min à 5.000 x g et 4°C. Les protéines non solubilisées à cette concentration sont alors éliminées.

La colonne PHE Source 15 (GE Healthcare / Cytiva) est équilibrée avec 40 mL de Tampon B (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0) puis 80 mL de Tampon A (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, 1,2 M Sulfate d'ammonium, pH 8,0). L'échantillon est ensuite injecté en deux étapes successives à l'aide d'une colonne en verre. Les protéines et molécules faiblement accrochées sont ensuite éliminées par un lavage isocratique réalisé avec 40 mL de Tampon A. L'élution de la Lugdulysine est réalisée en un gradient décroissant et linéaire d'AS afin de passer d'une concentration de 1,2 M à 300 mM sur une base de 12 mL / mL de gel (soit un gradient du Tampon A vers de le Tampon B en 108 mL).

c) Chromatographie par échange d'ions

La deuxième étape de purification débute par la préparation de l'échantillon recueilli précédemment pour la chromatographie par échange d'ion (IEC). Pour cela, l'échantillon est dialysé (Spectra/Por™, Fisher Scientific), sur la nuit, à 4°C et sous agitation douce contre 4 L de Tampon C (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0).

La colonne MonoQ HR16/10 (8 mL, GE Healthcare) est équilibrée avec 80 mL de Tampon D (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 M NaCl, pH 8,0) et 40 mL de Tampon C (30 mM Tris-HCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0). L'échantillon est ensuite injecté en deux étapes successives à l'aide d'une colonne en verre. L'injection est suivie par un lavage isocratique réalisé avec 16 mL de Tampon C. L'élution de la Lugdulysine est réalisée dans en deux gradients linéaires et croissants de NaCl. Le premier gradient, de 0 à 150 mM NaCl, se déroule sur 17 mL tandis que le deuxième, de 150 à 300 mM NaCl, est réalisé sur 69 mL. Une fois différentes fractions de Lugdulysine collectées dans des tubes en verre, la D.O._{280nm} des différents échantillons est mesurée, afin d'estimer la quantité d'enzyme obtenue. La pureté de l'échantillon est ensuite analysée en SDS Page ([Protocole n°7](#)) et l'activité enzymatique sur l'azocaséine ([Protocole n°4.6](#)).

Caractérisation biochimique de la Lugdulysine

1) L'azocaséine comme première approche.

Comme pour l'hycolysine¹⁶², la publication faisant état de la découverte de la Lugdulysine²⁶ utilisait l'azocaséine (Sigma) comme substrat. Bien que sa structure ne soit pas établit précisément, l'azocaséine est décrite comme un substrat chromogénique dérivé de la caséine. A ces caséines du lait sont associés différents groupements organiques Azo, qui permettront la détection d'une activité peptidique par dosage colorimétrique. Le principe général de ce protocole est d'incuber l'azocaséine et l'enzyme avant de stopper la réaction par précipitation. L'ajout d'un acide fort entraîne l'agrégation des protéines de haut poids moléculaire laissant ainsi en suspension les azopeptides hydrolysés par l'enzyme. L'absorbance ainsi observée correspond à la quantité de fragments libérés et est donc relative à l'activité protéolytique. Réservée dans un premier temps pour l'identification d'activité protéolytique dans les surnageants, nous avons ensuite utilisé l'azocaséine pour définir les conditions physico-chimiques optimales pour l'activité de la Lugdulysine (pH, température, influence de certains ions, etc.)

Protocole n°18 : Identification de l'activité protéolytique des surnageants de culture

Les souches de la collection VISLISI ou Rouannaise sont cultivées à 37°C et sur la nuit dans 1 mL de milieu BHI^{Ca}. Après centrifugation, 10.000 x g pendant 15 min, 200 µL de surnageant sont récupérés, filtrés (0,45 µM, MF-MilliporeTM) puis mélangés à une solution contenant 100 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, et 200 µL d'azocaséine à 25 g.L⁻¹ (volume réactionnel final de 1 mL, pH 8.0). L'ensemble est ensuite incubé pendant 16 h à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 µL de TCA 100% (poids/vol). Les protéines ayant précipitées sont éliminées par centrifugation (10.000 x g, 10 min) et le surnageant récupéré puis mélangé à 200 µL de NaOH 7,5 M. L'activité protéolytique est ensuite mesurée à D.O._{440nm} en point final. L'ajout d'une solution basique concentrée améliore la sensibilité de la manipulation en renforçant la coloration de l'azocaséine en suspension. Une fois recueillies, les valeurs d'absorbance relatives sont comparées au témoin négatif.

Cette méthodologie fut ensuite adaptée à une utilisation de Lugdulysine purifiée. Jusqu'à présent, les quantités de Lugdulysine utilisées étaient inconnues et dépendante du

surnageant de culture étudié. Comme tout dosage colorimétrique, ce protocole est soumis à la loi de linéarité de Beer-Lambert. Différentes étapes d'optimisation de la concentration de Lugdulysine optimale ont donc dues être réalisées afin de respecter les limites de détections de l'appareils. En effet, une D.O._{440nm} brute équivalente ou supérieure à 1,0, ne reflète plus exactement l'activité enzymatique (la droite linéaire s'infléchit). De plus, la Lugdulysine étant désormais purifiée, il devient possible de caractériser les paramètres physicochimiques optimaux à son activité. Dans un premier temps, diverses molécules tampons ont été testées ; MES, HEPES, Bicine, Tris-HCl, MOPS (une pour chaque condition de pH). Cependant, nous avons pu constater que la molécule peut influencer l'activité enzymatique et ce pour des valeurs de pH identiques. Un second protocole, utilisant des couples de molécules tampon, fut donc mis au point en ce sens. Suite à cela, il fut possible de déterminer d'autres paramètres influençant l'activité de l'enzyme (la température, le calcium, le zinc, l'EDTA, la phénanthroline).

Protocole n°19 : Détermination du pH optimal

La Lugdulysine purifiée (concentration finale 60 nM) est mélangée à une solution contenant 100 mM de deux couples de molécules tampons (MES - MOPS, pH 5,5 à 7,5, HEPES – BICINE, pH 7,0 à 9,0), 2 mM CaCl₂, et 200 µL d'azocaséine à 25 g.L⁻¹ (volume réactionnel final de 1 mL, pH 5,5 à 9,0). L'ensemble est ensuite incubé pendant 30 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 µL de TCA 100% (p/v). Les protéines ayant précipitées sont éliminées par centrifugation (10.000 x g, 10 min) et le surnageant récupéré puis mélangé à 200 µL de NaOH 7,5 M. L'activité protéolytique est ensuite mesurée à D.O._{440nm} en point final. Une fois recueillies, les valeurs d'absorbance relatives sont comparées et la valeur maximale est considérée comme 100%.

Protocole n°20 : Détermination de la température optimale

La Lugdulysine purifiée (concentration finale 60 nM) est mélangée à une solution contenant 100 mM de MES, 2 mM CaCl₂, et 200 µL d'azocaséine à 25 g.L⁻¹ (volume réactionnel final de 1 mL, pH 6,0). L'ensemble est ensuite incubé pendant 30 min à des températures comprises entre 27°C et 62°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 µL de TCA 100% (poids/vol). Les protéines ayant précipitées sont éliminées par centrifugation (10.000 x g, 10 min) et le surnageant récupéré puis mélangé à 200 µL de NaOH 7,5 M. L'activité protéolytique est

ensuite mesurée à D.O._{440nm} en point final. Une fois recueillies, les valeurs d'absorbance relatives sont comparées et la valeur maximale est considérée comme 100%.

Protocole n°21 : Influence des ions Calcium (Ca²⁺) et Zinc (Zn²⁺)

La Lugdulysine purifiée (concentration finale 60 nM) est mélangée à une solution contenant 100 mM de MES, 2 mM CaCl₂, et 200 µL d'azocaséine à 25 g.L⁻¹ (volume réactionnel final de 1 mL, pH 6.0). Ce mix est complété par différentes concentrations de ZnCl₂ (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷ M) ou de CaCl₂ (10⁻², 2.10⁻³, 2.10⁻³, 2.10⁻⁴ et 2.10⁻⁵ M). L'ensemble est ensuite incubé pendant 30 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 µL de TCA 100% (p/v). Les protéines ayant précipitées sont éliminées par centrifugation (10.000g, 10 min) et le surnageant récupéré puis mélangé à 200 µL de NaOH 7,5 M. L'activité protéolytique est ensuite mesurée à D.O._{440nm} en point final. Une fois recueillies, les valeurs d'absorbance relatives sont comparées au témoin positif (sans ZnCl₂, ni CaCl₂).

Protocole n°22 : Influence de l'EDTA et de la 1-10 phénanthroline

La Lugdulysine purifiée (concentration finale 60 nM) est mélangée à une solution contenant 100 mM de MES, 2 mM CaCl₂, et 200 µL d'azocaséine à 25 g.L⁻¹ (volume réactionnel final de 1 mL, pH 6.0). Ce mix est complété par différentes concentrations d'EDTA (0,1, 1 et 10 mM) ou de 1-10 phénanthroline (25, 50, 75 et 100 µM). L'ensemble est ensuite incubé pendant 30 min à une température de 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 µL de TCA 100% (poids/vol). Les protéines ayant précipitées sont éliminées par centrifugation (10.000 x g, 10 min) et le surnageant récupéré puis mélangé à 200 µL de NaOH 7,5 M. L'activité protéolytique est ensuite mesurée à D.O._{440nm} en point final. Une fois recueillies, les valeurs d'absorbance relatives sont comparées au témoin positif (sans EDTA, ni phénanthroline).

Protocole n°23 : Dosage « macro » de la concentration en Lugdulysine

Une gamme de concentrations en Lugdulysine purifiée s'échelonnant de 5 à 30 nM (concentrations finales) est réalisée dans un tampon contenant 50 mM de MES, 2 mM CaCl₂, et 200 µL d'azocaséine à 25 g.L⁻¹ (volume réactionnel final de 1 mL, pH 6,0). L'ensemble est ensuite incubé pendant 45 min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 µL de TCA 100% (poids/vol). Les protéines ayant précipitées sont éliminées par centrifugation (10.000g, 10 min) et le surnageant récupéré puis mélangé à 200 µL de NaOH 7,5 M. L'activité protéolytique est ensuite mesurée à D.O._{440nm} en point final. Une fois recueillies, les valeurs

d'absorbance relatives de cette gamme servent alors de références aux valeurs obtenues avec différentes dilutions d'un surnageant à étudier.

2) A la recherche de nouveaux substrats

Les différents résultats obtenus à partir de ces protocoles sont malheureusement limités. Tout d'abord, bien que l'azocaséine soit utilisable dans une large gamme de températures, elle ne permet pas d'étudier de telles variations de pH. En effet, le principe même du dosage, basé sur la précipitation acide du substrat non digéré, ne permet pas d'étudier des valeurs de pH inférieures à 5,0. En effet, à partir d'un pH équivalent à 4,5, de petits précipités commencent à apparaître en solution. De plus, l'azocaséine n'est pas un substrat suffisamment sensible pour réaliser des manipulations précises. Nous avons tout de même mis au point un protocole ([Protocole n°23](#)) permettant de quantifier avec plus ou moins de précision l'activité enzymatique dans un surnageant de culture. Cela a permis notamment d'évaluer les concentrations de Lugdulysine recombinante produites.

Pour finir, la composition de l'azocaséine n'étant pas clairement définie (produit relativement impur), il est impossible de réaliser des protocoles plus élaborés et sensibles avec ce substrat. Déterminer des constantes enzymatiques de la Lugdulysine (K_m , V_{max} , k_{cat}/K_m) s'avère donc impossible à réaliser. Nous avons donc, sur la base des données accumulées, recherché des substrats adaptés à ce type de manipulations. Une première série de substrats fut synthétisée : Ala-pNa (para-Nitroaniline), Gly-pNa et Lys-pNa. En principe, l'activité enzymatique est détectable suite au clivage par l'enzyme de la liaison entre l'acide aminé et le groupement pNa. Un second peptide (Abz (2-Aminobenzoyl)-Ala-Gly-Leu-Ala-Nba (Nitrobenzylamide), réputé être un substrat pour la thermolysine, fut ensuite sélectionné. Après l'échec de ces manipulations, non détaillées dans ce manuscrit, notre attention s'est portée sur la mise au point de substrats fluorescents spécifiques à la Lugdulysine. L'utilisation de substrats FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), couplés à la fois à un fluorophore et à un « quencher », est plutôt répandue. Cette technique consiste à utiliser les propriétés d'une molécule fluorescente qui absorbe la lumière (longueur d'onde dans l'UV ou le visible) pour la réémettre à une longueur d'onde plus élevée.

Quant aux séquences à synthétiser, notre attention s'est portée sur deux éléments structuraux. Il s'agit tout d'abord de la séquence du propeptide interagissant avec l'ion zinc du domaine catalytique (structure de la pro-enzyme). L'autre séquence retenue est issue d'une observation réalisée entre spectrométrie de masse et structure tridimensionnelle. En effet, la première forme isolée lors de l'étude VISLISI, contient 8 acides aminés de plus à son extrémité N-terminale que la structure obtenue par rayon X. Nous avons donc émis les hypothèses suivantes ; i) la Lugdulysine peut exercer une action autocatalytique sur son propeptide et ii) la Lugdulysine est capable de « maturer » de huit acides aminés supplémentaires les molécules voisines. En partant de ces principes nous avons conçu un premier peptide, PP74, qui sera suivi de quatre autres, les peptides PP75, 76, 77 et 78. Les deux premiers, PP74 et PP75, sont des séquences calquées sur la séquence de l'extrémité N-ter maturée. Le peptide PP75 est une version raccourcie de deux AA du peptide PP74. Le peptide PP76 est, quant à lui, basé sur la séquence du propeptide avec l'Asp⁷³ en son centre. Nous avons simplement éliminé un acide aminé hydrophobe de la séquence initiale dans l'espoir d'améliorer sa solubilité. En revanche, les peptides PP77 et PP78 ont été synthétisés dans l'optique de déterminer l'influence des acides aminés hydrophobes dans la reconnaissance du substrat. Les deux peptides sont donc identiques à l'exception que la totalité des acides aminés hydrophobes a été remplacée par des résidus hydrophiles. Historiquement, la première tentative de détermination du K_m et de la V_{max} de la Lugdulysine fut réalisée avec le peptide PP74. Les résultats obtenus suggèrent cependant que nos conditions (couple EDANS-Dabcyl, spécificité de l'enzyme, solubilité du substrat) ne permettront pas de déterminer ces constantes. Par conséquent, nous avons donc décidé de déterminer les constantes k_{cat}/K_m relatives à toute la série de peptides PP. En effet, en respectant les conditions de pseudo-ordre 1, c'est-à-dire en utilisant une concentration en substrat très inférieure au K_m (8 μM contre un K_m estimé à plus de 100 μM), l'équation de Michaelis-Menten est réduite à $V = k_{obs} \times [S]$, où $k_{obs} = V_{max}/K_m$. En intégrant cette équation en fonction du temps, nous obtenons ; $\ln[S] = -k_{obs} \times t + \ln[S_0]$, avec $[S_0]$ et $[S]$, les concentrations initiales et à un temps t en substrat. En sachant que $V_{max} = k_{cat} \times [E_t]$, où $[E_t]$ est la concentration en enzyme à un instant t , diviser k_{obs} par $[E_t]$ permet de déterminer les rapports k_{cat}/K_m . Afin de s'assurer qu'une concentration en peptides PP de 8 μM est bien en dessous du K_m , les manipulations ont également été réalisées avec une concentration de 2 μM .

Protocole n°24 : Détermination du K_m avec le peptide PP74.

Une première tentative de détermination du K_m de la Lugdulysine fut mis en place avec le peptide PP74. Pour cela, une gamme de concentrations (0, 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 150 μM) en peptide PP74 est réalisée dans une solution de 1 mL contenant un Tampon 50 mM MES, 3 mM CaCl_2 , pH 6,0 (avec une concentration finale en DMSO de 1%). Une fois mélangée, la solution est chauffée 5 min à 37°C puis transférée dans un spectrophotomètre afin de confirmer les concentrations finales en peptide PP74 ($\text{D.O.}_{478\text{nm}}$). La cuve est ensuite transférée dans un Spectrofluorometer Fluoromax-4 (Horiba Scientific) dont la chambre est thermostatée à 37°C. Après acquisition de la ligne de base (pendant 20 sec), 6 μL de la solution de Lugdulysine (concentration finale 10 nM) sont introduits avec le PP74. Après mélange par aspirations / refoulements, l'augmentation de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 334\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 513\text{ nm}$) consécutive à l'hydrolyse du peptide PP74 est mesurée pendant 180 sec à l'aide du logiciel FluorEssence (Horiba Scientific). Les vitesses initiales obtenues pour chaque concentration en PP74 sont analysées avec les logiciels Excel et Prism Software (GraphPad).

Protocole n°25 : Détermination des constantes globales k_{cat}/K_m des substrats PP74-78.

Les peptides PP74 à 78 sont solubilisés à 800 μM dans 100 % DMSO. La concentration est alors vérifiée par spectrophotométrie par lecture de la $\text{D.O.}_{478\text{nm}}$, maximum d'absorption du groupement Dabcyl. (En assumant un coefficient d'extinction molaire de 32.000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, le calcul de la valeur de la $\text{D.O.}_{478\text{nm}}$ attendue correspond à 0,320 (10 μM x 32.000)). Dix μL de cette solution (concentration finale 8 μM) sont mélangés à une solution d'un volume de 1 mL contenant un tampon universel (20 mM Tris-HCl, 20 mM Bis-Tris, 20 mM d'acétate de sodium), 100 mM NaCl et 0,5 mM de CaCl_2 , pH 5,5 (concentration en DMSO finale 1% (v/v)). La solution ainsi que la Lugdulysine (15 μL à une concentration de 4 μM) sont ensuite incubées 5 min à 37°C. La solution contenant le PP75 est ensuite transférée dans un Spectrofluorometer Fluoromax-4 (Horiba Scientific) dont la chambre est thermostatée à 37°C. Après acquisition de la ligne de base (pendant 20 sec), 10 μL de la solution de Lugdulysine sont introduits avec le PP75. Après mélange par aspirations / refoulements, l'augmentation de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 334\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 513\text{ nm}$) consécutive à l'hydrolyse du peptide PP75 est mesurée pendant 3.000 sec (15.000 sec pour le peptide PP76) à l'aide du logiciel FluorEssence (Horiba Scientific). Les courbes obtenues sont analysées avec le logiciel Prism Software (GraphPad) à l'aide d'une

méthode d'analyse de régression non linéaire (One-phase association). Les valeurs de k_{cat}/K_m ainsi obtenues ont été répétées trois fois.

Protocole n°26 : Détermination du pH optimal (PP-75)

Le peptide PP75 est solubilisé à 800 μM dans 100 % DMSO. La concentration est vérifiée selon le même procédé qu'au [Protocole n°25](#). 10 μL de cette solution (concentration finale 8 μM) sont mélangés à une solution de 1 mL contenant un tampon universel (20 mM Tris-HCl, 20 mM Bis-Tris, 20 mM d'acétate de sodium), 100 mM NaCl et 0,5 mM de CaCl_2 (concentration en DMSO finale 1% (v/v)). Le pH de la solution est calibré sur une gamme allant de pH 4,0 à pH 9,0. La solution ainsi que la Lugdulysine (15 μL à une concentration de 4 μM) sont ensuite incubées 5 min à 37°C. La solution contenant le PP75 est ensuite transférée dans un Spectrofluorometer Fluoromax-4 (Horiba Scientific) dont la chambre est thermostatée à 37°C. Après acquisition de la ligne de base (pendant 20 sec), 10 μL de la solution de Lugdulysine sont introduits avec le PP75. Après mélange par aspirations / refoulements, l'augmentation de fluorescence ($\lambda_{ex} = 334\text{nm}$ et $\lambda_{em} = 513\text{nm}$) est mesurée pendant 300 sec à l'aide du logiciel FluorEssence (Horiba Scientific). Les valeurs des 80 premiers points (qui forment une droite linéaire) sont ensuite sélectionnées afin de mesurer une pente (représentative de la vitesse initiale). L'activité relative à chaque valeur de pH est ensuite calculée en fonction de la valeur de vitesse initiale maximale (considérée comme 100%). Toutes les valeurs étudiées ont été réalisées en triplicats.

Protocole n°27 : Détermination de la température optimale (PP-75)

Une solution de peptide PP75 à 800 μM dans 100 % DMSO est préparée. La concentration est vérifiée selon le même procédé que celui du [Protocole n°25](#). 10 μL de cette solution (concentration finale 8 μM) sont mélangés à une solution de 1 mL composée d'un tampon universel (20 mM Tris-HCl, 20 mM Bis-Tris, 20 mM d'acétate de sodium), 100 mM NaCl et 0,5 mM de CaCl_2 (concentration en DMSO finale 1% (v/v)). Le pH de la solution est calibré pendant toute la durée de l'expérimentation à 5,5. La solution ainsi que la Lugdulysine (15 μL à une concentration de 4 μM) sont ensuite incubées 5 min à la température étudiée (de 30°C à 65°C). La solution contenant le PP75 est transférée dans un Spectrofluorometer Fluoromax-4 (Horiba Scientific) dont la chambre est thermostatée à la température souhaitée. Après acquisition de la ligne de base (pendant 20 sec), 10 μL de la solution de Lugdulysine sont introduits avec le PP75. Après mélange par aspirations / refoulements, l'augmentation de fluorescence ($\lambda_{ex} =$

334nm et $\lambda_{em} = 513$ nm) est mesurée pendant 300 sec à l'aide du logiciel FluorEssence (Horiba Scientific). Les valeurs des 80 premiers points (qui forment une droite linéaire) sont ensuite sélectionnées afin de mesurer une pente (représentative de la vitesse initiale). L'activité relative à chaque valeur de température est ensuite calculée en fonction de la valeur de vitesse initiale maximale (considérée comme 100%). Toutes les valeurs étudiées ont été réalisées en triplicats.

Protocole n°28 : Stabilité de la Lugdulysine en fonction de la température (PP-75)

Une solution de peptide PP75 à 800 μ M dans 100 % DMSO est préparée. La concentration est vérifiée selon le même procédé qu'au [Protocole n°25](#). 10 μ L de cette solution (concentration finale 8 μ M) sont mélangés à une solution de 1 mL contenant un tampon universel (20 mM Tris-HCl, 20 mM Bis-Tris, 20 mM d'acétate de sodium), 100 mM NaCl et 0,5 mM de $CaCl_2$ (concentration en DMSO finale 1% (v/v)). Le pH de la solution est calibré pendant toute la durée de l'expérimentation à 7,0. La solution de PP75 est incubée 5 min avant analyse. La Lugdulysine (15 μ L à une concentration de 5 μ M) est incubée pendant différents temps (5 / 10 / 30 min, 1 / 2 / 4 / 8 / 12 / 24 h) à la température étudiée (de 37°C ou 55°C). La solution contenant le PP75 est transférée après avoir été chauffée 5 min 37°C ou 55°C dans un Spectrofluorometer Fluoromax-4 (Horiba Scientific). Après acquisition de la ligne de base (pendant 20 sec), 10 μ L de la solution de Lugdulysine sont introduits avec le PP75. Après mélange par aspirations / refoulements, l'augmentation de fluorescence consécutive à l'hydrolyse du peptide PP75 est mesurée pendant 300 sec à l'aide du logiciel FluorEssence (Horiba Scientific). Les valeurs des 80 premiers points (qui forment une droite linéaire) sont ensuite sélectionnées afin de mesurer une pente (représentative de la vitesse initiale). L'activité relative à chaque valeur de température est ensuite calculée en fonction de la valeur de vitesse initiale maximale (considérée comme 100%). Toutes les valeurs étudiées ont été réalisées en triplicats.

Caractérisation de l'activité enzymatique

Cette partie regroupe l'ensemble des manipulations ayant pour objectif de déterminer le mode d'action physiologique de la Lugdulysine. En tant que peptidase, de nombreux protocoles faisant intervenir divers types de substrats, de la protéine hautement structurée aux peptides courts et sans conformation tridimensionnelle particulière. Avec le temps et l'expérience, notre équipe a pu caractériser deux interactions physiologiques potentielles qui seront détaillées en deuxième et troisième partie.

1) A la recherche d'un substrat physiologique

A) Activité de la Lugdulysine sur des protéines

Afin de commencer le travail d'investigation, nous avons mis en contact la Lugdulysine avec différentes protéines et toxines : Le lysozyme, la BSA, l'Exfoliative toxine A (Eta), le composé B de l'hémolysine γ (HlgB) et l'azocaséine (Sigma).

Protocole n°29 : Digestion des protéines par la Lugdulysine

La Lugdulysine est purifiée selon le [Protocole n°17](#). Une solution de 100 μ L contenant 50 mM MES, 2 mM CaCl_2 , et 6 μ M d'une protéine citée précédemment. A ce mélange sont ensuite ajoutées diverses concentrations de Lugdulysine afin d'obtenir des rapports de concentrations en enzyme par rapport au substrat d' 1 : 10, 1 : 30 et 1 : 100 (soit respectivement des concentrations finales de 0,6 μ M, 0,2 μ M et 0,06 μ M de Lugdulysine). Une fois mélangé, l'ensemble est placé soit 2 h soit 24 h à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 50 μ L d'EDTA à une concentration de 200 mM, pH 8,5. Les produits de digestion sont ensuite analysés par SDS Page selon le [Protocole n°7](#).

B) Activité de la Lugdulysine sur les peptides

Nous avons étudié la capacité de la Lugdulysine à digérer des peptides courts et peu structurés. Pour cela, nous avons utilisé la chaîne oxydée de l'insuline ainsi que la mélittine en référence aux travaux réalisés sur l'hycolysine¹⁶².

Protocole 30 : Digestion de l'insuline et de la méltine

L'insuline et la méltine (Sigma) ont été diluées une concentration de 5 g.L^{-1} dans une solution d' H_2O complétée par 20 mM HCl . Chaque peptide ($90 \text{ }\mu\text{g}$) est introduit dans une solution de $100 \text{ }\mu\text{L}$ constituée par soit 50 mM MES , 2 mM CaCl_2 , $\text{pH } 6,0$, soit 50 mM HEPES , 2 mM CaCl_2 , $\text{pH } 7,5$. Différentes quantités de Lugdulysine sont ensuite introduites à ce mélange afin d'obtenir des rapports massiques (enzyme : substrat) de $1 : 100$, $1 : 300$, $1 : 1000$, $1 : 3000$ et $1 : 10.000$. L'ensemble est ensuite incubé 2 h à 37°C . Après 30 min , un premier prélèvement de $30 \text{ }\mu\text{L}$ est réalisé et la réaction stoppée par l'ajout de $6 \text{ }\mu\text{L}$ de TFA 2% . Après 2 h , un deuxième prélèvement est réalisé selon le même procédé. Une fois les milieux acidifiés, les échantillons sont placés à -80°C . Les produits de digestion sont alors analysés par spectrométrie de masse.

2) Impact de la Lugdulysine sur le système immunitaire

En réponse aux résultats obtenus avec les protocoles précédents, nous avons mis au point une série de protocoles permettant d'évaluer l'action de la Lugdulysine sur le système immunitaire. Pour cela, quatre peptides de l'immunité innée, LL37, la défensine humaine 2 (hBD2), et les peptides des neutrophiles humains 1 et 2 (hNP 1 et hNP 2). Dans un premier temps, nous avons étudiés les effets bactéricides de ces différents peptides sur *Staphylococcus lugdunensis*. Dans un second temps, nous avons testés l'action de la Lugdulysine sur le peptide LL37 en pré-incubant les deux éléments avant la mise en place du test de bactéricidie. Face aux difficultés rencontrées, notamment vis-à-vis de la sensibilité de ces peptides à leurs environnement, certaines optimisations ont été réalisées. Seuls les protocoles optimisés seront détaillés au cours de ce chapitre.

A) Impact des peptides antimicrobiens sur Staphylococcus lugdunensis

Protocole n°31: Evaluation de l'activité bactéricide du peptide LL37

Deux souches, VISLISI_22 (*Staphylococcus lugdunensis*) et ATCC®25923™ (*Staphylococcus aureus*), ont été utilisées lors de ce protocole. La souche ATCC®25923™ est alors utilisée comme témoin positif de la manipulation. Le peptide LL37 (SB-peptide) fut solubilisé dans de l'eau stérile à une concentration de 1 mM . Une préculture de 3 mL de milieu MH est

ensemencée à partir de quelques colonies prélevées sur une gélose fraîche (moins de 24 h) puis incubée 1 nuit à 37°C sous agitation, 220 rpm. La culture est ensuite centrifugée 10 min, à température ambiante et 4.000 x g. Le culot est resolubilisé dans 2 mL de Tampon A (5 mM phosphate de sodium, pH 7,2) stérile. Une suspension bactérienne (SBx2) de 1 mL est préparée pour obtenir une D.O._{600nm} égale à 0,5. Suite à cela, la SBx2 est diluée au 1000^{ème} dans le Tampon A stérile. Une gamme de concentrations (de 2 en 2) en peptide LL37 est réalisée de 16 nM à 4 µM, dans le Tampon A, afin d'obtenir une solution de (LL37x2). 75 µL de SBx2 sont ensuite mélangés à 75 µL de LL37x2 dans un microtube Eppendorf de 1,5 mL. L'ensemble est alors incubé 1 h à 37°C. Chaque essai est dilué par 10, 100 et 1000 dans 1 mL de Tampon A avant que 100 µL de chaque dilution soient étalés sur gélose au sang de mouton. Les géloses sont incubées 1 nuit à 37°C. Les colonies s'étant développées sont énumérées puis comparées aux témoins sans LL37. Chaque concentration en LL37 étudiée a été répétée en triplicat tandis que les témoins ont été répétés cinq fois.

Protocole n°32 : Evaluation de l'activité bactéricide des peptides hBD2, hNP1 et hNP2

La souche *Staphylococcus lugdunensis* VISLISI_22 a été utilisée lors de ce protocole. Les peptides hBD2, hNP1 et hNP2 (Sigma -Aldrich) furent solubilisés dans de l'eau stérile acidifiée à une concentration de 1 mM. Une préculture de 3 mL de milieu MH est ensemencée à partir de quelques colonies prélevées sur une gélose fraîche (moins de 24 h) puis incubée 1 nuit à 37°C sous agitation, 220 rpm. La culture est ensuite centrifugée 10 min, à température ambiante et 4.000 x g. Le culot est resolubilisé dans 2 mL de Tampon A (5 mM phosphate de sodium, pH 7,2) stérile. Une suspension bactérienne (SBx2) de 1 mL est préparée pour obtenir une D.O._{600nm} égale à 0,5. Suite à cela, la SBx2 est diluée au 1000^{ème} dans le Tampon A stérile. Une gamme de concentrations (de 2 en 2) en peptides est réalisée de 0,8 µM à 100 µM, dans le Tampon A, afin d'obtenir une solution de (Peptidesx2). 75 µL de SBx2 sont ensuite mélangés à 75 µL de Peptidesx2 dans un microtube Eppendorf de 1,5 mL. L'ensemble est alors incubé 1 h à 37°C. Chaque essai est dilué par 10, 100 et 1000 dans 1 mL de Tampon A avant que 100 µL de chaque dilution soient étalés sur gélose au sang de mouton. Les géloses sont incubées 1 nuit à 37°C. Les colonies s'étant développées sont énumérées puis comparées aux témoins sans peptides. Chaque concentration en peptides hBD2, hNP1 ou hNP2 étudiées a été répétée en triplicat tandis que les témoins ont été répétés cinq fois.

B) Impact de la Lugdulysine sur l'activité bactéricide du peptide LL37

Protocole n°33 : Evaluation de l'activité bactéricide du peptide LL37 hydrolysé

La Lugdulysine fut produite et purifiée selon le [Protocole n°17](#) . Seule la souche VISLISI_22 fut utilisée dans ce protocole. Le peptide LL37 (SB-peptide) fut solubilisé dans de l'eau stérile à une concentration de 1 mM. Une gamme de concentrations en Lugdulysine (de 40 pM à 20 nM) est réalisée dans un Tampon A (5 mM Phosphate de sodium, pH 7,2). Le peptide LL37 est ensuite dilué à une concentration de 4 µM dans le Tampon A. 75 µL de Lugdulysine sont mélangés à 75 µL de solution de LL37 avant d'être incubé 30 min à 37°C (LL/LL37). Pendant ce temps, la préculture est centrifugée 10 min, à température ambiante et 4.000 x g. Le culot est resolubilisé dans 2 mL de Tampon A (5 mM phosphate de sodium, pH 5,2) stérile. Les bactéries sont ensuite diluées dans le Tampon A afin d'obtenir 1 mL de suspension bactérienne (SBx2) à une D.O._{600nm} égale à 0,5. Suite à cela, la SBx2 est diluée au 1000^{ème} dans le Tampon A stérile. Pour finir, 100 µL de SBx2 sont mélangés à 100 µL de solution LL/LL37 puis incubés 1 h à 37°C. Les essais sont dilués par 10, 100 et 1000 dans 1 mL de Tampon A avant que 100 µL de chaque dilution soient étalés sur gélose au sang de mouton. Les milieux gélosés sont alors incubés 1 nuit à 37°C. Les colonies s'étant développées sont énumérées puis comparées aux témoins (positif : 4 µM LL37 non digéré mélangé à la SBx2, négatifs : Tampon A mélangé à la SBx2 et LL (40 nM) mélangé à la SBx2). Chaque concentration en Lugdulysine étudiée a été répétée en triplicat tandis que les témoins ont été répétés cinq fois. Les produits de digestion du peptide LL37 ont été analysés par spectrométrie de masse.

3) Etude sur la maturation de la Prolugdulyisine

Pour finir, nous avons également étudiés les mécanismes de maturation de la Prolugdulyisine dans les surnageants de trois souches de la collection VISLISI (VISLISI_22 (sauvage), VISLISI_9 (G299S) et VISLISI 29 (S412F)). Suite aux observations faites à partir des résultats obtenus, nous avons également mis au point un protocole afin d'étudier des mécanismes potentiels de maturation de la Prolugdulyisine.

Protocole n°34 : Cinétique de maturation de la Prolugdulyisine

Une préculture de 25 mL en milieu BHI^{Ca} est réalisée pour les trois souches étudiées. Après incubation à partir de quelques colonies, les précultures sont incubées une nuit, sous agitation

(220 rpm), 37°C. Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 5 min, à température ambiante et 4.000 x *g*. Les culots bactériens sont re-suspendus avec 12,5 mL de PBS 1X stérile puis sont de nouveau centrifugés selon les mêmes conditions. Les culots sont alors solubilisés dans 12,5 mL de milieu BHI^{Ca}. A partir de cette suspension, 180 mL de milieu BHI^{Ca} sontensemencés afin d'obtenir une absorbance à D.O._{600nm} égale à 0,1. Les bactéries sont cultivées à 37°C et sous agitation (220 rpm). Des prélèvements de 1,5 mL sont réalisés à différents temps (0, 2, 4, 6, 9, 14, 24, 32 et 48 h) et 100 µL sont utilisés pour compter les unités formant des colonies par mL (UFC.mL⁻¹). Pour cela, les 100 µL sont dilués de 10 en 10 (de 10⁻¹ à 10⁻⁸) avec 900 µL de PBS. Cent µL de chaque dilution sont étalés sur géloses au sang de mouton avant d'être incubées une nuit à 37°C. Le reste des prélèvements est centrifugé 5 min à 10.000 x *g* puis le culot éliminé. L'activité de la Lugdulysine est alors déterminée à partir de ces surnageants selon le [Protocole n°23](#). Pour finir, 200 µL de surnageant sont mélangés à 28.6 µL de cOmplete™ Protease inhibitor cocktail (Roche) et 10 µL d'EDTA (concentration finale 10 mM). Les différentes formes de Lugdulysine (proenzyme, enzyme mature) sont analysées par Western Blot ([Protocole n°8](#)) à partir des surnageants mélangés aux inhibiteurs de protéases.

Protocole n°35 : Maturation de la Prolugdulyisine par la Lugdulysine

La Prolugdulyisine et la Lugdulysine ont été respectivement produites et purifiées selon les [Protocoles n°17](#) et [n°14](#). Pour être réalisé, 10 µL de Lugdulysine (concentration finale 40 nM) sont mélangés à une solution d'un volume de 100 µL contenant un tampon universel (20 mM Tris-HCl, 20 mM Bis-Tris, 20 mM d'acétate de sodium), 0,5 mM de CaCl₂, pH 5,5 complété par 4 µM de Prolugdulyisine. L'ensemble est incubé pendant 10 min, 1 h ou 17 h à 37°C. Une fois la période d'incubation terminée les réactions sont stoppées par l'ajout de 10 µL de TFA 2%. Une fois neutralisées, les solutions sont stockées à -80°C. Les produits de digestion sont analysés par spectrométrie de masse.

4) Impact de la lugdulysine sur le biofilm de *Staphylococcus lugdunensis*

Pour finir, notre équipe a développé une première approche concernant l'impact de la Lugdulysine sur le biofilm de *Staphylococcus lugdunensis*. L'utilisation du cristal violet permis d'appréhender dans un premier temps les cinétiques de formation de biofilm. Par la suite, l'ajout de molécules telles que la Protéinase K, le sodium métapériodate (NaIO₄) et la Lugdulysine, nous a permis d'étudier leur efficacité pour dégrader le biofilm.

Protocole n°36 : Etude sur la formation de biofilm par Staphylococcus lugdunensis (Crystal Violet)

Les souches VISLISI_22 (Sauvage), VISLISI_9 (G299S) et VISLISI_29 (S412F) sont repiquées sur géloses BHI moins de 24 h avant le début des manipulations. Une suspension bactérienne (SB) en milieu BHI est réalisée à partir de quelques colonies (D.O._{600nm} finale comprise entre 0,08 et 0,1). Chaque puit des microplaques 96 puits (Dutscher) estensemencé avec 200 µL de SB. L'ensemble est incubé 24 h à 37°C. Le lendemain, les bactéries non adhérentes sont éliminées par un retournement sec de la microplaque. Les puits sont ensuite lavés avec 250 µL d'eau stérile. Le biofilm est ensuite fixé avec 250 µL d'éthanol 95 % par puit pendant 20 min. Après élimination de l'éthanol, la microplaque est séchée à l'air libre pendant 30 min. Chaque puit reçoit ensuite 250 µL de Crystal Violet (Sigma) et l'ensemble est laissé incubé à température ambiante pendant 20 min. Après élimination par retournement, les puits sont lavés par 3 lavages successifs de 500 µL d'eau stérile. Une fois rincés les puits sont traités avec 250 µL d'acide acétique 30 % (v/v), afin de solubiliser le cristal violet emprisonné par les bactéries. Après 20 min d'incubation, le contenu des puits est transféré dans une nouvelle microplaque et l'absorbance à D.O._{492nm} est mesurée (MultiSkan EX, LabSystems). Les puits sans SB servent de contrôles négatifs et de blancs.

Protocole n°37 : Impact du NaIO₄, de la Protéinase K et de la Lugdulysine sur le détachement du biofilm de Staphylococcus lugdunensis

Les souches VISLISI_22 (Sauvage), VISLISI_9 (G299S) et VISLISI_29 (S412F) sont repiquées sur géloses BHI moins de 24 h avant le début des manipulations. Une suspension bactérienne (SB) en milieu BHI est réalisée à partir de quelques colonies (D.O._{600nm} finale comprise entre 0,08 et 0,1). Chaque puit des microplaques 96 puits (Dutscher) estensemencé avec 200 µL de SB. L'ensemble est incubé 24 h à 37°C. Le lendemain, les bactéries non adhérentes sont éliminées par retournement de la microplaque. Chaque puit reçoit alors un traitement de 2 h à 37°C avec soit 250 µL de Protéinase K à une concentration de 50 µg.mL⁻¹ dans un tampon 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,5, soit 250 µL de NaIO₄ dilué dans de l'eau stérile soit 250 µL de Lugdulysine à une concentration de 50 µg.mL⁻¹ dans un tampon 50 mM MES, 0,5 mM CaCl₂, pH 6,0. Après incubation, les puits sont vidés puis lavés avec deux rinçages successifs de 250 µL d'eau stérile. Le biofilm restant est ensuite fixé avec 250 µL d'éthanol 95 % par puit pendant 20 min. Le reste du protocole est identique aux étapes décrites dans le [Protocole n°5.8](#).

Afin de compléter ces premières observations, une deuxième méthodologie fut employée. Cette fois-ci, l'évolution du biofilm et l'impact des différentes molécules est évaluée à l'aide du Biofilm Ring Test® (BioFilm Control). Cette technique s'appuie sur l'utilisation d'un milieu de culture BHI complété avec des billes magnétiques.

Protocole n°38 : Etude de l'impact de la Lugdulysine sur la détachement du biofilm

Les souches VISLISI_22 (Sauvage), VISLISI_9 (G299S) et VISLISI_29 (S412F) sont repiquées sur géloses BHI moins de 24 h avant le début des manipulations. Quelques colonies sont solubilisées dans 1 mL d'eau stérile. A partir de cette suspension, une solution bactérienne en milieu BHI estensemencée pour obtenir une D.O._{600nm} équivalente à 0,004. A cette SB sont ajoutés 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de billes magnétiques « Toner ». Chaque puit est alorsensemencé avec 200 μL de cette solution SB + billes. Les microplaques sont alors incubées pendant 4 h à 37°C. Une fois l'incubation terminée, un produit de contraste (BioFilm Control) est ajouté à la surface de chaque puit. Les microplaques sont ensuite magnétisées 1 min avant d'être analysées par scanner. Les données sont alors analysées par le logiciel BFC Eléments® 3 (BioFilm Control) puis traitées avec Excel (Microsoft 365). Dans le cadre du traitement préventif, chaque puit contenant 200 μL de mélange SB + billes est mélangé avec 20 μL de Protéinase K (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de Lugdulysine (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ou de NaIO_4 (400 mM). Pour le traitement curatif, 20 μL de ces trois éléments sont ajoutés aux puits correspondants après la période d'incubation de 4 h. Le mélange est alors réincubé 2 h supplémentaires à 37°C. L'incubation et la révélation de ces variations sont identiques au protocole principal. Les puits avec du BHI stérile + billes servent de contrôles négatifs.

Etudes cristallographiques

La détermination des structures tridimensionnelles de la Lugdulysine et de la Prolugdulyisine (E242Q, Y315F) a été réalisée en collaboration avec l'équipe « Biologie Structurale et Intégrative » codirigée par les Dr. Valérie Lamour et Marc Ruff (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, IGBMC). Les manipulations, à l'exception de la purification des enzymes, ont été conduites par Nicolas Levy. Les cristaux de protéines dans cette étude sont obtenus par la technique de diffusion de vapeur. Il s'agit d'une des techniques les plus utilisées dans les expérimentations de cristallisation. La diffusion de vapeur est un système dynamique dans lequel le réservoir, qui contient les agents précipitants de la solution de criblage, agit de manière à concentrer les gouttes de cristallisation suspendues au couvercle de la boîte 96 puits. Pour être réalisé, la solution protéique est mélangée avec un volume équivalent de solution de criblage puis équilibrée contre cette même solution (deux fois plus concentrée que la goutte). Dans ces conditions, l'eau contenue dans la goutte suspendue s'évapore afin d'atteindre un équilibre entre les deux solutions. Ainsi, la concentration de la protéine contenue dans la goutte augmente ce qui peut conduire à la formation de cristaux.

Protocole n°39 : Procédure de cristallisation

Les enzymes utilisées lors de cette procédure ont été purifiées selon les [Protocole n°14](#) (E242Q-Y315F Prolugdulyisine) et [Protocole n°17](#) (Lugdulyisine) et transmises dans un tampon 30 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 8,0. Les enzymes ont d'abord été concentrées à des concentrations comprises entre 7 et 20 mg.mL⁻¹ avec des filtres à centrifuger Amicon Ultra-0,5 mL 30 KDa (Merck). Des essais de cristallisation ont été réalisés à partir de kits de criblage commerciaux selon la technique de diffusion de vapeur sur goutte suspendue à 20°C. Pour cela, 200 nL d'enzyme sont mélangés à 200 nL d'agents cristallisants de façon automatisée à l'aide d'un Mosquito® HTS (TTP Labtech). Environ 400 conditions ont été testées grâce à ce système. Les cristaux de Lugdulysine ont été obtenus dans les conditions suivantes : 100 mM Cacodylate de sodium, 30 % (p/v) polyéthylène glycol (PEG) 8.000, 200 mM Acétate de sodium (Qiagen, Classics screen, condition F11). La meilleure condition de cristallisation pour la Prolugdulyisine mutée est obtenue avec un Tampon 100 mM Tris-Bicine, pH 8,5 ; 12.5% (v/v) (RS)-2 méthyl-2,4-pentanediol (MPD), 12.5% (p/v) PEG 1.000; 12.5% (p/v)

PEG 3.350 ; 30 mM MgCl₂, 30 mM CaCl₂ (Molecular Dimensions, Morpheus screen, condition A12).

Protocole n°40 : Obtention des données et détermination des structures

A cause de l'absence de structure tridimensionnelle similaire à celle de la Lugdulysine et pouvant servir de modèle, les essais de remplacement moléculaires ont échoué. Les problèmes de phase ont été résolus par dérivatisation aux atomes lourds. Pour cela, les cristaux de Lugdulysine ont été trempés dans une solution de cristallisation complétée par 300 mM 4-iodopyrazole et 30% (v/v) de glycérol pendant quelques minutes. Ces cristaux sont ensuite congelés dans un cryo-flux d'azote directement implanté sur la ligne du faisceau à Rayon X. Un jeu de données complet a été collecté à une longueur d'onde de 1.542 Å avec un détecteur Eiger 4M (Dectris) à partir d'un seul cristal. L'identification des atomes lourds (32 atomes au total) suivie d'un traçage poly-Ala ont été effectués avec la suite de logiciels ShelX sur la plateforme en ligne CCP4 (<https://ccp4online.ccp4.ac.uk/ccp4online/>). La construction manuelle (Coot) et le raffinement de la structure (Phenix) ont permis de résoudre la structure de la Lugdulysine. Cette structure fut ensuite utilisée comme modèle pour un remplacement moléculaire, afin d'obtenir, à partir du jeu de données originel, une amélioration de la résolution. Le modèle final a été affiné avec de très bonnes statistiques (R = 0,16; Rfree = 0,18). Cette structure de la Lugdulysine a ensuite servi de modèle de remplacement moléculaire dans la détermination de la structure de la Prolugdulysine mutée.

Spectrométrie de masse

Les manipulations relatives à la spectrométrie de masse réalisées au cours de cette thèse ont été menées en collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (UMR 7178, IPHC). Toutes les expérimentations ont été réalisées par Jean-Marc Strub. Globalement, deux approches protéomiques ont été employées. Les analyses de spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase liquide (LC-MS) ont été utilisées pour déterminer les masses des protéines en solution. Cette méthodologie a notamment permis d'identifier la structure primaire de la Prolugdulsine (E242Q-Y315F) maturée par la Lugdulsine ou encore de détecter le domaine du propeptide lié à la Lugdulsine mature. C'est également de cette façon que nous avons pu conclure que les peptides hBD2 et hNP1 n'étaient pas hydrolysés par l'enzyme. Dans certains cas, des mesures de spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS) ont été menées. Cette approche fut précieuse pour déterminer la composition et la séquence des produits issus de l'hydrolyse d'un substrat par la Lugdulsine. C'est donc par cette méthode que l'ensemble des sites de clivages et les produits de digestions qui leurs sont associés ont été identifiés.

La spectrométrie de masse joue donc un rôle de validation essentiel tout au long de ces travaux. Ainsi, toutes les enzymes utilisées au cours de ces travaux (suite aux différentes purifications, avant la cristallisation de la Lugdulsine et de la Prolugdulsine..) ont été séquencées. La spectrométrie de masse, LC-MS et LC-MS/MS, a donc accompagné et validé la majeure partie de nos expérimentations.

Annexes du matériels et méthodes

Tableau 6 : Souches utilisées et construites lors de cette thèse

Souches	Génotypes	Références
Souches d'<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96 (nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i> F' [::Tn10 <i>proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15</i>] <i>hsdR17(rκ⁻ mκ⁺)</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-)</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB+</i>]K-12(λS)	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16</i> <i>rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> WK6	F, <i>lacI^q, Δ(lacZ), M15, proA+B+ Δ(lac-proAB), galE,</i> <i>rpsL</i>	Collection de l'IGBMC
Souches de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>		
<i>S. lugdunensis</i> VISLISI	81 souches "sauvages"	Collection VISLISI ²⁶
<i>S. lugdunensis</i>	6 souches "sauvages"	Collection de Rouen
Souche de <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>S. aureus</i> souche ATCC® 25923™	Souche "sauvage"	Collection du laboratoire

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées au cours de cette thèse

Amorces	Séquences 5' -> 3'	Utilisations
F1-LL R1-LL	5' <i>GATCGTCAACATTTGAATGAAT</i> 3' 5' <i>GTGCAGTATTCGTATCACCTGGA</i> 3'	Détection du gène <i>s/p1</i>
F2-LL R2-LL	5' <i>AGGAGAGTCTGCTATGAACATTTAC</i> 3' 5' <i>CGTTAGCTAATGAACTTCTGACAAGTGA</i> 3'	Séquençage complet du gène <i>s/p1</i>
F3-LL R3-LL	5' <i>TCCTCTATGCTTGCAATCAATATTTAA</i> 3' 5' <i>GCAACAATGTCATAAGCGATAGT</i> 3'	Séquençage du gène <i>s/p1</i> et des régions bordantes

Tableau 8 : Plasmides construits et utilisés au cours de cette thèse

Plasmides	Caractéristiques	Références
Plasmides d'expression		
pGEX6P1	Vecteur d'expression de protéines recombinantes couplées à la GST	Collection du laboratoire
pGEX6P1-LL	pGEX6P1 portant la séquence de la Lugdulysine mature	Ce travail
pGEX6P1-proLL	pGEX6P1 portant la séquence de la Prolugdulyisine (propeptide - enzyme mature)	Ce travail
pHEN6	Vecteur d'expression périplasmique de protéines recombinantes couplées à un tag STREP	Collection de l'IGBMC
pHEN6-Clone1	pHEN6 portant la séquence entière du gène <i>slp1</i> (peptide signal -propeptide - enzyme mature)	Ce travail
pHEN6-Clone2	pHEN6 portant la séquence de la Prolugdulyisine (propeptide - enzyme mature)	Ce travail
pHEN6-Clone3	pHEN6 portant la séquence entière et mutée (E242Q / Y315F) du gène <i>slp1</i> (peptide signal -propeptide - enzyme mature mutée)	Ce travail
pHEN6-Clone4	pHEN6 portant la séquence de la Prolugdulyisine mutée (E242Q / Y315F) (propeptide - enzyme mature mutée)	Ce travail
pHEN6-Clone5	pHEN6 portant la séquence de la Prolugdulyisine mutée (G299S) (propeptide - enzyme mature mutée)	Ce travail
pHEN6-Clone6	pHEN6 portant la séquence de la Prolugdulyisine mutée (S412F) (propeptide - enzyme mature mutée)	Ce travail

Chapitre 3

Résultats

Introduction

Ce nouveau chapitre se concentre essentiellement sur la présentation des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Dans un premier temps, une revue, intitulée « Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics » fut publiée en collaboration avec le Dr. Argémi. Il s'agit alors de recenser des informations recueillies lors de séquençages de génomes complets des CoNS les plus fréquents comme *Staphylococcus epidermidis*, *lugdunensis*, *capitis*, *caprae*, *haemolyticus* et *saprophyticus*. Les génomes ont donc révélé l'existence de facteurs de virulence potentiellement impliqués dans la pathogénicité tels que les PSM, les protéines d'adhésion, des peptidases etc. Cette première revue permet ainsi de lister et d'observer la plupart des facteurs de virulence synthétisés par ce type de bactéries.

Dans un second temps, nous avons rassemblé l'ensemble des données accumulées au cours de cette thèse pour réaliser un article conséquent intitulé « High resolution structures of *Staphylococcus lugdunensis* M30 zinc metallopeptidase reveals a unique sustainable relationship with its propeptide ». L'objectif de cette publication est donc d'unir nos différentes observations permettant de dévoiler et d'expliquer le comportement particulier de cette classe M30 de zinc de métallopeptidases. Dans cette publication, nous présentons notamment les structures détaillées de la Prolugdulyisine mutée et de la Lugdulyisine active. Nous démontrons également l'impact fonctionnel de la Lugdulyisine *in vitro* et développons des outils moléculaires, comme les substrats PPs fluorescents, pour l'étude des paramètres cinétiques de cette peptidase.

Pour finir, des résultats complémentaires à cet article sont présentés dans les Parties 4 et 5 de ce chapitre. Dans ce cas-ci, un effort est réalisé pour montrer les connexions qui s'installent entre les caractérisations structurales, génomiques et fonctionnelles de la Lugdulyisine. L'objectif est donc de présenter en détail le cheminement intellectuel menant à certaines conclusions élaborées au cours de cette thèse. En effet, chaque résultat présenté est le produit de réflexions entrecroisées et mûries au fil du temps et des différents résultats obtenus. Ainsi, de par les données structurales établies, nous avons pu comprendre le fonctionnement de ce propeptide si particulier ainsi que la spécificité de cette enzyme pour un certain type de substrat. Ce dernier chapitre est également un endroit privilégié pour poser

quelques hypothèses sur la Lugdulysine, tant du point vu de sa sécrétion que de sa maturation. Pour finir, nous présenterons également quelques manipulations préliminaires, en particulier sur le biofilm, qui pourraient compléter l'étude de la Lugdulysine dans un futur proche.

En résumé, ces résultats tendent donc à définir et rassembler un maximum de connaissances sur la Lugdulysine et donc indirectement sur les zinc métallopeptidases de la famille M30. L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse ont donc permis d'établir une base de données fiables sur ces peptidases malheureusement délaissées jusqu'à présent. Ainsi, nous espérons sincèrement que ces résultats structuraux, biochimiques et fonctionnels pourront servir de références et d'outils pour la mise en place de manipulations futures.

Article 1 : « Coagulase Negative Staphylococci Pathogenomics »

Article 2 : « *Staphylococcus lugdunensis* M30 zinc metallopeptidase, lugdulysin, stabilizes with part of its propeptide and protects from lysis by LL37»

Des analyses génétiques à la maturation de la Lugdulysine

1) Etudes complémentaires du gène *slp1* et mutations naturelles

L'étude de la Lugdulysine a débuté par celle du génome de *Staphylococcus lugdunensis*. Nous avons pu directement travailler avec la souche de référence VISLISI_22²⁶ grâce aux travaux réalisés dans notre unité par le Dr Xavier Argémi¹⁰². Cette étude présente le séquençage complet du génome de sept souches, VISLISI_21, 22, 25, 27, 33, 37 et C33, de *S. lugdunensis*. Toutes ces souches ont été prélevées au Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg dans diverses situations infectieuses telles que des endocardites (VISLISI_22), des infections ostéoarticulaires ou encore des bactériémies. Notre étude s'est portée principalement sur la souche VISLISI_22 (référence NCBI : NZ_CP020764.1) puisqu'il s'agit de la souche utilisée historiquement pour la purification et la caractérisation de la Lugdulysine²⁶. Pour rappel, la Lugdulysine est codée par le gène *slp1*, pour « *Staphylococcus lugdunensis* protéase 1 » en référence au gène *shp1* codant l'enzyme de référence nommée Hycolysine. Par ailleurs, la souche VISLISI_22 présente l'avantage de posséder un gène *slp1* identique à celui du génome de la souche de référence, N920143. Nous sommes donc partis du principe que ce gène est une parfaite représentation du gène sauvage. Une première série d'identification du gène fut réalisée lors cette étude VILISI pour identifier la présence du gène dans le génome des 81 souches de l'étude. L'objectif était alors d'amplifier une portion à l'intérieur du gène *slp1* et vérifier sa présence par PCR puis séquençage.

Pour compléter cette étude, nous avons donc cherché à séquencer le gène *slp1* en entier, ainsi que ses régions bordantes, sur l'ensemble de ces 81 souches. Ces informations, couplées aux prédictions informatiques, ont permis de caractériser et décrire ce gène *slp1*. De façon surprenante, les mutations décrites dans les souches VISLISI ont permis, en parallèle des données structurales accumulées, de décrire un nouveau type de propeptide chaperon et d'envisager un mécanisme de maturation. Ces résultats complémentaires tentent ainsi de compléter au mieux les analyses réalisées dans l'[Article 2](#).



Figure 21 : Prédiction du peptide signal et de la séquence primaire de la pré-Prolugduly sine

A) Graphique des prédictions réalisées par le serveur SignalP-5.0²²¹. La composition du peptide signal permet de définir avec précision sa taille ainsi que le système de sécrétion emprunté par la Prolugduly sine. B) Les résidus constitutifs du peptide signal prédit par SignalP-5.0 sont représentés en vert et les résidus d'acides aminés de la Prolugduly sine sont colorés en bleu.

Le gène *slp1* code donc une pré-Prolugduly sine par l'intermédiaire d'une séquence localisée en 5' et codant un peptide signal de 27 résidus d'acides aminés. Selon le serveur de prédiction SignalP-5.0²²¹ (Figure 21), cette séquence de 27 résidus permet l'export de l'enzyme via le système de sécrétion Sec, et semble être éliminée par la Signal Peptidase I. En effet, le peptide signal de la Lugduly sine peut être décomposé en trois régions distinctes (Figure 22). La région N-terminale de ce peptide signal contient notamment des résidus chargés positivement. Ce domaine est suivi par une région hydrophobe correspondant à la taille théorique comprise entre 7 et 15 acides aminés. Pour finir, la région C-terminale contient

le motif de clivage reconnu par la Signal Peptidase I, généralement représenté par les résidus $^{-3}\text{AlaXAla}^{-1}$ (ou X représente n'importe quel acide aminé).



Figure 22 : Séquence primaire du peptide signal de la Lugdulysine

La séquence du peptide signal fut déduite par SignalP-5.0²²¹. Les différentes régions du peptide signal ont été déduites et représentées à partir des propriétés du système de sécrétion Sec décrites par Auclair *et al.*²²² Le site de clivage par la Signal Peptidase I est représenté par une flèche noire.

Ces données nous indiquent qu'à la suite de sa synthèse, la Prolugdulysine est probablement prise en charge par le système de sécrétion Sec. Brièvement, ce système facilite l'export de protéines dans le milieu extérieur chez un grand nombre de bactéries. Le système Sec est composé par un total de 7 protéines, de SecA à SecG. Parmi cet ensemble, deux protéines intramembranaires (SecD et SecF) semblent avoir un rôle majeur, mais leur fonction exacte n'a pas encore été résolue²²³. Deux protéines, SecA et SecB, ont un rôle de chaperonnes intracellulaires. Les pré-protéines nouvellement synthétisées seront donc fixées soit par SecA, soit par SecB, puis transportées vers le canal de transport. Les pré-protéines interagissent alors avec le transporteur par l'intermédiaire de SecA. Ce transporteur est constitué par les trois autres protéines, SecYEG, qui forment un complexe intramembranaire permettant la translocation de la pré-Prolugdulysine vers l'extérieur^{222,223}. Pour finir, ce système est associé à la Signal Peptidase I, une sérine peptidase ancrée à la membrane par l'intermédiaire d'une région transmembranaire²²²(**Figure 23**). Cette enzyme préfère les petits résidus neutres tels que l'Ala, la Gly, la Ser ou la Cys, bien que la prédominance des résidus Ala ait donné la composition au motif Ala-X-Ala. Cette spécificité s'explique notamment par une reconnaissance induite par les sous sites de la poche catalytique. Ainsi, une région C-terminale trop longue réduit fortement l'efficacité de la catalyse, car le motif Ala-X-Ala se retrouve localisé trop loin du site actif²²².

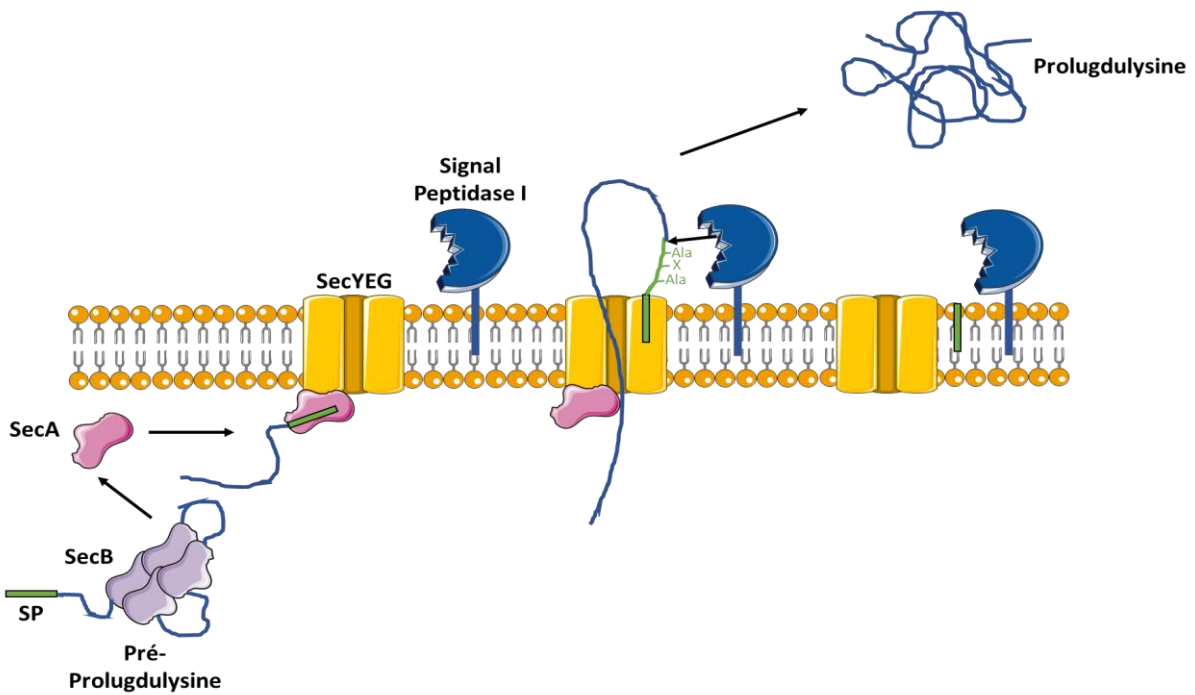


Figure 23 : Représentation hypothétique de la sécrétion de la Prolugdulylsine par le système Sec/SPI

Dans ce schéma, la pré-Prolugdulylsine est hypothétiquement prise en charge par la protéine SecB avant d'être transférée vers SecA. Une fois l'échange effectué, le complexe pré-Prolugdulylsine-SecA interagit avec le transporteur SecYEG. L'interaction entre le peptide signal de la pré-Prolugdulylsine et le transporteur expose son motif Ala-X-Ala qui est ensuite clivé par la Signal Peptidase I. Une fois le peptide signal éliminé, la Prolugdulylsine est libérée dans le milieu extérieur. Schéma adapté de Auclair *et al.*²²²

Une fois sécrétée, la Prolugdulylsine doit subir une étape de maturation (élimination du propeptide), afin d'être active. Il est donc possible de déduire la taille et la composition de son propeptide par comparaison entre la séquence de la Prolugdulylsine et celle de la Lugdulylsine. Ainsi, lors de sa caractérisation initiale dans l'étude VISLISI²⁶, la Prolugdulylsine fut décrite comme possédant un propeptide formé par 64 résidus d'acides aminés (Figure 24). Cependant, la résolution de la structure de la Lugdulylsine (PDB : 7BB8), nous a permis de découvrir une enzyme tronquée de huit résidus d'acides aminés supplémentaires. Ces huit résidus d'acides aminés ne sont pas présents sur la carte de densité électronique révélée lors des études cristallographiques et sont donc absents de l'enzyme cristallisée. De plus, la structure de la Prolugdulylsine (PDB : 7BB9) laisse supposer que cette région, peu structurée et tournée vers l'extérieur, serait susceptible d'être éliminée par l'action d'une peptidase extérieure. Cette observation fut confirmée par des analyses de spectrométrie de masse qui

ont permis de confirmer la purification et la cristallisation d'une Lugdulysine légèrement tronquée.

MNISHKLLIALSTTITIALPISQCAQAASYVVNNENIDKDGRQAYTGSYNRAALKQQTVKQMGPQNREAF
KEDKLFKAPKNKQPIRSENRSQNGGKQYSLNDQRTFTTIDNRTNQDEQTTATLKYDGKKAQVWVADQ
YITDKQAQNIGREFDERIDPLIENNFGEPSDVDNNGKVNILVYDIKDNVDQGTGTYIGGFHPRDLYNVRS
NHSEIFYMDTYPSMGTDQRHLNESQIYSTLAHEYQHVMNANENLFKEQSQEEMDPWLNEALSMASEQ
MYLNAPLNSRIDYYNNSKSIAYGHSLIRWDEQGDTLSNYSLSYLFIEYLKKQSDNGEQVFKELINDPGDTNT
ALQNAIHEHVDPNLSLSKFMTNFRIALVKKENSGPYGFKGDADFNNVHPQPISQIPETLAPQGSVLFQTN
QDFNVPNDKDEDISYNKVN

Figure 24 : Séquence primaire et domaines de la pré-Prolugdulyisine

Le peptide signal de la pré-Prolugdulyisine est représenté en vert. Le propeptide, tel qu'il est décrit dans l'étude VISLISI est représenté en rouge. Les résidus colorés en orange sont les huit acides aminés manquants dans la structure de la Lugdulysine. La séquence complète du gène *slp1* est disponible avec la référence NCBI : WP_002460836.1.

L'absence de ces résidus peut donc, soit révéler le site réel de maturation de l'enzyme, soit être représentative d'une maturation plus poussée de l'enzyme. Dans le premier cas, cette observation pourrait remettre en question la taille du propeptide. Ainsi, le propeptide serait constitué par 72 résidus d'acides aminés et non de 64. La deuxième explication pourrait venir des variations imposées dans le protocole de purification de la version cristallisée. En effet, la Lugdulysine tronquée est purifiée après une étape de précipitation au sulfate d'ammonium. Cette précipitation concentre notamment les peptidases (Lugdulyisine et autres) qui pourraient ainsi hydrolyser ces régions flexibles. Dans les deux cas, l'activité enzymatique n'est en rien affectée par la présence, ou l'absence, de ces résidus. Bien que l'hypothèse d'une dégradation par des peptidases extérieures lors de la purification soit plus probable, il est difficile de conclure quant à la taille réelle de ce propeptide.

La mise en place d'une analyse détaillée du gène *slp1* fut également motivée par une observation réalisée au cours de l'étude VISLISI. En effet, les auteurs se sont aperçus que, malgré la présence du gène dans 100 % des souches étudiées, seulement 62% d'entre elles,

(soit 50 sur 81 souches) développent une activité protéolytique détectable dans leur surnageant de culture. Nous avons donc cherché la présence de mutations naturelles au sein du gène *slp1* permettant d'expliquer l'existence d'un phénotype protéolytique négatif. Le séquençage systématique des 81 souches VISLISI fut complété par des « Western Blot ». Ainsi, il nous fut possible d'associer la détection d'activité protéolytique sur azocaséine, la séquence primaire et la maturité de la Lugdulysine associée à un surnageant donné. Le séquençage complet du gène a permis de détecter un certain nombre de mutations naturellement présentes dans ces souches cliniques (Tableau 9).

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des mutations du gène *slp1* chez les souches de *Staphylococcus lugdunensis* VISLISI

Les différentes mutations sont associées à la détection de l'activité protéolytique des surnageants sur l'azocaséine et à l'apparence de la Lugdulysine en « Western Blot ».

Phénotypes (azocaséine)	Mutations observées	Localisation	Apparence et maturité de l'enzyme	Fréquence
Positif	Gln -> Lys	43	Lugdulysine	6 / 81
	Asp -> Asn	342	Lugdulysine	1 / 81
	Lys -> Gln	387	Lugdulysine	2 / 81
	Sans mutation		Lugdulysine	43 / 81
Négatif	Gln -> Lys	43	Prolugdulysine	2 / 81
	Gly -> Ser	299	Prolugdulysine	16 / 81
	Trp -> Stop	305	Enzyme tronquée	2 / 81
	Ser -> Phe	412	Prolugdulysine	4 / 81
	Sans mutation		Prolugdulysine	5 / 81

Parmi les mutations observées, la mutation Gln43Lys est la seule localisée dans le propeptide. De par sa position, nous pensions initialement que cette mutation serait éliminée lors de la maturation. Cependant, le résidu se situe au niveau du domaine structurant du propeptide et reste donc associé au domaine catalytique (Figure 25). Dans tous les cas, la mutation Gln43Lys ne semble pas avoir d'impact sur l'activité enzymatique puisqu'elle est présente dans des enzymes actives comme inactives (Tableau 9). Deux autres mutations, Asp342Asn et Lys387Gln, n'ont pas d'impact sur l'activité enzymatique et la maturation puisque les enzymes associées sont maturées et actives (Tableau 9 et Figure 25). Cependant,

il est possible de constater que le résidu Asp342 appartient à la sphère de coordination de l'ion calcium n°3 (Figure 25). Cependant, la mutation en résidu Asn ne semble pas perturber ce site malgré l'importance de l'intégrité structurale de cette zone. Il est intéressant de noter que des résidus Asn sont naturellement utilisés dans la coordination d'un ion calcium dans les sites n°2 (Asn173) et n°3 (Asn252). Le contact perdu entre l'ion calcium et le résidu Asp est donc potentiellement remplacé par une liaison avec le résidu Asn.

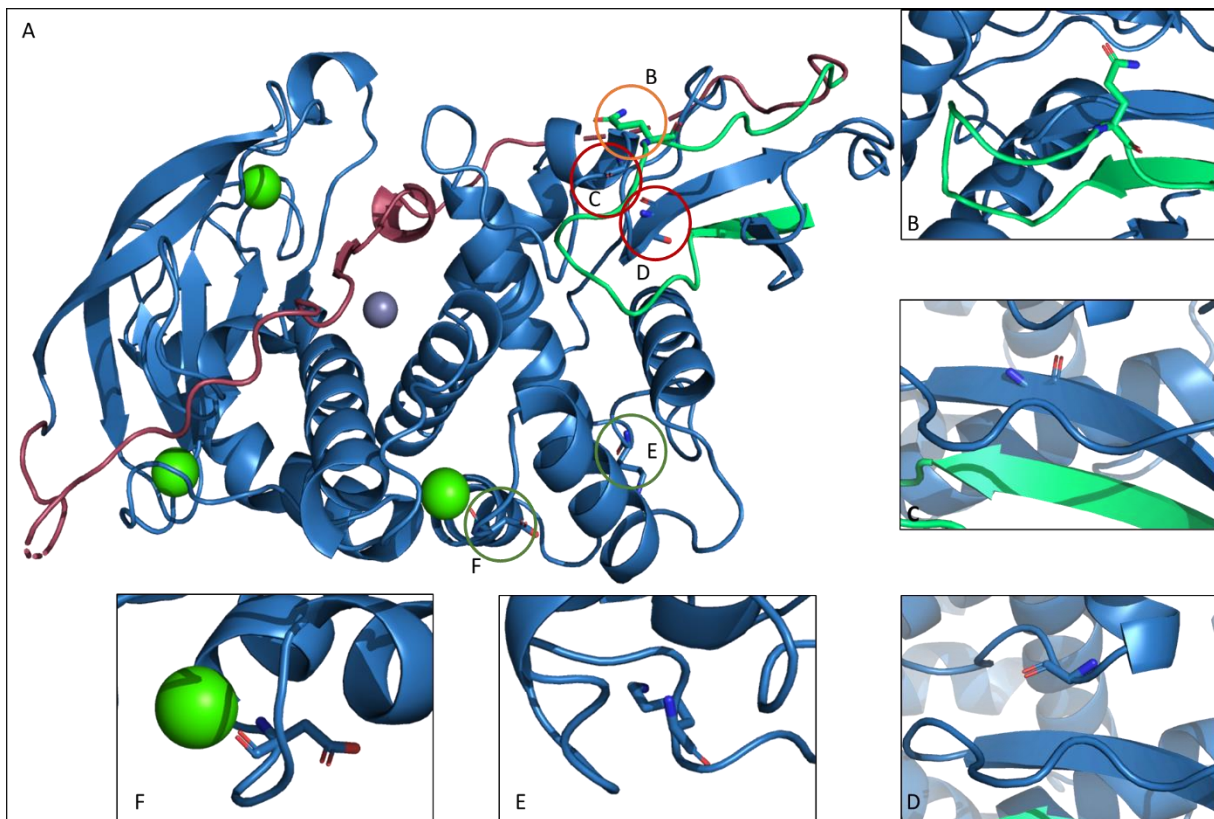


Figure 25 : Représentation et localisation des mutations naturelles retrouvées chez les souches de *Staphylococcus lugdunensis* de la collection VISLISI

Le domaine catalytique de la Lugdulysine est représenté en bleu. Le domaine structural du propeptide est représenté en vert tandis que son domaine inhibiteur est représenté en rouge. Les ions zinc et calcium sont représentés en gris et vert, respectivement. Il s'agit d'une représentation globale de la Prolugdulyse (PDB : 7BB9). Les acides aminés pouvant être mutés sont représentés et associés à une image précisant leur localisation et environnement respectifs. Les résidus sont entourés en vert si la mutation est associée à une enzyme active, en rouge, les résidus associés à une Prolugdulyse inactive et en orange lorsque les deux formes de l'enzyme ont été détectées.

Un certain nombre de mutations ne sont donc présentes que dans des Prolugdulyses sans activité catalytique. Une première mutation, Trp305Stop, est responsable de la production d'une Lugdulysine tronquée, inactive mais suffisamment stable pour être

observable ([Tableau 9](#) et [Figure 25](#)). Les mutations Gly299Ser et Ser412Phe, sont particulièrement représentées, bien que les souches soient réputées indépendantes entre elles. En effet, nous avons recensé 16 et 4 de ces mutations dans les souches VISLISI²⁶, respectivement, soit environ 70 % des enzymes à phénotypes négatif sur azocaséine. D'autres souches, isolées dans la ville de Rouen, sont également porteuses de la mutation Gly299Ser²²⁴. De plus, les enzymes affligées par une de ces mutations sont systématiquement présentes dans le surnageant de culture sous une forme Prolugdulyisine inactive ([Tableau 9](#) et [Figure 25](#)).

Nous pouvons également constater que certaines souches (5 / 81) sécrètent une Prolugdulyisine sauvage incapable d'être maturée. Afin de comprendre ce phénomène, les régions bordantes du gène *slp1* chez ces souches ont été séquencées. Cependant, nous n'avons pas découvert d'anomalie ou de mutation pouvant expliquer l'absence de maturation et d'activité. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, quelques-unes de ces souches (3 / 5) sont associées à des phénotypes atténués et une croissance limitée. Il pourrait également s'agir d'une peptidase impliquée dans la maturation de la Prolugdulyisine mutée dans ces génomes, ou encore de problèmes liés à son expression. Malheureusement, l'absence de génomes complets disponibles pour ces souches rend toute conclusion impossible à partir de ces simples résultats.

[2\) Le propeptide de la Lugdulyisine : une nouvelle classe de chaperonnes intramoléculaires ?](#)

Dans les premiers temps, il nous fut difficile d'envisager pourquoi les Prolugdulyisines mutées Gly299Ser et Ser412Phe n'apparaissent jamais sous une forme active ([Tableau 9](#)). En effet, ces mutations sont localisées relativement loin du site actif et nous ne parvenions pas à comprendre leurs effets potentiels. C'est la résolution tri-dimensionnelle de la structure de la Lugdulyisine qui a apporté un début de réponse à ce questionnement. Il apparaît que ces deux mutations sont localisées à proximité (Gly299Ser) ou directement dans la zone d'interaction (Ser412Phe) entre le domaine structurant du propeptide et le domaine catalytique de l'enzyme ([Figure 25](#)). Nous supposons donc que ces mutations ont un impact direct sur le site d'interaction et perturbent ainsi le bon repliement et la maturation de l'enzyme.

Cette hypothèse est renforcée par différents constats réalisés au cours de nos travaux. En effet, une attention particulière fut portée sur ces deux enzymes mutées. Les tentatives de production, par l'intermédiaire de divers systèmes d'expressions, ont systématiquement échoué. Les essais de production réalisés à partir de souches d'*E. coli* n'ont pas permis d'obtenir une surexpression de Prolugdulyisine Ser412Phe. De plus, les tentatives de purification à partir du surnageant de culture de la souche *S. lugdunensis* VISLSI_29 (présentant la mutation Ser412Phe) ont révélé que malgré la mutation, cette Prolugdulyisine peut potentiellement se maturer en une forme active. En effet, après la première étape de précipitation au sulfate d'ammonium (AS), le culot resolubilisé développe une activité protéolytique significative sur l'azocaséine. Cependant, cette activité s'estompe rapidement et devient nulle moins de 24 heures après le début de la purification. Cette baisse d'activité catalytique est confirmée par la dégradation visible, et plutôt rapide, de la Prolugdulyisine Ser412Phe en SDS-PAGE (Figure non montrée). En effet, des bandes de dégradation apparaissent dès les premiers instants de la purification et la mutation Ser412Phe n'affectant pas le site actif, ce dernier reste fonctionnel. La Prolugdulyisine fragilisée par cette mutation devient susceptible à la dégradation par les peptidases exogènes ou par ses homologues. Ainsi, l'augmentation de la concentration des peptidases au cours de la purification induit l'auto-dégradation de l'enzyme mutée.

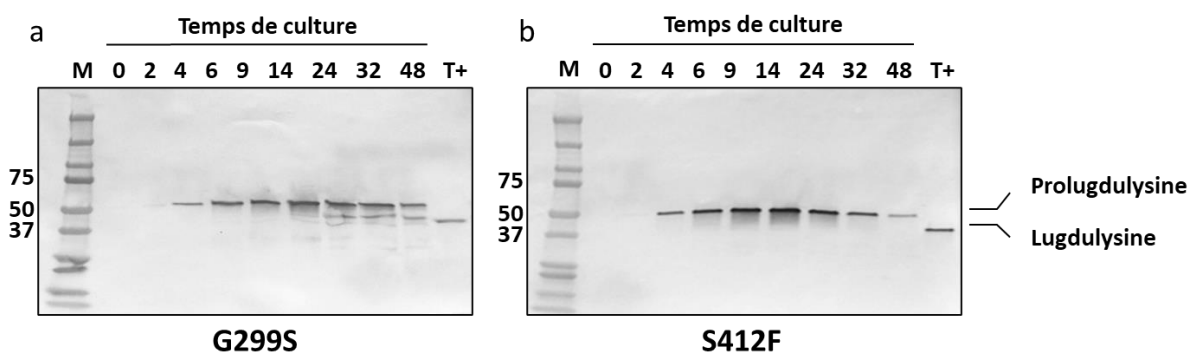


Figure 26 : Cinétique de maturation sur 48 h de la Lugdulyisine synthétisée par les souches *S. lugdunensis* VISLISI_9 et 29

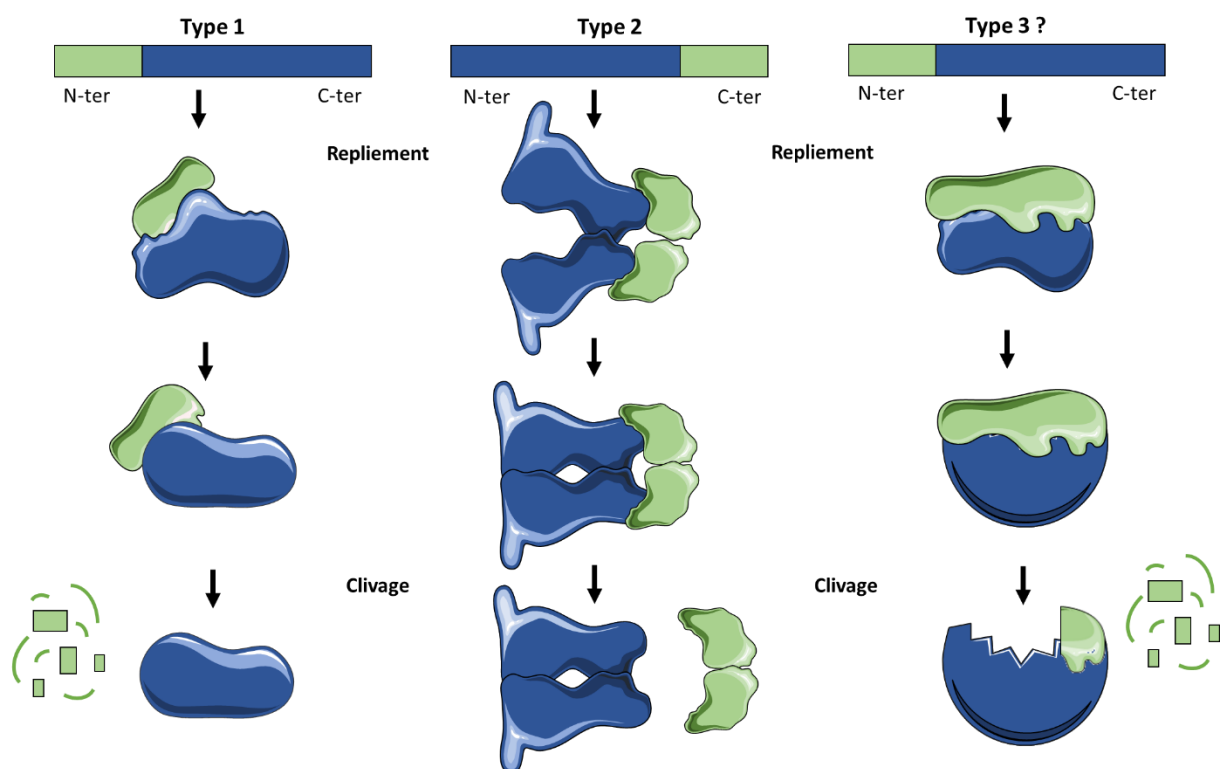
L'évolution de la forme de Lugdulyisine présente dans les surnageants de culture a été visualisée par des prélèvements réalisés à différents intervalles de temps. Le témoin positif est la forme mature et active de la Lugdulyisine. Chaque puits a reçu un volume de surnageant (évaluée par dosage Bradford) équivalent, soit 200 μ L. Ainsi, les variations des bandes correspondent directement à une variation des quantités de Prolugdulyisine dans le milieu de culture.

Nous avons réalisé, en parallèle, des cinétiques de maturation sur 48 h des Prolugdulyssines mutées Gly299Ser et Ser412Phe, afin d'observer le comportement de ces enzymes en condition de culture (Figure 26). Pour cela, nous avons prélevés, à différents temps, des échantillons de chaque milieu de culture pour en analyser le contenu par « Western Blot ». Ces cinétiques de maturation des Prolugdulyssines mutées démontrent la fragilité et l'instabilité de ces enzymes. La dégradation est particulièrement visible pour la Prolugdulyssine de la souche VISLISI_29, qui ne semble pas se maturer et disparaît presque complètement après 48 heures de culture. La souche VISLISI_9, produit une enzyme qui semble active (non détectable avec le test azocaséine) et des bandes de dégradation apparaissent dès la 14^{ème} heure de production. Pour finir, les deux formes ne s'accumulent pas au cours du temps contrairement à l'enzyme sauvage (Figure 29). Ces deux mutations naturelles et la perte de stabilité associée nous ont ainsi permis de révéler l'importance du domaine structurant du propeptide.

Ainsi, le propeptide de la Prolugdulyssine semble agir comme une chaperonne intramoléculaire, comme cela fut décrit pour d'autres propeptides. Dans ce cas à part, le domaine reste solidement attaché au domaine catalytique. Le concept de chaperonne intramoléculaire (IMC) fut établi dès les années 1990²²⁵⁻²²⁷. Il provient de l'observation que certaines peptidases (la Subtilisine E dans un premier temps²²⁸) sont incapables de devenir actives et structurées si elles sont produites sans propeptide. Cette notion d'IMC diffère des chaperonnes moléculaires par le fait qu'elles sont directement codées dans le gène de la protéine dans le domaine appelé propeptide. Jusqu'à présent le processus inclus une dégradation complète de ce prodomaine qui, bien qu'inutile pour l'activité, est essentiel pour le repliement de l'enzyme²²⁹. Dans notre cas, il nous fut impossible de produire une Lugdulyssine recombinante (Lugdulyssine-GST) avec uniquement la séquence du gène *slp1* codant le domaine catalytique. Les différentes tentatives ont abouti à des rendements de production très faible et à la production de formes dégradées de Lugdulyssine. Ces formes étaient stockées dans des corps d'inclusions, synonymes de la synthèse d'une protéine mal repliée. Ce type de résultat nous conforte encore un peu plus dans le rôle essentiel du propeptide de la Lugdulyssine.

Actuellement, les propeptides qualifiés d'IMCs sont classés en deux catégories. Les IMCs de type 1 sont considérés comme des éléments essentiels au repliement de la structure

tertiaire de l'enzyme. Par ailleurs, des expériences ont démontré que la co-expression du domaine catalytique et du propeptide de la Subtilysine E permettait de produire une enzyme active et correctement repliée²²⁵. D'autres mécanismes, comme celui de l' α -lytic peptidase ont été étudiés en détail²²⁹. La quasi-totalité des propeptides de type 1 sont situés à l'extrémité N-terminale des protéines. Les propeptides de type 2 n'ont qu'un rôle modéré dans le repliement des protéines associées. A la place, ils jouent un rôle essentiel dans l'assemblage de structures quaternaires permettant d'aboutir à des complexes protéiques²²⁹. Le propeptide de la Prolugdulyisine partage donc de nombreuses propriétés avec la première catégorie d'IMC. Sa localisation à l'extrémité N-terminale, sa taille, ainsi que l'impossibilité de synthétiser une Lugdulysine active en son absence, font du propeptide de la Prolugdulyisine un excellent candidat pour être une IMC de type 1. Cependant, les structures de la Lugdulysine et de la Prolugdulyisine ont révélé l'existence d'un troisième mécanisme, et potentiellement d'une IMC de type 3. Les deux grands types d'IMCs ainsi que le troisième variant, mis en évidence au cours de ces travaux, sont schématisés dans la [Figure 27](#).



[Figure 27](#): Les différents types de propeptides agissant comme chaperonnes intramoléculeaires

Les propeptides et les protéines matures sont représentés en vert et bleues, respectivement. Le propeptide de type 1 assiste au repliement de la structure tertiaire de la protéine associée. Une fois le repliement effectué, ce propeptide est complètement éliminé et dégradé. Les propeptides de type 2 assistent à la structuration de complexes protéiques, une dimérisation dans cet exemple. Dans le nouveau type d'IMC que nous proposons, le propeptide n'est pas complètement éliminé et reste solidement attaché au domaine catalytique de l'enzyme. Schéma inspiré et adapté de Chen et Inouye²²⁹.

Effectivement, la structure de la Lugdulysine mature révèle la présence de la partie N-terminale du propeptide comme expliqué dans l'[Article 2](#). Ces 22 résidus forment une région hautement structurée organisée autour d'un feuillet β avec l'extrémité C-terminale du domaine catalytique. Avec la résolution de la structure de la Prolugdulyisine, nous avons pu scinder ce propeptide en deux domaines fondamentaux : un domaine structurant et un domaine inhibiteur ([Figure 28](#)). Le propeptide structurant agit donc comme une chaperonne intramoléculaire mais de manière permanente. Son interaction est établie et nécessaire dès le repliement de la Prolugdulyisine et reste en place jusqu'au stade final de l'enzyme active et mature. De plus, nous avons pu constater lors des purifications que le propeptide structurant résiste à une précipitation au sulfate d'ammonium. Cela confirme notamment une interaction et une organisation structurelle très forte. Cette relation, qui s'inscrit sur le long terme, ne correspond pas aux schémas établis dans la littérature. Ainsi, de tels résultats suggèrent l'existence d'un troisième type de chaperonne intramoléculaires et ouvrent la voie à des mécanismes structuraux encore inexplorés. En effet, une telle découverte laisse supposer que d'autres mécanismes intramoléculaires peuvent exister et encourage à caractériser d'avantage de peptidases.

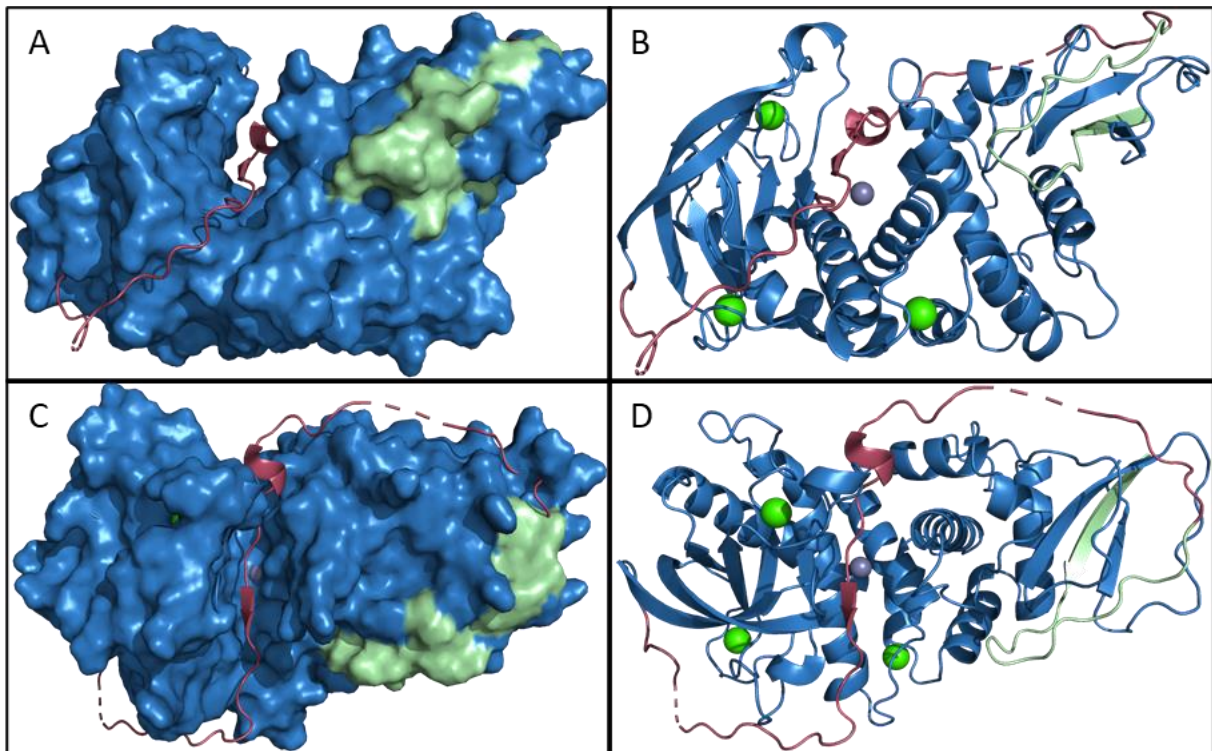


Figure 28 : Représentation de surface et cartoon de la Prolugdulsine et importance du propeptide

Le domaine catalytique et les domaines inhibiteur et structurant du propeptide sont colorés en bleu, rouge et vert, respectivement. Le domaine structurant est si fortement imbriqué dans le domaine catalytique qu'il est majoritairement enfui à l'intérieur (B et D). Le domaine inhibiteur du propeptide traverse la poche catalytique de la Lugdulsine. Deux régions sont représentées en pointillées, car trop flexibles pour apparaitre dans la carte de densité électronique.

3) Hypothèse quant à la maturation de la Prolugdulsine

Nos travaux ont donc révélé l'existence d'un troisième type de chaperonne intramoléculaire avec lequel l'interaction est permanente. L'aspect du propeptide complet donne l'impression qu'il s'agit d'une chaîne solidement attachée à la partie C-terminale de l'enzyme avant de parcourir l'ensemble de l'enzyme jusqu'à son domaine N-terminal. Grâce à ses interactions avec les deux extrémités du domaine catalytique, la chaîne polypeptidique du propeptide est tendue et s'intègre parfaitement dans la poche catalytique (Figure 28). De par la petite taille de son propeptide et l'absence de motif impliqués dans l'auto-maturation, la Prolugdulsine semble à première vue susceptible à une maturation exogène. Cette hypothèse est notamment soutenue par une manipulation simple de digestion de la Prolugdulsine (Glu242Gln, Tyr315Phe) par la Lugdulsine. En effet, la mise en contact de ces

deux enzymes permet d'observer en SDS-PAGE une dégradation progressive de la Prolugdulyisine mutée. Cette digestion se fait au profit de l'apparition simultanée d'une forme de Lugdulysine mature mais inactive puisque les résidus catalytiques ont été remplacés (Figure 29). Malgré sa grande spécificité, la Lugdulysine semble donc capable de maturer une Prolugdulyisine voisine et contribue d'elle-même à sa maturation. Cette hypothèse semble concorder également avec le constat réalisé lors de l'étude de la cinétique de maturation de la Lugdulysine chez la souche VISLISI_22. En effet, nous avons constaté une maturation progressive de la Prolugdulyisine dans le temps. La forme immature s'accumule jusqu'à 14 heures d'incubation avant d'être rapidement transformée dans le surnageant en forme mature et active.

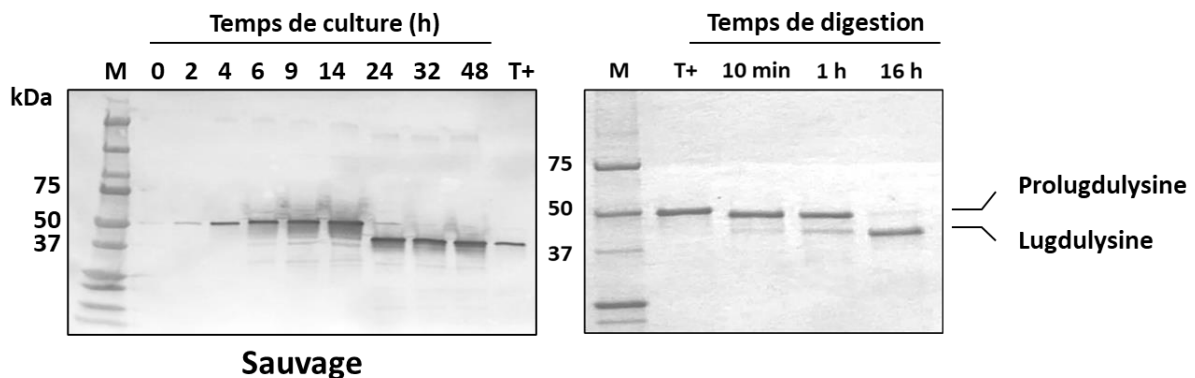


Figure 29 : Maturation de la Lugdulysine sauvage et de la Prolugdulyisine mutée par la Lugdulysine.

A) Cinétique de maturation sur 48 h de la Lugdulysine sauvage. B) La Prolugdulyisine mutée fut mise en contact pendant 18 heures avec la Lugdulysine active. Au bout de 10 min, une bande de faible intensité apparaît et correspond à une forme Lugdulysin mature. Cette bande augmente d'intensité après 1 heure puis devient majoritaire suite à une dégradation sur la nuit.

Le passage d'une enzyme immature à mature pourrait donc correspondre à un point critique à partir duquel la concentration en Lugdulysine est suffisante pour déclencher une maturation massive de l'enzyme. Par ailleurs, nous constatons qu'à partir de ce point, la Prolugdulyisine ne s'accumule plus et semble donc être maturée très rapidement. L'hypothèse de l'expression tardive d'une autre peptidase par la souche *Staphylococcus lugdunensis* VISLISI_22 permettant l'activation de la Prolugdulyisine n'est pas non plus exclue. En effet, le génome de cette souche code également pour un certain nombre de peptidases pouvant

potentiellement remplir ce rôle. Cependant, l'action de la Lugdulysine observée en SDS-PAGE traduit très clairement une capacité de l'enzyme à maturer les enzymes voisines.

L'activation de la Prolugdulyisine nécessite donc une étape d'élimination du domaine inhibiteur du propeptide. Compte tenu de la disposition de ce domaine et de l'attachement du propeptide structurant, un minimum de deux coupures protéolytiques sont requises pour déstabiliser le propeptide inhibiteur. En plus de son motif d'interaction avec l'ion zinc (centré sur le résidu Asp), le propeptide inhibiteur contient deux régions relativement désordonnées et tournées vers l'extérieur. Ces deux régions, de respectivement cinq (⁵⁷Gln-Thr-Val-Lys-Gln⁶¹) et six (⁸⁹Glu-Asn-Arg-Ser-Gln-Asn⁹⁴) résidus d'acides aminés, pourraient correspondre à des régions appâts (connues sous le terme de « bait regions »). En effet, le site de maturation, initialement observé lors de la caractérisation de l'enzyme²⁶, est localisée dans la région appât de six résidus d'acides aminés (⁸⁹Glu-Asn-Arg/Ser-Gln-Asn⁹⁴). Cette hypothèse est également renforcée par l'identification, par spectrométrie de masse, de produits de digestion issus de la maturation de la Prolugdulyisine mutée (Figure 30).

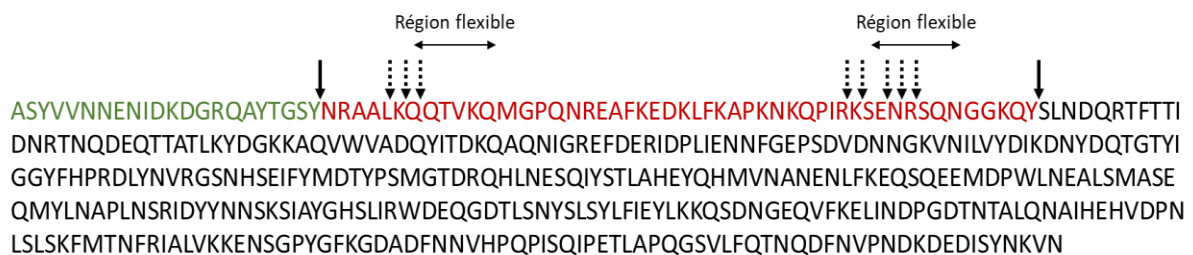


Figure 30 : Sites de clivages à l'intérieur du propeptide de la Prolugdulyisine.

Les résidus d'acides aminés correspondant au propeptide structurant, au propeptide inhibiteur et au domaine catalytique sont respectivement représentés en vert, rouge et noir. La localisation des deux régions flexibles est représentée par des flèches double. Les sites de maturation définitifs tels qu'identifiés dans la structure de la Lugdulysine sont représentés par des flèches pleines. Les différentes flèches pointillées représentent tous les sites de clivages observés par spectrométrie de masse.

Ces types de séquences exposées semblent être des cibles idéales pour les peptidases exogènes. Des régions qualifiées « d'appâts », ont déjà été mises en évidence pour les métallopeptidases de la matrice MMP-1 et MMP-2²³⁰⁻²³². Les structures et analyses biochimiques de ces études démontrent que ces motifs sont essentiels pour une première phase d'activation par la Furine²³¹. Celle-ci permet l'obtention d'une forme intermédiaire de

proMMP-1 qui est ensuite activée par une seconde coupure exercée par la Furine. Les structures des proMMP humaines restent cependant relativement éloignées de celle de la Prolugdulyisine. Nous avons donc schématisé, à partir de l'ensemble des observations précédentes, un mécanisme potentiel de maturation de la Lugdulyisine (Figure 31).

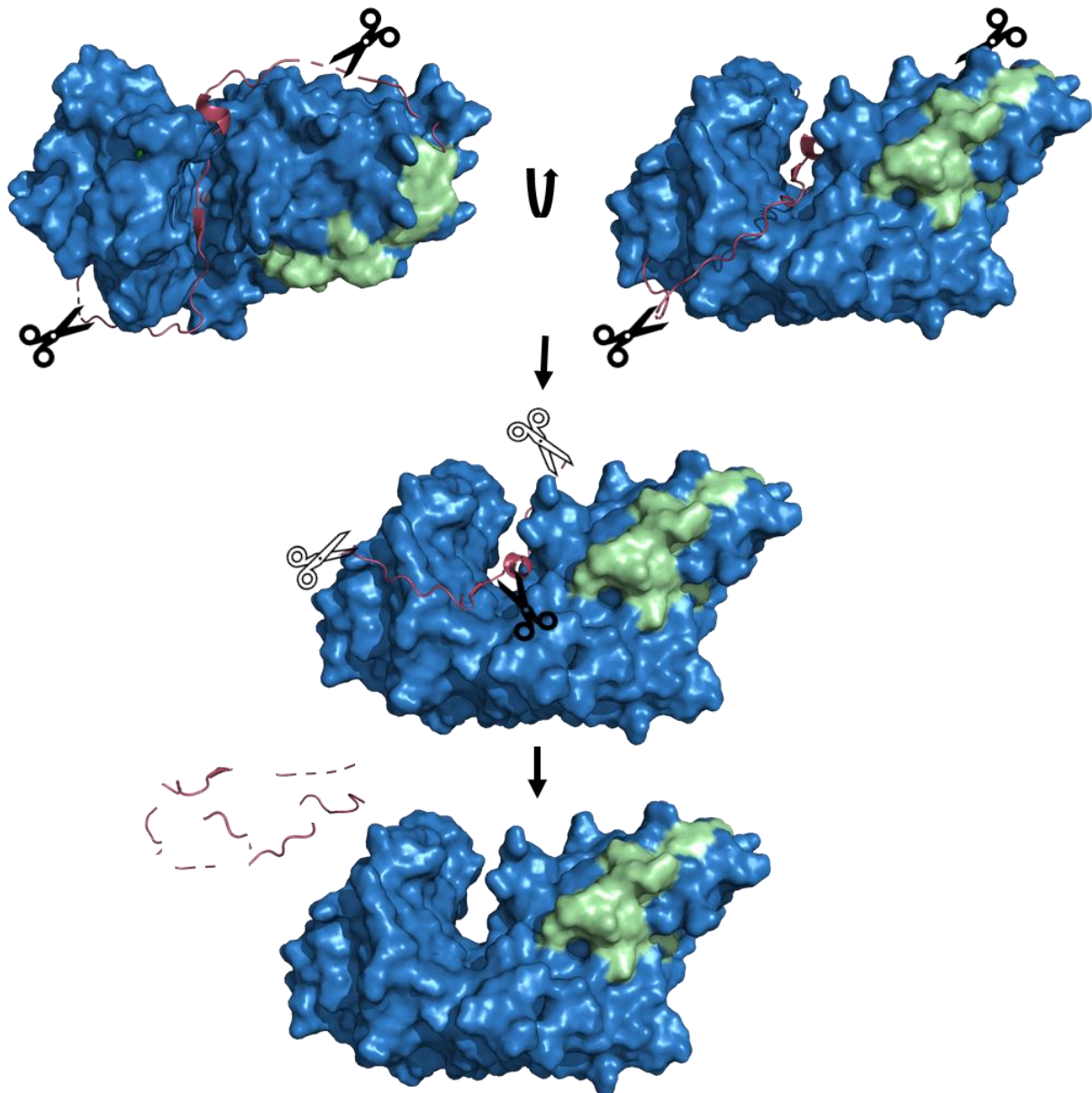


Figure 31 : Mécanisme potentiel de maturation de la Prolugdulyisine

Le domaine catalytique et les domaines inhibiteur et structurant du propeptide sont colorés en bleu, rouge et vert, respectivement. La première étape d'activation de la Prolugdulyisine s'initie probablement par différents clivages, représentés par des ciseaux noirs, au niveau des deux régions appâts. Les ciseaux blancs représentent les coupures effectuées à l'étape précédente.

Le mécanisme décrit ci-dessus représente donc les coupures initiales réalisées par la Lugdulysine notamment. Comme le démontre les analyses en spectrométrie de masse, différents liaisons peuvent être ciblées pour ces premières coupures (Figure 30). Une fois réalisées, les extrémités sont rognées jusqu'au stade de maturation final. Il est donc fortement probable que la première étape d'hydrolyse permet de déstabiliser le propeptide inhibiteur tout en permettant à une molécule d'eau de s'infiltrer et prendre la place du résidu Asp. Cependant, la présence d'interactions nombreuses entre le domaine inhibiteur et la poche catalytique laisse penser que la double hydrolyse aux extrémités du propeptide pourrait ne pas être suffisante pour déstabiliser l'ensemble de la structure. Une autre peptidase extérieure, ou la digestion progressive des extrémités relâchées du propeptide inhibiteur pourraient être des phénomènes nécessaires à la maturation complète de la Prolugdulysine.

4) Conclusions et perspectives

Le gène *slp1* code une pré-Prolugdulysine composée d'un peptide signal, d'un propeptide et d'un domaine catalytique porteur de l'activité enzymatique. Vu la composition du peptide signal, la pré-proenzyme semble être prise en charge par le système de sécrétion Sec. Une fois reconnue par le transporteur, le peptide signal est clivé par la Signal Peptidase I par l'intermédiaire du motif « Ala-X-Ala ».

Après cette étape, la Prolugdulysine est sécrétée dans le milieu extérieur et semble, à priori, être activée par une peptidase exogène. De manière intéressante, nous avons démontré que cette maturation peut être assurée par une molécule de Lugdulysine adjacente. A partir des différents résultats accumulés, nous avons pu déterminer un mécanisme potentiel d'activation. Ainsi, nous pensons que la Lugdulysine subit deux étapes de clivage au niveau de régions peu structurées, nommées régions appâts, et localisées dans le domaine inhibiteur du propeptide. Ces deux coupures pourraient ainsi déstabiliser la partie du propeptide localisée dans la poche catalytique et ainsi, permettre à une molécule d'eau d'entrer en contact avec l'atome de zinc. Une fois activée, la Lugdulysine pourrait directement cliver, puis éliminer, le propeptide inhibiteur restant.

Nous avons également, avec l'appui de manipulations diverses, démontré que le domaine structurant de la Lugdulysine agit comme une chaperonne intramoléculaire

particulière, introduisant potentiellement une nouvelle classe de chaperonnes. A la différence des IMC de type I et II, dont la présence est transitoire, 22 résidus d'acides aminés du propeptide de la Lugdulysine restent solidement attachés tout au long de la vie de l'enzyme. Les interactions résultantes sont essentielles au bon repliement de l'enzyme puisque les Lugdulysines Gly299Ser et Ser412Phe sont plus susceptibles à une dégradation exogène.

Relations entre la structure et l'activité de la Lugdulysine

1) Une brève histoire de structure

L'aventure de la caractérisation structurale de la Lugdulysine (et de la Prolugdulysine mutée) a débuté par la création d'un modèle à l'aide d'outils de prédictions informatiques. Le serveur (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), nommé I-TASSER (Protein Structure and Function Predictions), a permis de développer un modèle tri-dimensionnel à partir de la séquence primaire d'une protéine. Parmi les nombreux serveurs de prédictions structurales (comme « Phyre² - Protein Fold Recognition Server », SWISS MODEL, HHpred, par exemples), I-TASSER présente l'avantage d'être gratuit et facilement accessible. De plus, ce serveur fut récompensé à de très nombreuses reprises lors de concours internationaux nommés CASP (pour « Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction »). Après soumission des séquences de la Lugdulysine ou de la Prolugdulysine, un certain nombre d'outils informatiques se mettent en œuvre, afin de comparer la séquence soumise à des séquences et structures existantes. Après quelques jours, cinq modèles, classés selon un score de prédiction, sont alors envoyés et prêts à être analysés sous un format .pdb. En plus de ces prédictions structurales, le serveur fournit un nombre conséquent de renseignements tels que des structures de la Protein DataBank similaires ou les potentiels sites de coordination de ligands (ion zinc dans notre cas).

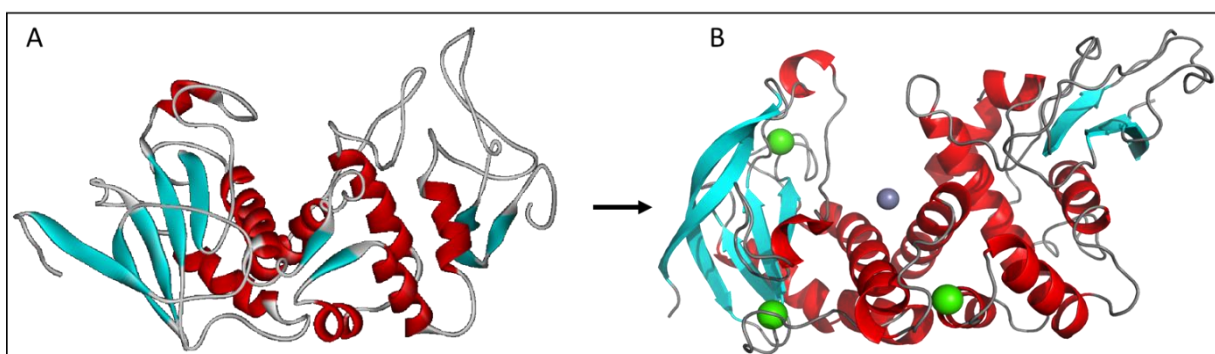


Figure 32 : Comparaison entre la structure prédite et résolue de la Lugdulysine

Les deux modèles de la Lugdulysine sont représentés selon une représentation « Cartoon » avec les structures secondaires colorés en rouge (Hélices- α) ou en cyan (Feuillets β). A) Modèle de Lugdulysine avec le meilleur C-Score selon le serveur I-TASSER. B) Structure de la Lugdulysine résolue par cristallographie aux rayons X (PDB : 7BB8).

Avec le recul, la structure décrite et modélisée par le serveur I-TASSER est plutôt convaincante. Bien que les régions N et C-terminales ne soient pas forcément en accord avec la structure tridimensionnelle finale, les structures secondaires ont été respectées. Nous pouvons également observer la ressemblance entre les deux sites actifs. En effet, les deux hélices- α perpendiculaires portant les résidus catalytiques et de coordination du zinc sont très proches de la réalité. Dans les détails certains de ces cinq résidus sont mal orientés, notamment le résidu Glu242, mais l'aspect général est plutôt bien respecté. Finalement, même la poche catalytique profonde et étroite apparaît déjà dans le modèle informatique.

Ces prédictions informatiques sont donc des outils potentiellement précieux pour établir une structure de base. Evidemment, les informations doivent être précisées, surtout dans le cas d'une enzyme telle que la Lugdulysine qui conserve une partie de son propeptide. Ce type d'interaction propeptide-domaine catalytique n'est pas encore suffisamment bien décrite et représentée pour établir des modèles parfaitement cohérents. Par ailleurs, le modèle I-TASSER, malgré ses avantages, n'était pas suffisamment juste pour servir de référence au remplacement moléculaire en tant que première étape de la résolution de la structure de la Lugdulysine. Néanmoins, les similarités observées avec des structures comme la Thermolysine ont permis d'orienter les manipulations et de déterminer des enzymes et donc des travaux de références à mettre en place. Pour finir, ce modèle de Lugdulysine par I-TASSER fut aussi présenté lors d'un congrès (Société de Microbiologie de Strasbourg, 2018).

[2\) A la recherche d'un substrat pour la Lugdulysine](#)

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre le fonctionnement de la Lugdulysine. L'objectif de cette série de manipulations était de déterminer un substrat privilégié par la Lugdulysine, voire une cible physiologique potentielle. Comme cela a été, en partie, évoqué dans l'[Article 2](#), diverses réactions de digestion ont été réalisées.

Une première série de digestions de protéines a été réalisée dès le début de cette thèse. Il s'agissait simplement de mettre en contact des protéines avec la Lugdulysine purifiée et observer si des bandes de tailles différentes apparaissent en SDS-PAGE ([Figure 33](#)).

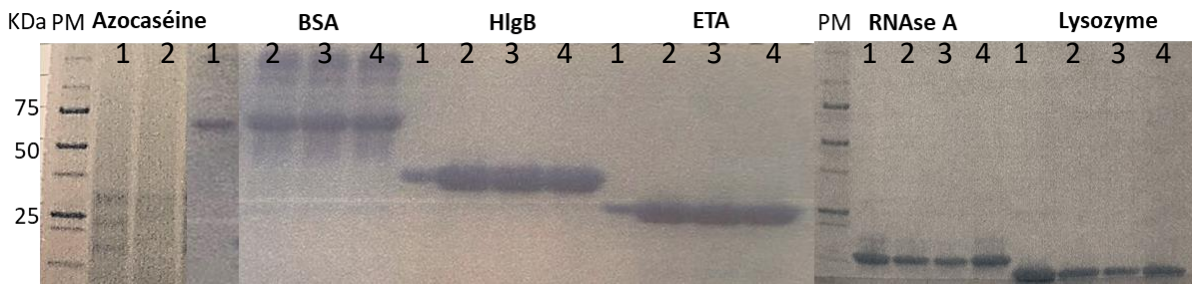


Figure 33 : Assemblage des SDS-PAGE des expériences de digestion de protéines par la Lugdulysine

Six protéines différentes ont été mises en contact avec la Lugdulysine. Les poids moléculaires sont identiques et adaptés pour les trois SDS-PAGE. Les puits s'organisent ainsi (azocaséine) : 1, témoin non digéré et 2, azocaséine et Lugdulysine pendant 17 h. Pour la BSA, le composant B de l'hémolyse γ (HlgB) et la toxine exfoliative A (ETA), les puits s'organisent : 1) témoin non digéré, 2) digestion d'1 h, 3) 4 h, 4) 17 h. Pour la RNase A et le lysozyme finalement, le premier puit correspond à la protéine seule, le second contient la protéine mélangée à 5 mM de DTT (Dithiothréitol), le troisième le mélange protéine, 5 mM DTT, et Lugdulysine et le quatrième la protéine et la Lugdulysine seule.

A la vue de ces résultats, il apparaît clairement que la Lugdulysine éprouve de grandes difficultés pour digérer des protéines structurées. En effet, seule l'azocaséine est dégradée en condition native (puit n°2). Nous pouvons observer une baisse d'intensité des bandes correspondant aux caséines du lait, mais pas de produits de digestion suffisamment importants pour être visualisables. En revanche, nous ne constatons ni produits de digestion, ni atténuation des bandes correspondant à la protéine native dans tous les autres cas. Pour aller plus loin, des tentatives de digestion en conditions dénaturantes ont été réalisées. La RNase A et le Lysozyme ont reçu un traitement avec 5 mM DTT, afin de réduire leurs ponts disulfure. La Lugdulysine n'est pas affectée par cette molécule puisqu'elle n'en contient aucun. Même dans ces conditions dénaturantes, seule la RNase A a pu être légèrement digérée. La Lugdulysine semble donc développer une grande spécificité pour un certain type de substrat plus étroit qu'une protéine structurée. Pour compléter ces résultats, une série de peptides (mélittine, chaîne β de l'insuline), déjà utilisés dans l'article de caractérisation de l'Hycolysine, ainsi que d'autres peptides antimicrobiens tels le LL37 (ou hCAP-18), ou les défensines humaines hBD2, hNP1 et hNP2²³³, ont été digérés¹⁶². Les résultats de ces

expérimentations sont présentés dans l'Article 2, même si brièvement, la Lugdulysine fut capable de digérer le peptide LL37, mais pas les autres défensines.

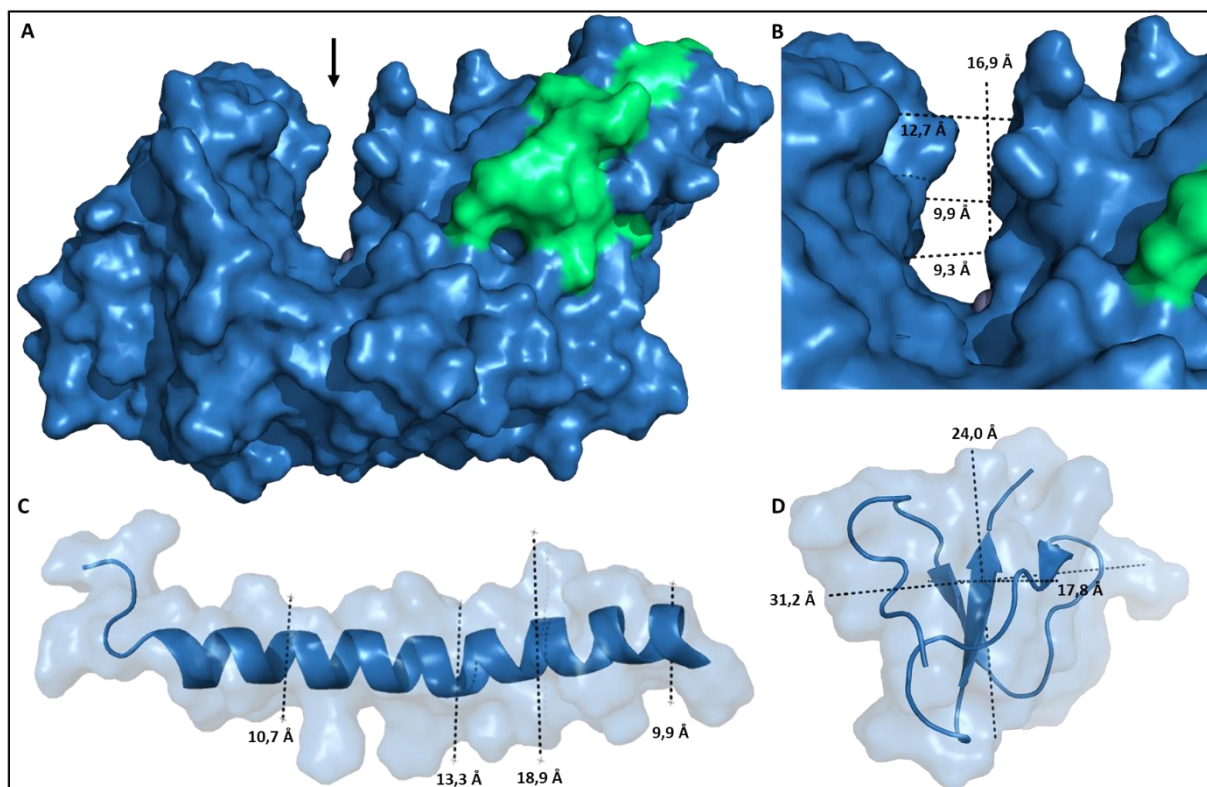


Figure 34 : Taille de la poche catalytique de la Lugdulysine et de certains substrats

A) Représentation de surface de la Lugdulysine (PDB : 7BB8). La poche catalytique est pointée par une flèche noire et apparaît comme une entaille profonde et étroite dans la structure. B) Il s'agit d'un agrandissement de la poche catalytique et de ses dimensions. C et D) Représentations du peptide LL-37 (PDB : 2K6O) et d'hBD-2 (PDB : 1E4Q).

Au regard de l'étroitesse de sa poche catalytique, la spécificité de substrat de la Lugdulysine est d'abord restreinte par un phénomène d'encombrement stérique (Figure 34). Ainsi, seuls les substrats suffisamment petits (LL-37, insuline β , mélattine) ou peu structurés (RNase A déstructurée par le DTT) pourront venir se loger dans la poche catalytique pour y être clivés. Même dans le cas de l'azocaséine, la digestion semble se concentrer sur des petits peptides courts puisque ces produits de digestion sont détectables lors de tests colorimétriques. En effet, le principe de cette méthode de détection d'activité protéolytique est de mesurer la libération de fragments contenant des groupements « azo » colorés. Pour se faire, une étape de précipitation acide permet d'éliminer les protéines et les grands fragments digérés pour ne laisser en solution que les petits peptides colorés.

L'activité de la Lugdulysine semble donc cibler des peptides voire certaines protéines bien spécifiques pouvant s'accommoder avec les dimensions restreintes de sa poche catalytique. Il faut cependant remarquer que la poche catalytique d'une enzyme n'est pas aussi rigide que les images de la structure ne le suggèrent. Le concept d'adaptation de la poche catalytique fut pensée dès les années 1958²³⁴. Il ne s'agit donc plus d'appréhender le modèle enzyme-substrat comme un élément rigide (mécanisme clef-serrure ([Figure 12](#))) mais comme un ensemble dynamique. En effet, la poche catalytique de certaines enzymes peut s'ouvrir et se moduler pour accepter l'entrée d'un substrat²³⁵. Il n'est donc pas exclu que le phénomène influence également l'acceptation d'un substrat plutôt qu'un autre dans le cas de la Lugdulysine. Cela expliquerait notamment pourquoi malgré une largeur d'environ 10 Å, des substrats comme le LL-37, d'un diamètre compris entre 8 et 15 Å, puissent être digérés. Cependant, malgré ce mécanisme, des éléments courts mais structurés, comme hBD-2, ne sont tout de même pas dégradés par l'enzyme ([Figure 34](#)).

Nous avons découvert également que les sites de clivages privilégiés par la Lugdulysine sur les peptides digérés étaient souvent précédés par un acide aminé hydrophobe. En effet, ces résidus sont généralement localisés 2 ou 3 résidus en amont des sites de clivage privilégiés. En revanche, une fois digérés, les peptides de petites tailles semblent être hydrolysés sans restriction particulière. Ce phénomène s'explique probablement par la nécessité, dans un premier temps, d'une reconnaissance à partir d'un sous site spécifique, afin d'accueillir plus rapidement et avec plus d'affinité le substrat. Une fois suffisamment court, ce substrat hydrolysé peut s'accommoder sans problème à la poche. Cette observation est confirmée par les expériences de cinétique et de détermination de la constante globale k_{cat}/K_m ([Article 2](#)). Nous avons en effet démontré que pour un même peptide, la présence d'acides aminés hydrophobes augmente fortement l'efficacité de l'enzyme pour le substrat. D'un point de vue structural, ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence de sous sites plus ou moins marqués à l'intérieur de la poche catalytique de l'enzyme. Bien que dans sa globalité, la poche ne présente pas d'invaginations particulières, il existe deux endroits potentiellement impliqués dans la reconnaissance du substrat ([Figure 35](#)).

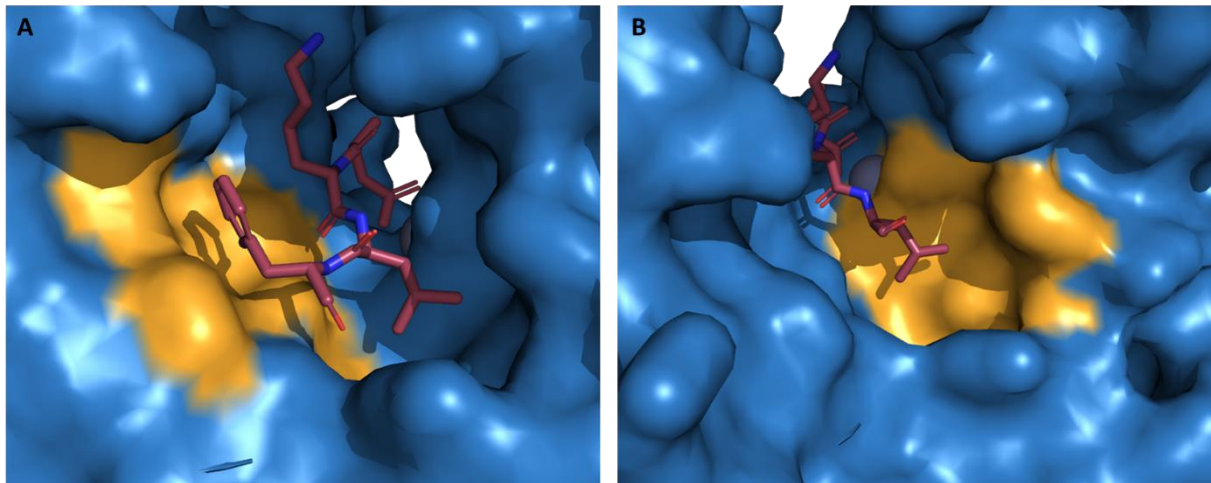


Figure 35 : Représentation de deux sous sites potentiels de la Lugdulysine

Le domaine catalytique de la Prolugdulysine (PDB : 7BB9) est représenté en bleu. Les résidus d'acides aminés du domaine inhibiteur du propeptide sont représentés en rouge. La surface des différents sous sites potentiels sont représentés en orange. A) Le résidu 76Phe du propeptide est orienté vers l'intérieur d'une petite cavité formée par quatre résidus du domaine catalytique, 110Ile, 197Tyr, et 199His. B) Le second site potentiel est localisé à proximité et en face du premier. Le résidu 75Leu est orienté également vers cette cavité profonde formée par une dizaine de résidus compris entre les positions 244 et 269.

Ainsi, le premier sous site (Figure 35, A), pourrait correspondre à l'élément de reconnaissance des résidus hydrophobes. En effet, le résidu 76Phe du propeptide s'oriente et s'imbrique particulièrement bien à ce patch. Par ailleurs, il est possible de constater que les trois résidus impliqués sont hautement conservés chez les peptidases M30. De la même manière, la seconde poche est profonde et pourrait permettre également l'entrée de résidus avec une chaîne latérale longue. Le reste de la poche quant à elle, ne présente pas de structure ou de relief particulier.

3) Quel substrat physiologique pour la Lugdulysine

Comme évoqué précédemment, il est difficile d'envisager un substrat pour la Lugdulysine. Cependant, il est fort vraisemblable que l'enzyme ne s'intéresse pas uniquement à la digestion de peptides dans le but de fournir des acides aminés à *Staphylococcus lugdunensis*. Malheureusement, il est complexe de trouver le ou les substrats physiologiques qui seront ciblés préférentiellement au cours de l'infection. Nous avons déjà démontré que la Lugdulysine pouvait avoir un impact direct sur le système immunitaire *in vitro* (Article 2). En

effet, nous avons pu observer que la Lugdulysine est capable d'hydrolyser le peptide LL-37 pour protéger la bactérie de ses effets bactéricides. De la même façon, la Lugdulysine peut ainsi protéger *S. lugdunensis* contre les effets secondaires indésirables, c'est-à-dire la stimulation de la production de LL-37, par la Lugdunine¹⁵⁶. Cependant, le peptide LL-37 nécessite des conditions expérimentales particulières. Son action bactéricide est, par exemple, complètement inhibée par la présence de sels en solution. Ainsi, le peptide LL-37 est inactif lorsqu'il est dilué dans du PBS et non de l'eau. Les conditions utilisées dans nos manipulations sont donc éloignées des conditions rencontrées *in vivo*, même si cela ne semble pas remettre réellement en question l'activité de la Lugdulysine puisque cette dernière résiste à des conditions variées.

Dans l'optique de trouver le rôle de la Lugdulysine au cours du processus infectieux, nous avons étudié son impact sur le biofilm de *S. lugdunensis*. Certaines souches VISLISI, notamment impliquées dans la survenue d'infections ostéoarticulaires, ont déjà fait l'objet d'une évaluation de leur capacité à produire un biofilm¹³⁸. Cette étude, menée par notre laboratoire, démontre que parmi les 20 souches VISLISI, toutes sont considérées comme des productrices rapides de biofilm. En effet, en seulement 6 h, 90% des souches testées ont produit un biofilm fort. Afin de compléter cette étude, nous avons donc réalisés deux types d'évaluation de l'activité de la Lugdulysine, une première avec une révélation au Crystal Violet et une seconde avec le BioFilm Ring Test (BRT, Biofilm Control®)(Figure 36).

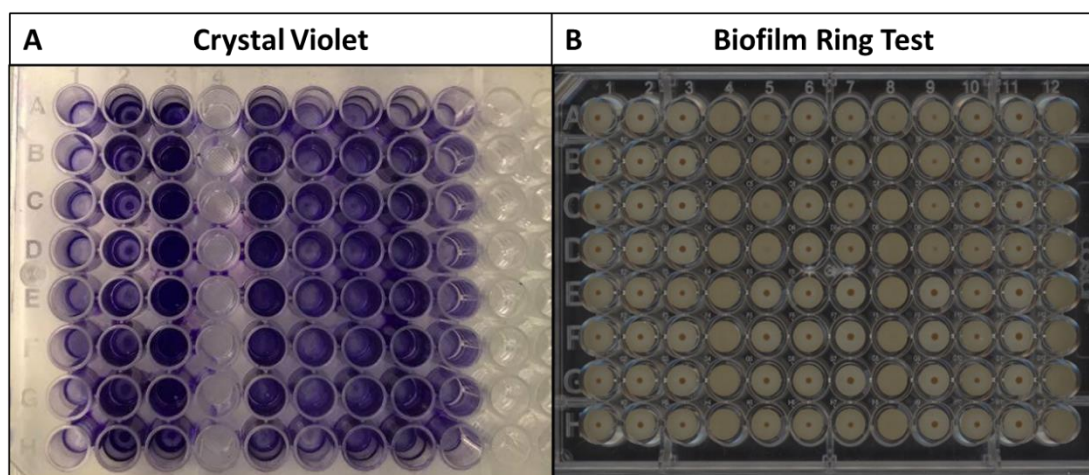


Figure 36 : Résultats de la croissance du biofilm selon deux techniques de révélation

A) Exemple de résultats obtenus après révélation au Crystal Violet. Les bactéries adhérentes sont alors colorées en violet permettant ainsi de visualiser et quantifier des biofilms formés.
 B) Cette seconde plaque correspond à la révélation par l'intermédiaire du Biofilm Ring Test (BioFilm Control®). Pour être réalisé, les bactéries sont mélangées à des billes magnétiques

avant la croissance du biofilm. Une fois l'incubation terminée, les billes sont magnétisées à l'aide d'un aimant. Ainsi, plus la production de biofilm est importante, plus les billes seront retenues (Puits n°4). A l'inverse, en l'absence de biofilm, les billes sont attirées dans le fond du puits (Puits n°7).

Dans un premier temps, nous avons évalué et quantifié la production de biofilm dans différentes conditions chez les souches *S. lugdunensis* VISLISI_22, 23, 34 et 49 (Sauvages), VISLISI_7, 8, 9, 24 et 27 (Gly299Ser), VISLISI_28 et 29 (Ser412Phe). Nous avons pu observer que la production de biofilm à 24h est indépendante du milieu utilisé (BHI ou TSB complémenté avec 1 % de glucose). Seules trois souches testées produisent un biofilm modéré (VISLISI_9, 28 et 29). Les autres souches synthétisent une grande quantité de biofilm (Figure 37).

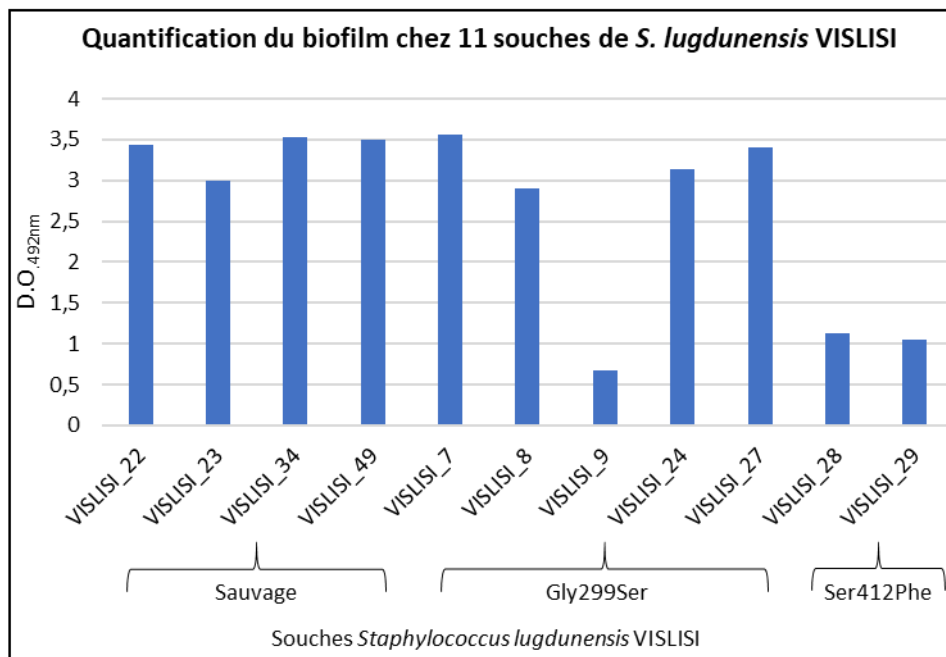


Figure 37 : Quantification de la production de biofilm par les souches VISLISI par Crystal Violet
 Les différentes souches testées représentent un panel des trois formes majoritairement présentes de la Lugdulysine ; Sauvage, Gly299Ser et Ser412Phe. Une souche est considérée comme productrice moyenne à partir d'une D.O._{492nm} comprise entre 0,65 et 1,29. Au-delà de cette valeur, les souches sont considérées comme productrices fortes.

Pour compléter cette expérience préliminaire, nous avons réalisé des essais de détachement du biofilm à l'aide de trois composés, la protéinase K, la Lugdulysine et le sodium

métapériodate¹³⁷. Après culture des bactéries selon les mêmes conditions, les bactéries non adhérentes sont éliminées puis un traitement avec ces molécules est réalisé pendant 2 h. Cependant, les résultats n'ont pas démontré d'action particulière sur les bactéries adhérentes. Contrairement à la Lugdulysine et au sodium métapériodate, seule la protéinase K a permis de diminuer légèrement la D.O._{492nm} (Résultats non montrés). Cette manipulation, peu concluante en l'état, pourrait nécessiter une phase d'optimisation. Cependant, elle est limitée par la méthode de révélation elle-même. Le protocole de référence au Crystal Violet pour l'étude des biofilms permet d'évaluer principalement les cellules adhérentes plutôt que le biofilm. En effet, le protocole nécessite d'éliminer le contenu du puit avant la révélation. Nous éliminons ainsi la majorité du biofilm pour ne conserver que les cellules adhérentes. La Lugdulysine ne semble donc pas en mesure de détacher *Staphylococcus lugdunensis* après une longue période d'adhésion.

Suite à cette réflexion, et pour contourner les limites de la technique, nous nous sommes donc orientés vers un second protocole par l'intermédiaire du BioFilm Ring Test (BioFilm Control®). Après une première étape de vérification et de quantification du biofilm en conditions natives, nous avons testé en préventif (dès le début de la culture bactérienne) et en curatif (test après la formation des biofilms) les effets de la protéinase K, du sodium métapériodate et de la Lugdulysine.

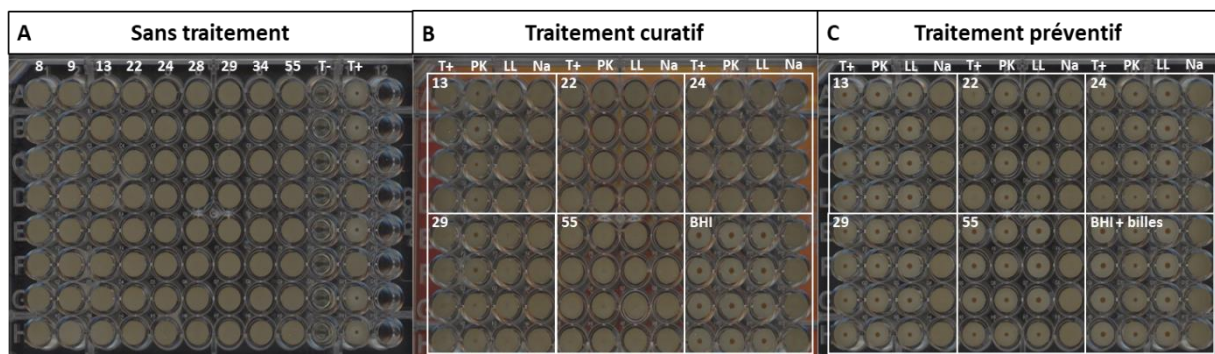


Figure 38 : Quantification du biofilm de *S. lugdunensis* avec le BioFilm Ring Test

Les plaques 96 puits regroupent des souches de *S. lugdunensis* de la collection VISLISI numérotées sur les puits correspondants. Dans le cadre des traitements, chaque souche a reçu, soit aucun traitement (T+), soit 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Protéinase K (PK), soit 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Lugdulysine (LL), soit 40 mM de Sodium métapériodate. Les témoins de ces expériences ne contiennent que du milieu BHI complétement en billes magnétiques. Nous pouvons constater que le métapériodate empêche l'agrégation des billes malgré l'absence de bactéries dans les puits. Nous ne pourrions donc pas conclure sur son activité. De la même façon, la Protéinase K semble également, à ces concentrations, interagir avec les billes magnétiques puisque les témoins BHI + billes ne sont pas à 20.

Selon le BioFilm Ring Test, les souches testées produisent donc toutes un biofilm fort en milieu BHI après une nuit d'incubation (Figure 38, A). En effet, l'indice de biofilm, (échelle de 0 à 20, où 0 correspond à une immobilisation complète des billes et 20 à une absence d'immobilisation), pour toutes ces souches est compris entre 0,3 et 0. L'addition d'un traitement curatif, c'est-à-dire après que le biofilm soit synthétisé pendant 4 h, ne semble pas avoir d'impact sur la structure du biofilm et donc la migration des billes magnétiques. Ainsi, ni la Protéinase K, ni la Lugdulysine ne parviennent à dégrader la structure du biofilm par hydrolyse des protéines (Figure 38, B). Cependant, un biais méthodologique pourrait remettre en question ces résultats. En effet, un problème est survenu lors de la révélation, modifiant ainsi la sensibilité de la détection (Les billes des témoins de la colonne A, par exemple, ne sont pas complètement visibles et ne correspondent pas à un biofilm fort). En revanche, les résultats sont encourageants avec l'utilisation d'un traitement préventif (Figure 38, C). Dans ce cas de figure, nous pouvons constater que l'addition de Lugdulysine permet d'amoindrir fortement le biofilm synthétisé. Ainsi, après 4 heures d'incubation, un biofilm avec un indice faible, égal à 0 (VISLISI_22), est réduit à un indice d'environ 8.24 avec la Lugdulysine. Cette peptidase peut donc inhiber la formation de biofilm lorsqu'elle est présente dès le début de sa mise en place. La Lugdulysine pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation, la synthèse ou la structure du Biofilm de *Staphylococcus lugdunensis*. Malheureusement, ce test préliminaire ne permet pas, à lui-seul, de déterminer à quel niveau intervient la Lugdulysine.

Pour finir ce volet de caractérisation fonctionnelle, nous nous sommes intéressés à la stabilité de la Lugdulysine en fonction du temps et de la température. En effet, nous avons découvert que l'activité optimale de l'enzyme était atteinte à une température de 55°C. A 37°C, seulement 60 % de cette activité maximale subsiste. Par conséquent, nous avons comparés l'activité résiduelle de la Lugdulysine après incubation à 37°C ou 55°C (Figure 39).

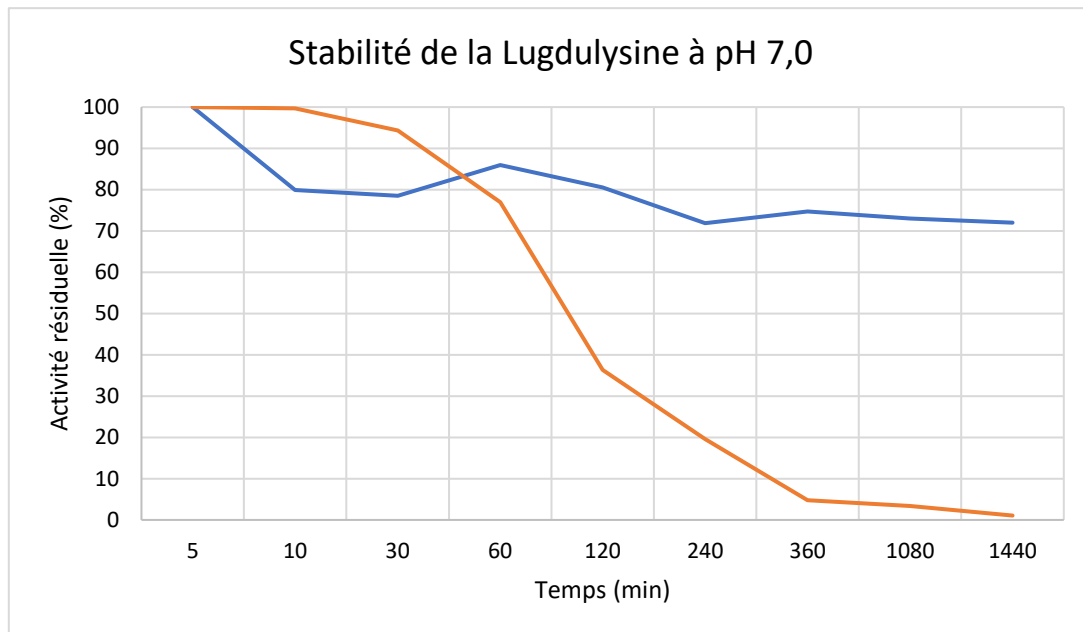


Figure 39 : Stabilité de la Lugdulysine en fonction du temps et de la température

La Lugdulysine est incubée entre 5 min et 24 h à 37°C (Courbe bleue) ou 55°C (Courbe orange). L'activité maximale à chaque température (100%) est calculée par rapport à la vitesse maximale à un temps d'incubation donné. Les autres valeurs sont calculées par rapport à cette valeur de référence.

Ces résultats démontrent que la Lugdulysine est une peptidase bien plus stable à 37°C qu'à 55°C. En effet, moins de 5 % de l'activité maximale est détectée après 6 h d'incubation à 55°C. La relative stabilité à 55°C de la Lugdulysine s'explique probablement par la présence de 3 ions calcium dans la structure (Article 2)^{236,237}. En revanche, la Lugdulysine reste parfaitement active après 24 h d'incubation à 37°C, puisqu'elle conserve 70% de son activité. Ces études *in vitro* laissent penser que la Lugdulysine est susceptible d'avoir une activité sur le long terme une fois sécrétée dans le corps de l'hôte. A cette température, sa longévité permet de compenser son activité amoindrie.

4) Conclusions

L'étude fonctionnelle de la Lugdulysine a permis de démontrer que cette peptidase semble incapable de dégrader la plupart des protéines structurées. En revanche, elle hydrolyse avec aisance des peptides courts et peu structurés. Les différents peptides digérés, LL-37, insuline, et méliittine ont révélé la présence régulière d'acides aminés en amont du site de clivage. De manière intéressante, le domaine inhibiteur de la Lugdulysine possède

également un acide aminé hydrophobe, 76Phe, localisé en amont du résidu potentiellement clivé lors de la maturation, 73Asp. Ces observations ont permis de délimiter deux potentiels sous-sites de la poche catalytique, impliqués dans la reconnaissance et le positionnement initial du substrat. Cette recherche de substrat physiologique nous a également conduit à observer un premier effet sur l'agrégation du biofilm. En effet, la présence de Lugdulysine dans le milieu de culture induit une diminution significative de biofilm formé. La Lugdulysine semble donc capable de dégrader certaines protéines impliquées dans ce processus. Malheureusement, il reste difficile à ce stade d'appréhender l'impact réel, et à quel stade de maturité du biofilm la Lugdulysine intervient. Pour finir, nous avons pu démontrer que la Lugdulysine est une peptidase extrêmement stable pouvant être active plus de 24 h dans l'organisme de l'hôte.

Chapitre 4

Discussions & Conclusion

Caractérisation génomique

1) Synthèse des résultats

Nous avons pu mettre en évidence un mécanisme potentiel de sécrétion relatif au système Sec / SPI, par le biais d'outils de prédictions informatique. Le gène *slp1* code donc pour une pré-Prolugduly sine qui pourrait être prise en charge par ce système avant d'être maturée dans le milieu extérieur. Ce même gène est également complété par un terminateur Rho-indépendant et par deux sites de fixation du ribosome potentiels.

Le séquençage des 81 souches *S. lugdunensis* VISLISI a également mis en évidence la présence de mutations, Gly299Ser et Ser412Phe notamment, expliquant la présence de surnageants de culture avec un phénotype protéolytique négatif sur azocaséine. Ces observations ont pu faciliter la compréhension d'éléments structurants nouveaux découverts lors des études cristallographiques et de la résolution de la structure de la Lugduly sine.

2) Confirmation des prédictions informatiques

Malgré la précision des prédictions informatiques, une étape d'expérimentation est nécessaire pour confirmer leurs valeurs. Bien que les activités du système Sec et de la Signal Peptidase I soient suffisamment caractérisées pour être exactes²³⁸, des manipulations ont été développées, afin d'étudier la sécrétion des protéines. Un article résume notamment un grand nombre d'expériences à ce propos²³⁸. Il est, par exemple, possible de mesurer par radioactivité, le taux de clivage du peptide signal, et donc de l'export de Prolugduly sine. Des mutations du peptide signal, au niveau du motif de reconnaissance par la Signal Peptidase I Ala-X-Ala, pourraient aussi confirmer l'implication de cette enzyme dans l'élimination du peptide signal de la pré-Prolugduly sine.

3) Construction d'une souche *S. lugdunensis* VISLISI-22Δ*slp1*

Le premier outil expérimental à réaliser pour continuer la caractérisation de la Lugduly sine serait de construire une souche *Staphylococcus lugdunensis* VISLISI_22Δ*slp1*. Cette souche serait donc l'alter-égo de la souche sauvage, à l'exception du gène *slp1* qui serait

excisé du génome par recombinaison homologue. Malheureusement, la modification du génome de *Staphylococcus lugdunensis* est un challenge relevé. Nous avons essayé tout au long de cette thèse de modifier la souche VISLISI_22 à l'aide d'outils moléculaires conçus spécialement pour ce type d'expérimentations²³⁹. L'excision du gène *slp1* est réalisée par l'intermédiaire d'un plasmide (pIMAY) contenant un assemblage de 1000 pb correspondant aux deux régions 5' et 3' bordantes du gène *slp1* (pIMAY- Δ *slp1*). Pour contrer les systèmes de restriction/modification de *Staphylococcus lugdunensis*, le plasmide pIMAY- Δ *slp1* a été amplifié à partir d'une souche intermédiaire nommée *E. coli* DC10B. Une fois purifiée, la construction est transférée par électroporation dans la souche VISLISI_22 électro compétente. En théorie, une fois le plasmide pIMAY- Δ *slp1* transfecté, un événement de recombinaison peut s'effectuer par reconnaissance entre la séquence assemblée du plasmide et le génome de la bactérie. Cet événement est ensuite sélectionné à l'aide de changements de paramètres de conditions de culture (ajout de tétracycline anhydre, variations de la température). Les souches ainsi sélectionnées ne contiennent ni plasmide, ni gène *slp1* qui fut excisé. Malheureusement, nous n'avons jamais réussi à transformer *S. lugdunensis* par électroporation, et ce malgré les nombreuses conditions testées (variations d'intensité du choc, de protocole de compétence bactérienne, de milieu, etc). Pour poursuivre dans cette voie, il existe un autre système de transformation utilisé pour cette espèce. En effet, des auteurs ont remplacé la souche d'amplification intermédiaire *E. coli* DC10B par une souche nommée *E. coli* SL01B. Cette souche permettrait notamment d'obtenir de meilleurs résultats que la souche précédente¹²⁰. D'autres auteurs ont également pu transformer une souche de *S. lugdunensis* avec un plasmide pCM40 par l'intermédiaire de la souche *E. coli* SL01B²⁴⁰. D'autres plasmides, tel le pKOR1²⁴¹, pourraient être testés en remplacement du pIMAY. La souche VISLISI_22 Δ *slp1* obtenue servirait potentiellement pour de nombreuses manipulations en tant que témoin négatif.

4) Etude de l'expression du gène *slp1*

Pour compléter ces résultats, il pourrait être intéressant d'étudier l'expression et la sécrétion de l'enzyme dans diverses conditions de culture. En effet, nous avons pu constater que le gène *slp1* est localisé à proximité d'un locus nommé *cnt* et codant un transporteur ABC et ses protéines associées (*cntABCDF*). Ce réseau de protéines est notamment spécialisé dans

l'import du zinc à l'intérieur de la bactérie²⁴². Pour cela, divers tests de croissance en milieu carencé en zinc (et autres métaux) permettraient d'établir une potentielle dépendance de la synthèse de Lugdulysine vis-à-vis de la concentration en zinc. Pour cela, des cinétiques d'expression et de maturation pourraient montrer des changements d'expression par rapport aux conditions normales (Figures 26 et 29). Si ces premiers résultats semblent concluants, il est possible d'envisager de créer des souches *S. lugdunensis* VISLISI_22 (sauvage), VISLISI_9 Gly299Ser) et VISLISI_29 (Ser412Phe) avec une délétion / mutation du transporteur Cnt. Cela permettrait d'affirmer la dépendance de la synthèse de la Lugdulysine au transport du zinc dans la bactérie.

Pour finir, la technique du gène rapporteur pourrait permettre d'étudier la régulation de l'expression du gène *slp1*. Cette expérience nécessite la construction d'un plasmide pCN52 contenant la région promotrice du gène *slp1* (*Ps/p1*). Cet outil moléculaire, spécialement conçu pour les Staphylocoques, code naturellement la GFP (Green Fluorescent Protein). Dans cette configuration, le plasmide pCN52-*Ps/p1*/GFP permet une expression de GFP sous le contrôle du promoteur *Ps/p1*. De cette manière, il est possible de suivre la synthèse de GFP, et donc l'activité du *Ps/p1*, par l'intermédiaire d'un lecteur de D.O. et fluorimètre TECAN. De nombreuses conditions pourraient donc être testées avec ce système et cette souche recombinante. En effet, en condition de culture liquide, cette souche permettrait de compléter les données cinétiques obtenues précédemment (Article 2). De plus, il serait possible également d'évaluer l'évolution de l'expression de Lugdulysine en condition de biofilm.

Caractérisation structurale

1) Synthèse des résultats

Les objectifs fixés au cours de ce travail ont été atteints grâce à la résolution des structures tri-dimensionnelles de la Lugdulysine et de la Prolugdulyisine (Glu242Gln, Tyr315Phe). Ces résultats, obtenus en collaboration avec l'IGBMC, pourront d'abord servir de références pour les zinc métallopeptidases de la famille M30 (selon la classification MEROPS¹⁶⁶) puisqu'il s'agit des deux premières structures à avoir été résolues de cette famille d'enzymes.

Nous avons découvert que la Lugdulysine, et probablement les peptidases apparentées, possède trois ions calcium impliqués dans la stabilité de l'enzyme. En plus de confirmer la présence d'un ion zinc au cœur du site catalytique, nous avons confirmé expérimentalement les résidus d'acides aminés engagés dans la coordination de l'atome et ceux impliqués dans la réaction d'hydrolyse enzymatique.

Les structures de la Prolugdulyisine mutée et de la Lugdulysine ont révélé l'existence d'un propeptide à part entière. A l'aide des résultats de séquençage, nous avons démontré que le propeptide est essentiel au repliement correct de la Lugdulysine. Nous avons pu décomposer le propeptide de la Lugdulysine en deux domaines distincts. Du côté, N-terminal, le propeptide contient un domaine qualifié de « structurant ». Ce sont les différents indices accumulés au cours de cette thèse qui nous ont permis d'expliquer l'importance de la relation inédite et sur le long terme entre ces 22 résidus d'acides aminés et le domaine catalytique. Cette interaction, représentée par un feuillet β , correspond à un troisième type de chaperonne intramoléculaire inédit. La structure de la Prolugdulyisine mutée a également mis en évidence un second domaine qualifié d'inhibiteur. Ce domaine bloque l'activité de la Lugdulysine par encombrement de la poche catalytique et en interagissant directement avec l'ion zinc. Le mécanisme de maturation, nommé « aspartate switch » dans la littérature est un mécanisme de maturation encore jamais rencontré chez les enzymes de la famille MA(E). Ces données traduisent également un mécanisme d'évolution potentiellement différent des autres métallopeptidases découvertes jusqu'à présent.

2) Impact des mutations sur le domaine structurant du propeptide

Des expériences de mutations pourraient confirmer l'importance du propeptide structurant pour le repliement et la stabilité de la Lugdulysine. Jusqu'aux tentatives de purifications des Lugdulysines Gly299Ser et Ser412Phe, nous pensions que les Prolugdulysines mutées ne pouvaient se maturer ni être active. Les résultats de purification ont cependant démontré le contraire. Pour contrer ce phénomène, nous pourrions envisager de produire et purifier des Prolugdulysines triplement mutées (Gly299Ser ou Ser412Phe et Glu242Gln, Tyr315Phe). Les Lugdulysines mutées produites seront donc inactives avec ces substitutions. Ainsi, dans le cas où ces enzymes se maturent, même transitoirement, elles resteront inactives et ne participeront pas à la dégradation des enzymes voisines. Après purification, nous pourrions essayer de cristalliser ces protéines, afin de résoudre leurs structures. Si cela fonctionne, nous pourrions observer des modifications structurales potentielles au niveau de la zone d'interaction voire sur la protéine entière.

Pour finir, les hypothèses de maturation pourraient être confirmées par des mutations réalisées sur les régions « appâts ». La mutation de ces sites pourrait empêcher la reconnaissance du motif par la Lugdulysine ou une autre peptidase, prévenant ainsi les deux étapes de clivage initiales.

3) Exploration de la poche catalytique

L'implication et la révélation des patches hydrophobes restent néanmoins à déterminer expérimentalement. Pour se faire, divers exercices de mutation d'un acide aminé structurant l'un de ces sous-sites ont déjà été réalisés chez diverses peptidases telles que la Thermolysine¹⁸¹ ou la MMP-2²⁴³. Pour la Thermolysine, une série de mutations localisées dans le sous-site S1' ont mis en évidence des variations d'affinité de l'enzyme pour ses substrats. Dans le cas de la MMP-2, la substitution Glu412Asp entraîne une diminution significative de la reconnaissance de certains substrats peptidiques spécifiques de l'enzyme. En effet, les auteurs observent une diminution d'un facteur 10, au minimum, de l'efficacité (k_{cat}/K_m) de la MMP-2 mutée, par rapport à la MMP-2 sauvage. D'autres manipulations ont été réalisées avec ce même objectif²⁴⁴⁻²⁴⁶. Dans notre cas, ces mutations permettraient de confirmer, ou modifier, les hypothèses émises sur la reconnaissance des acides aminés hydrophobes. Ainsi, en plus de modifier le substrat ([Article 2](#)), une mutation directement localisée sur l'enzyme

permettrait de visualiser l'impact réel de ces sous-sites. Ces résultats pourraient également être complétés par la synthèse et l'évaluation de peptides PP-77 intermédiaires ne contenant qu'une mutation (Tableau 10). Ainsi, nous pourrions observer l'impact individuel de chaque résidu d'acide aminé muté sur l'affinité de l'enzyme plutôt qu'une somme globale de modification exercées par trois mutations différentes.

Tableau 10 : Liste des peptides PP-77 intermédiaires mutés

Noms	Quencher	Séquences	Fluorophore
PP-77	Dabcyl	Glu-Ala-Phe-Lys-Glu-Asp-Lys-Leu-Phe-Lys	Glu(NH ₂)-EDANS
PP-77a	Dabcyl	Glu- Asp -Phe-Lys-Glu-Asp-Lys-Leu-Phe-Lys	Glu(NH ₂)-EDANS
PP-77b	Dabcyl	Glu-Ala- Glu -Lys-Glu-Asp-Lys-Leu-Phe-Lys	Glu(NH ₂)-EDANS
PP-77c	Dabcyl	Glu-Ala-Phe-Lys-Glu-Asp-Lys-Leu- Glu -Lys	Glu(NH ₂)-EDANS
PP-78	Dabcyl	Glu- Asp-Glu -Lys-Glu-Asp-Lys-Leu- Glu -Lys	Glu(NH ₂)-EDANS

4) Développement d'un inhibiteur

A plus long terme, la conception d'un inhibiteur spécifique à la Lugdulysine est une perspective intéressante. Les structures de la Prolugdulyline recombinante et de la Lugdulysine ont montré qu'aucun changement structural majeur ne s'opère lors de la maturation. Des inhibiteurs compétitifs, s'associant à l'étroitesse de la poche catalytique et au site actif, semblent donc être des cibles pertinentes. En ce sens, un peptide ne contenant que des acides aminés D (D-Lys-D-Ser-D-Glu-D-Asn-D-Arg-D-Ser-D-Gln-D-Asn-D-Glu-OH) a été synthétisé. De tels peptides sont notamment moins susceptibles à la protéolyse et possèdent, par conséquent une durée de vie et une immunogénicité *in vivo* supérieures aux peptides L^{247,248}. De tels peptides D ont déjà été utilisés pour générer des inhibiteurs de peptidases^{248,249}.

La très bonne résolution de ces structures permet également d'initier des travaux de « molecular docking », afin de développer par une approche prédictive différents inhibiteurs potentiels. Une telle approche fut notamment utilisée pour identifier des inhibiteurs de la Thermolysine²⁵⁰. Les peptides fluorescents PP74-78, et leur constante globale k_{cat}/K_m associée, sont alors des substrats de choix pour étudier les effets inhibiteurs des différentes molécules.

Caractérisation biochimique

1) Synthèse des résultats

Au cours de ce travail, nous avons pu caractériser les paramètres physico-chimiques optimaux à l'activité enzymatique. Ces résultats sont issus d'une évolution importante du processus expérimental puisque nous sommes passés d'un substrat limité, l'azocaséine, à des peptides fluorescents plus spécifiques, les PP74-78 (PPs). Bien que l'azocaséine ait permis d'établir une base sur laquelle s'appuyer pour définir les paramètres environnementaux des expériences, nous avons rapidement été contraint d'abandonner ce substrat. Nous avons donc démontré, par une approche en fluorescence, que la Lugdulysine développe une activité optimale à 55°C et à un pH de 5,0. Elle est également inhibée par l'EDTA et sensible à la concentration en calcium et en zinc. En ce sens, la Lugdulysine diffère légèrement de l'Hycolysine, dont l'activité maximale fut mesurée pour un pH compris entre 7,4 et 8,5¹⁶². Cela a notamment servi de référence aux zinc métallopeptidases M30 qui sont qualifiées aujourd'hui de « neutral zinc metallopeptidases ». Cette différence pourrait être due à l'utilisation de l'azocaséine pour la caractérisation de l'Hycolysine. En effet, nous avons pu constater qu'à pH acide (inférieur à 5,0), ce substrat devenait inutilisable. Cependant, cela n'explique pas pourquoi l'activité optimale fut observée à des pH basiques plutôt qu'à pH 5,0 – 5,5, comme c'est le cas avec le couple azocaséine-Lugdulyisine. Il pourrait donc s'agir d'une réelle différence avec l'Hycolysine qui démarquerait la Lugdulysine de la famille M30. Cette hypothèse semble pourtant peu probable compte tenu de toutes les autres similarités entre la Lugdulysine et ce groupe de peptidases.

Tous les objectifs n'ont cependant pas été atteints. En effet, nos conditions expérimentales, dépendantes des couples PPs-Lugdulyisine, n'ont pas permis de caractériser une V_{max} ou un K_m spécifique à ces substrats. Tout d'abord, ces peptides, basés sur des sites de clivages potentiels de la Lugdulysine, sont clivés de nombreuses fois par l'enzyme au cours de l'expérience. Ils n'auraient donc permis de déterminer que des constantes globales, somme des constantes spécifiques à l'hydrolyse de chaque liaison hydrolysée. De plus, le couple fluorophore / quencher que nous avons utilisé (EDANS/Dabcyl) n'a pas permis de réaliser de telles mesures. En effet, nous avons rapidement été confrontés à certaines limites

expérimentales impossibles à dépasser avec ces substrats. Tout d'abord, les premiers essais de détermination du K_m et de la V_{max} semblaient tendre vers une constante de Michaelis, K_m , supérieure à 100 μM . Les conditions expérimentales nécessitent alors d'utiliser des concentrations en peptides PPs bien supérieures à leurs limites de solubilité dans l'eau. A ce phénomène s'ajoute également celui du « quenching » intermoléculaire s'établissant entre le fluorophore d'un peptide clivé et le quencher d'une autre partie de peptide en solution. Ainsi, plus la concentration en PPs hydrolysé augmente, plus les probabilités de quenching entre deux peptides hydrolysés augmentent. Pour ces raisons nous n'avons pu déterminer qu'une constante d'efficacité catalytique, défini par le rapport k_{cat}/K_m . Ces résultats restent cependant de bonnes références pour de futures manipulations. Ils constituent également une base solide pour synthétiser de nouveaux substrats.

2) Cinétique enzymatique, cas du K_m et de la V_{max}

Malgré nos efforts, les peptides fluorescents PP-74 à 78 (PPs) n'ont pas permis de déterminer ces deux constantes caractéristiques d'une enzyme. Pour pallier aux limites de ces expérimentations, il est possible d'envisager différentes approches. Malgré cet échec, le couple EDANS-Dabcyl reste un couple intéressant pour ce type d'expérimentations. A ce couple, il est envisageable d'adjoindre un peptide de taille réduite, entre 3 et 4 résidus d'acides aminés., permettant de limiter les sites de coupures potentiels. Pour se faire, de nombreux motifs de résidus d'acides aminés, avec au moins un acide aminé hydrophobe devraient être synthétisés. Cette méthode, laborieuse, pourrait être complétée par une modification du couple EDANS-Dabcyl par un couple fluorescent moins sensible.

D'autres méthodologies peuvent être envisagées pour déterminer le K_m . Dans un premier temps, une étape d'évaluation de cette constante avec la fluorescamine va être mise place. Il s'agit d'une molécule capable de réagir avec les groupements amines libres. Cette réaction entraîne une émission de fluorescence est détectable et quantifiable. Un peptide, dont l'extrémité N-terminale sera bloquée, sera ainsi digéré par la Lugdulysine à différents temps. La réaction est alors stoppée, puis les produits de digestions mélangés à une solution de fluorescamine. De cette manière, il est possible d'obtenir une courbe représentative de

l'intensité de la fluorescence en fonction du temps. Lorsque différentes concentrations en substrats seront testées, il devrait être possible d'encadrer le K_m et de déterminer la courbe représentative de la V_{max} en fonction de la concentration en substrat. Cette méthode sera complétée par l'intermédiaire de plusieurs peptides avec avec la technique de spectrométrie RMN-HRMAS (Résonance magnétique nucléaire à haute résolution en rotation à l'angle magique). Il s'agit d'utiliser l'instrument pour détecter et titrer la libération d'un résidu Gly marqué à un isotope froid (^{13}C). Ce résidu Gly sera placé deux ou trois résidus après un acide aminé hydrophobe, comme nos observations avec les peptides PP-77 et PP-78 le suggèrent. A cette fin, différents peptides ont été mis au point par notre équipe (Tableau 11).

Tableau 11 : Liste des peptides synthétisés pour la détermination des constantes de la Lugdulysine par RMN-HRMAS

Les résidus Gly marqués (^{13}C) sont représentés en gras dans chaque séquence.

Noms	Séquences
PP-79	Trp- Pro-Tyr-Asp- *Gly
PP-80	Trp- Pro-Tyr-Asp- *Gly -Tyr
PP-81	Trp- Pro-Tyr-Asp- *Gly -Gln
PP-82	Asp-Phe-Arg-Gly- *Gly
PP-83	Asp-Phe-Val- *Gly
PP-84	Asp-Phe-Val- *Gly -Ser

Caractérisation fonctionnelle

1) Synthèse des résultats

D'un point de vue fonctionnel, nos travaux ont confirmé l'activité endopeptidase de la Lugdulysine. Son activité semble limitée à un ou quelques substrats spécifiques puisque la majorité des protéines mis en contact ne sont pas digérées. En revanche, les peptides sans conformation tri-dimensionnelle particulière sont hydrolysés très rapidement.

Partant de ce principe, nous avons pu démontrer que la Lugdulysine pouvait hydrolyser le peptide LL-37 et donc exercer une action protectrice pour *Staphylococcus lugdunensis*. En revanche, la Lugdulysine n'est pas capable d'hydrolyser d'autres peptides antimicrobiens tels qu'hBD2, hNP1 et hNP2. De tels résultats suggèrent que la Lugdulysine pourrait exercer une protection contre l'immunité innée au cours de l'infection.

Des études préliminaires ont également démontré que la Lugdulysine pourrait avoir un impact sur la formation du biofilm de *Staphylococcus lugdunensis*. En effet, cette peptidase pourrait dégrader des protéines structurant ce biofilm tout en empêchant sa formation. Cette observation est en adéquation avec la composition majoritairement protéique du biofilm de cette espèce¹³⁷. La Lugdulysine pourrait donc jouer un rôle supplémentaire dans le détachement ou l'empêchement de la formation du biofilm en condition d'infection.

2) Détermination d'un ou plusieurs substrats physiologiques

Ces expérimentations ne permettent pas d'appréhender concrètement le rôle et l'impact de l'enzyme *in vivo*. Les souches de *S. lugdunensis* de l'étude VISLISI avec une activité protéolytique détectable sont principalement associées à des infections ostéoarticulaires ou profondes. Il est donc probable que la Lugdulysine agisse sur des protéines matricielles rencontrées dans ces régions corporelles. Dans ce sens, nous avons réalisé une première expérience de digestion d'une matrice protéique complexe synthétisée par une culture cellulaire de « fibroblastes like synoviocytes ». Pour cela, nous avons mis en contact la Lugdulysine avec la culture cellulaire avant d'analyser les produits de digestion par spectrométrie de masse en tandem. Malheureusement, ces cellules, de culture très lente, sont

difficiles à prélever. Nous n'avons donc pas pu réaliser de répétition ou d'optimisation du protocole employé. Les résultats obtenus, avec jusqu'à 2000 protéines différentes détectées, n'ont pas permis non plus de révéler une cible particulière. Cependant, il est possible qu'avec un système et une méthodologie différente, nous puissions détecter une protéine ciblée.

En parallèle, des expériences *in vitro* de digestion de protéines de la matrice extracellulaire purifiées pourraient être mises en place. En effet, une simple expérience de mise en contact de la Lugdulysine avec les collagènes, l'élastine, la fibronectine ou encore les laminines²⁵¹, pourrait permettre d'identifier de potentiels sites de coupures. Il sera ensuite plus facile, à partir de ces données, d'orienter la recherche vers un système plus complexe tel qu'une culture cellulaire ou un modèle *in vivo*. D'autres types de substrats, telles que les serpines pourraient également être testés. Il s'agit d'une famille de protéine identifiée et connue pour leurs propriétés inhibitrices (Serine Protease Inhibitors, Serpin). La structure de ces protéines, impliquées dans de nombreux rôles physiologiques, est caractérisée par la présence d'une boucle réactive porteuse du domaine inhibiteur de la serpine. Ce domaine est localisé dans une boucle flexible, peu repliée et tournée vers l'extérieur, afin d'interagir avec le site actif de la peptidase à inhiber²⁵². Ce type de structure pourrait donc correspondre parfaitement au fonctionnement de la Lugdulysine.

[3\) Lugdulysine et impact sur le Biofilm](#)

Au-delà de digestion de protéines, la prévention de la formation de biofilm par la Lugdulysine est un résultat encourageant. Cela indique que la Lugdulysine peut potentiellement dégrader les protéines synthétisées et impliquées dans cette structure. Des expériences complémentaires, impliquant une collaboration avec l'entreprise BioFilm Control™, pourraient confirmer et préciser ces premières observations. En effet, les protocoles, concentrations, temps d'incubation n'ont pas pu être optimisés au cours de ce travail. De plus, nous pourrions coupler ces cinétiques de formation du biofilm à de la spectrométrie de masse en tandem. Il s'agirait alors de caractériser les protéines constitutives du biofilm, puis d'identifier les protéines dégradées par la Lugdulysine. Des souches telles que VISLISI_22Δ*slp1* et VISLISI_22P*slp1*-GFP, évoquées dans la partie caractérisation biochimique, pourraient jouer un rôle essentiel en tant que témoin et rapporteur de l'expression du gène *slp1* en condition de biofilm.

Conclusion

Staphylococcus lugdunensis est désormais une bactérie difficile à ignorer. L'intérêt clinique pour cette bactérie, directement corrélé avec la sévérité des infections, a permis de décrire une espèce inhabituellement virulente pour un CoNS. Suite à ces observations, les différentes campagnes de séquençages ont permis de décrire et comprendre, en partie, les raisons d'une virulence proche de celle développée par *S. aureus*^{26,101,102}. Dès lors, de nombreux facteurs de virulence, et leurs impacts au cours de l'infection ont pu être décrits (Chapitre 3). Dans ce contexte, notre équipe s'est notamment intéressée aux manifestations cliniques des infections à *S. lugdunensis*²⁶. Cette étude a permis de révéler l'existence et l'implication d'une peptidase, appelé Lugdulysine.

Le séquençage de la Lugdulysine a révélé son appartenance à la famille des zinc métallopeptidases M30 selon la classification MEROPS¹⁶⁶. Il s'agissait jusqu'à présent d'une famille de peptidases fondée sur des analogies de séquences. Relativement peu caractérisées, ces peptidases sont décrites par le prisme de l'Hycolysine, la peptidase de référence¹⁶². Nous avons donc cherché à comprendre le fonctionnement de la Lugdulysine, tout d'abord par l'intermédiaire de cette référence, puis en orientant notre méthodologie en fonction des différentes limites et résultats obtenus. Ainsi, nous avons pu caractériser les premières structures mature et immature qui pourront servir de références aux métallopeptidases M30. De manière fortuite, nous avons découvert l'existence d'une relation particulière entre le propeptide et le domaine catalytique. Cette relation, pour l'instant singulière à ces peptidases, suppose un nouveau type de propeptide en tant que chaperonne intramoléculaire sur le long terme (Type III). Basés sur des sites de maturation, nous avons mis au point des substrats fluorescents pour étudier les constantes cinétiques. Nous avons également démontré un effet protecteur de la Lugdulysine vis-à-vis du peptide LL37 et initié une étude démontrant son impact sur le biofilm. Pour finir, nous avons établi qu'un résidu hydrophobe est nécessaire lors de la première étape d'interaction entre la Lugdulysine et son substrat. Cette spécificité est notamment tournée vers les peptides peu structurés. Ces travaux, ouvrent la voie à de nouvelles investigations et permettent d'établir une base solide tout en établissant certaines limites pour l'étude des zinc métallopeptidases apparentées.

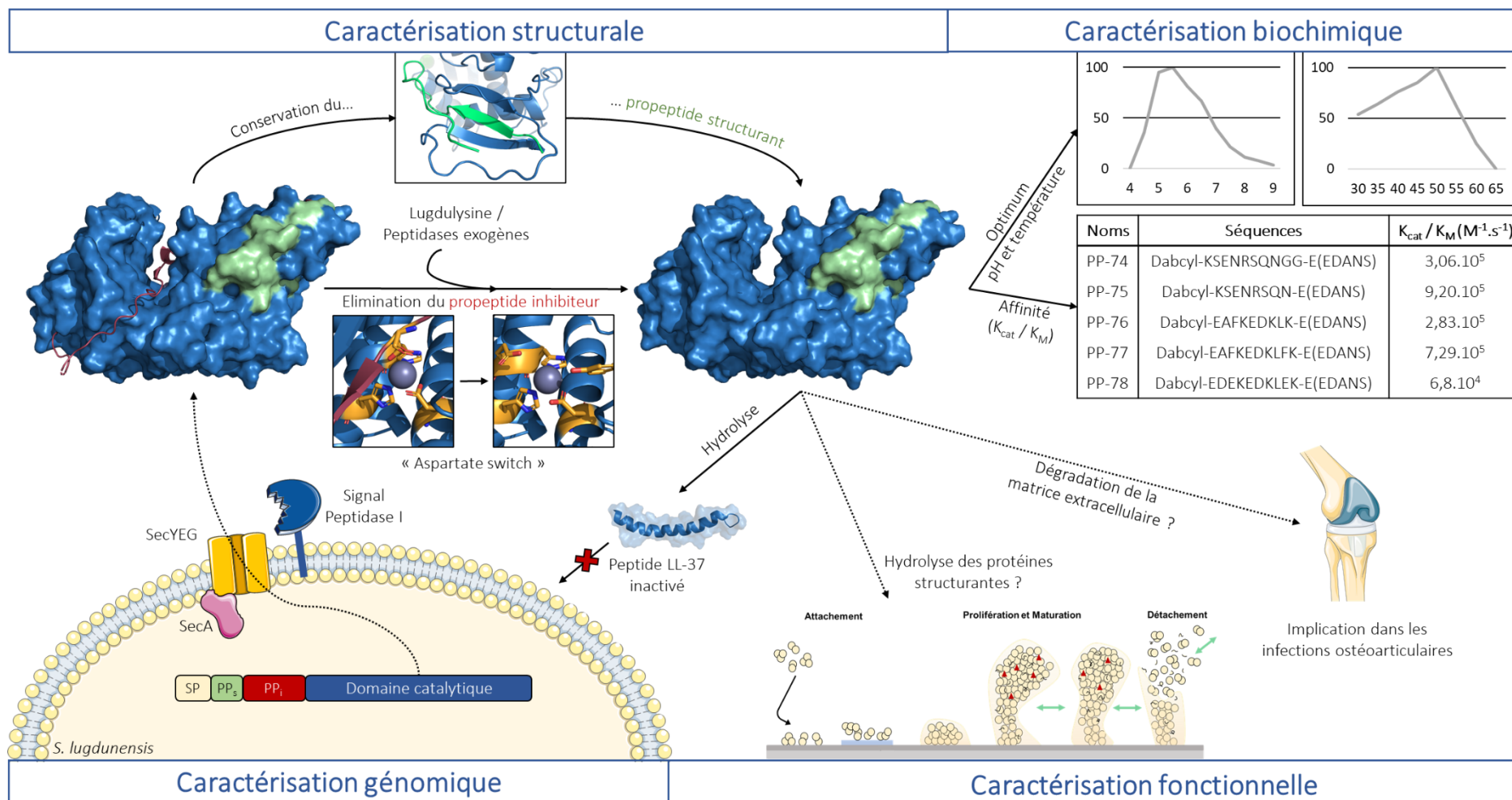


Figure 40 : Schéma récapitulatif des données génomiques, structurales, biochimiques et fonctionnelles accumulées au cours de ce thèse

Les interactions confirmées expérimentalement sont représentées par des flèches pleines. A l'inverse, les éléments à confirmer sont représentés par des lignes pointillées.

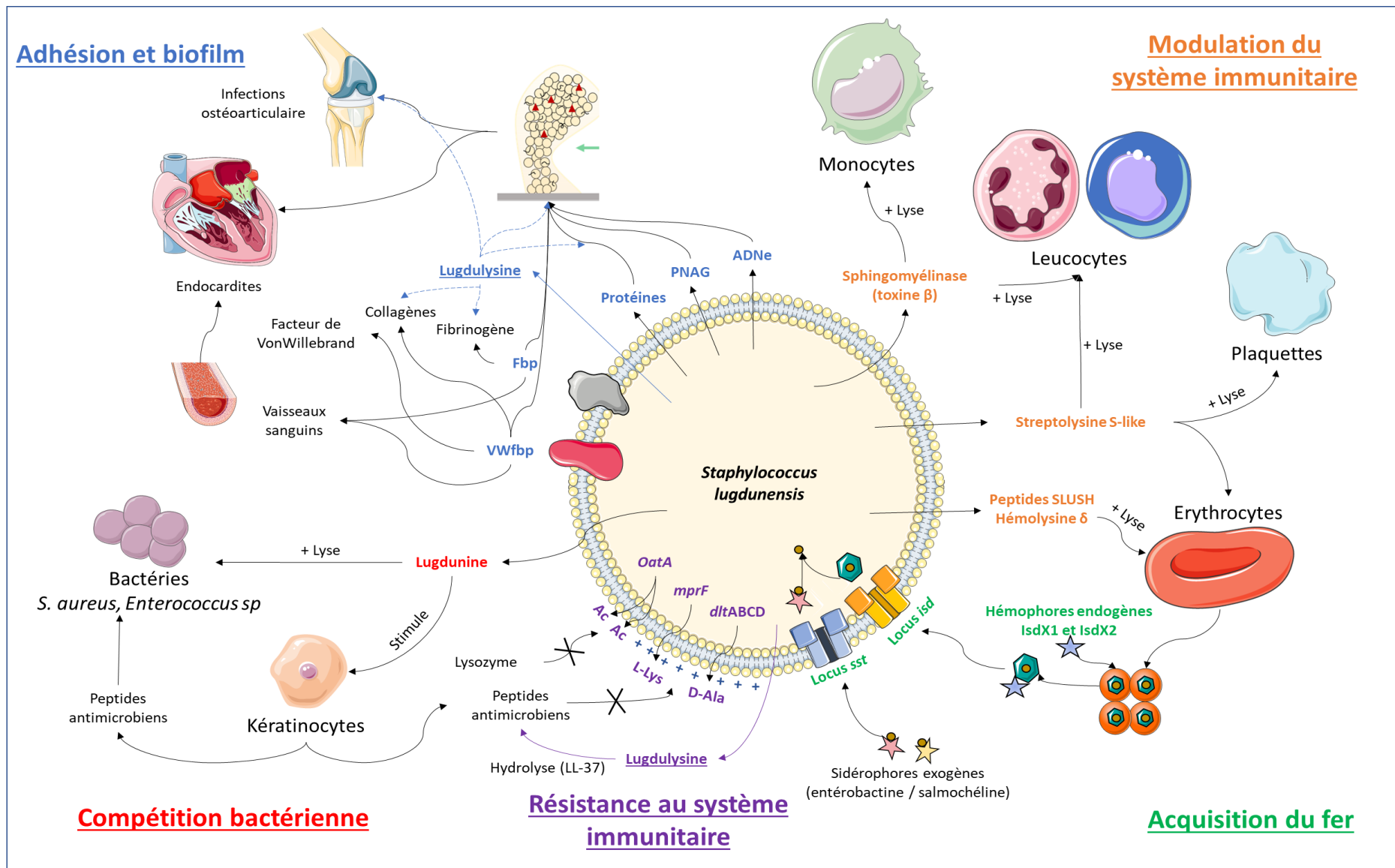


Figure 41 : Place de la Lugdulyline parmi les facteurs de virulence de *Staphylococcus lugdunensis*

Chapitre 5

Annexes

Index des Figures

Figure 1 : Représentation graphique de la découverte des espèces du genre <i>Staphylococcus</i> découvertes depuis 1881 jusqu'à aujourd'hui.....	17
Figure 2 : Illustration des différentes morphologies après culture de différentes espèces de Staphylocoques sur géloses au sang de mouton.....	18
Figure 3 : Schéma simplifié d'indentification phénotypique des Staphylocoques.....	20
Figure 4 : Représentation schématique de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	24
Figure 5 : Schéma simplifié des considérations cliniques vis-à-vis des Staphylocoques.....	27
Figure 6 : Recommandations concernant l'isolement de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	30
Figure 7 : Mécanisme d'ancrage par la sortase A chez <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	38
Figure 8 : Schéma représentatif des interactions entre les différentes protéines Isd mise en évidence dans diverses publications.....	43
Figure 9 : Schéma représentatif du développement d'un biofilm Staphylococcique.....	44
Figure 10 : Structure de la lugdunine.....	49
Figure 11 : Principaux facteurs de virulence associés à <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	52
Figure 12 : Schéma simplifié d'une réaction enzymatique selon le modèle « clef-serrure ».....	55
Figure 13 : Représentation des trois types de sites de fixation de l'ion métallique.....	61
Figure 14 : Diversité des ions métalliques au cœur de différents sites catalytiques.....	63
Figure 15 : Représentation schématique de la poche catalytique de la thermolysine.....	65
Figure 16 : Schéma général du mécanisme catalytique des métallopeptidases à site catalytique.....	68
Figure 17 : Mécanisme catalytique détaillé de la Thermolysine.....	63
Figure 18 : Structures tridimensionnelles des précurseurs de la MCP-02 et de la Protéalysine.....	71
Figure 19 : Structures et coordinations tétraédrique de l'ion zinc dans divers sites catalytiques.....	72
Figure 20 : Représentation schématique d'un « aspartate / cysteine switch ».....	73
Figure 21 : Prédiction du peptide signal et de la séquence primaire de la pré-Prolugdulyline.....	128
Figure 22 : Séquence primaire du peptide signal de la Lugdulyline.....	129
Figure 23 : Représentation hypothétique de la sécrétion de la Prolugdulyline par le système Sec/SPI.....	130
Figure 24 : Séquence primaire et domaines de la pré-Prolugdulyline.....	131

Figure 25 : Représentation et localisation des mutations naturelles retrouvées chez les souches de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> de la collection VISLISI.....	133
Figure 26 : Cinétique de maturation sur 48 h de la Lugdulysine synthétisée par les souches <i>S. lugdunensis</i> VISLISI_9 et 29.....	135
Figure 27 : Les différents types de propeptides agissant comme chaperonnes intramoléculaires.....	137
Figure 28 : Représentation de surface et cartoon de la Prolugdulyisine et importance du propeptide.....	139
Figure 29 : Maturation de la Lugdulysine sauvage et de la Prolugdulyisine mutée par la Lugdulysine.....	140
Figure 30 : Sites de clivages à l'intérieur du propeptide de la Prolugdulyisine.....	141
Figure 31 : Mécanisme potentiel de maturation de la Prolugdulyisine.....	142
Figure 32 : Comparaison entre la structure prédite et résolue de la Lugdulysine.....	145
Figure 33 : Assemblage des SDS-Page des expériences de digestion de protéines par la Lugdulysine.....	147
Figure 34 : Taille de la poche catalytique de la Lugdulysine et de certains substrats.....	148
Figure 35 : Représentation de deux sous sites potentiels de la Lugdulysine.....	150
Figure 36 : Résultats de la croissance du biofilm selon deux techniques de révélation.....	151
Figure 37 : Quantification de la production de biofilm par les souches VISLISI par Crystal Violet.....	152
Figure 38 : Quantification du biofilm de <i>S. lugdunensis</i> avec le BioFilm Ring Test.....	153
Figure 39 : Stabilité de la Lugdulysine en fonction du temps et de la température.....	155
Figure 40 : Schéma récapitulatif des données génomiques, structurales, biochimiques et fonctionnelles accumulées au cours de ce thèse.....	173
Figure 41 : Place de la Lugdulysine parmi les facteurs de virulence de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	175

Index des Tables

Tableau 1 : Ensemble des caractéristiques phénotypiques de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	21
Tableau 2 : Taxonomie actuelle de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	26
Tableau 3 : Liste des résistances aux antibiotiques chez <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	34
Tableau 4 : Classification des métallopeptidases selon la MEROPS Database.....	59
Tableau 5 : Schématisation des grands mécanismes d'activité enzymatique.....	64
Tableau 6 : Souches utilisées et construites lors de cette thèse.....	117
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées au cours de cette thèse.....	117
Tableau 8 : Plasmides construits et utilisés au cours de cette thèse.....	118
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des mutations du gènes <i>slp1</i> chez les souches de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> VISLISI.....	132
Tableau 10 : Liste des peptides PP-77 intermédiaires mutés.....	164
Tableau 11 : Liste des peptides synthétisés pour la détermination des constantes de la Lugdulysine par RMN-HRMAS.....	167

Synthèse des publications, communications orales et posters

1) Publications

A) Publié

Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics

Argemi, X., Hansmann, Y., **Prola, K.** & Prévost, G.

Int J Mol Sci 20, (2019).

B) En cours de soumission

Staphylococcus lugdunensis M30 zinc metallopeptidase, lugdulysin, stabilizes with part of its propeptide and protects from lysis by LL37 (Provisoire)

Kevin Prola^{1*}, Nicolas Levy^{2*}, Nicolas Humbert³, Jean Marc Strub⁴, Daniel Keller¹, Matthieu Seyer¹, Christian Boudier³, Julien Batisse², Yves Mély³, Sarah Cianferani-Sanglier⁴, Marc Ruff², Gilles Prévost¹

Nature communication

2) Présentations orales

A) Congrès régionaux

FMTS - Journées de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, 2019 :

« Caractérisation d'un potentiel facteur de virulence, la Lugdulysine, et mise en évidence d'un nouveau mécanisme de maturation »

SMS – Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, 2019 :

« Caractérisation d'un potentiel facteur de virulence, la lugdulysine, et mise en évidence d'un nouveau mécanisme de maturation »

B) Congrès international

SFET – Société Française pour l'Etude des Toxines (RT25), 2018

« Characterization of a potential virulence factor zinc metallopeptidase produced by *Staphylococcus lugdunensis* »

3) Posters

SMS – Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, 2018 :

« Caractérisations des propriétés enzymatiques et structurales de la lugdulysine, un potentiel facteur de virulence »

SFET – Société Française pour l'Etude des Toxines (RT25), 2018

« Crystal Structure of the lugdulysin, a zinc metallopeptidase produced by *Staphylococcus lugdunensis* »

Bibliographie

1. Ogston, A. Micrococcus Poisoning. *J. Anat. Physiol.* **17**, 24–58 (1882).
2. Ogston, A. “On Abscesses”. *Rev. Infect. Dis.* **6**, 122–128 (1984).
3. Rosenbach, F. J. *Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.* 1–150 (J.F. Bergmann, 1884). doi:10.5962/bhl.title.22955.
4. Karl Bernhard Lehmann, R. O. N. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik ...* (Lehmann, 1896).
5. Winslow, C.-E. A. & Winslow, A. R. *The systematic relationships of the Coccaceae, with a discussion of the principles of bacterial classification.* 1–344 (J. Wiley [etc., etc.], 1908). doi:10.5962/bhl.title.23878.
6. Evans, A. C. *The Bacteria of Milk Freshly Drawn from Normal Udders.* (The Journal of Infectious Diseases, 1916).
7. Fairbrother, R. W. Coagulase production as a criterion for the classification of the staphylococci. *J. Pathol. Bacteriol.* **50**, 83–88 (1940).
8. Schleifer, K. H. & Kloos, W. E. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**, 50–61 (1975).
9. Devriese, L. A., Hajek, V., Oeding, P., Meyer, S. A. & Schleifer, K. H. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus subsp. chromogenes subsp. nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 482–490 (1978).
10. Freney, J. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis sp. nov.* and *Staphylococcus schleiferi sp. nov.*, Two Species from Human Clinical Specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 168–172 (1988).
11. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014).
12. Tong, S. Y. C. *et al.* Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus sp. nov.* and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri sp. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 15–22 (2015).
13. Pantůček, R. *et al.* *Staphylococcus edaphicus sp. nov.*, Isolated in Antarctica, Harbors the mecC Gene and Genomic Islands with a Suspected Role in Adaptation to Extreme Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e01746-17 (2017).

14. Švec, P. *et al.* Reclassification of *Staphylococcus pulvereri* Zakrzewska-Czerwińska *et al.* 1995 as a later synonym of *Staphylococcus vitulinus* Webster *et al.* 1994. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2213–2215 (2004).
15. Baba, T. *et al.* Complete Genome Sequence of *Macrococcus caseolyticus* Strain JSCS5402, Reflecting the Ancestral Genome of the Human-Pathogenic Staphylococci. *J. Bacteriol.* **191**, 1180–1190 (2009).
16. Loss, G. *et al.* *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 363 (2019).
17. Bogut, A. *et al.* Characterization of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus warneri* small-colony variants associated with prosthetic-joint infections. *J. Med. Microbiol.* **63**, 176–185 (2014).
18. Askar, M., Bloch, B. & Bayston, R. Small-colony variant of *Staphylococcus lugdunensis* in prosthetic joint infection. *Arthroplasty Today* **4**, 257–260 (2018).
19. Argemi, X. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. *Med. Mal. Infect.* **47**, 498–501 (2017).
20. Proctor, R. A. *et al.* Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 295–305 (2006).
21. Précis de Bactériologie Clinique - 3e édition - Eska. <https://eska-publishing.com/fr/medecine/1132901-precis-de-bacteriologie-clinique-3e-edition-9782747228060.html>.
22. Kloos, W. E. & Schleifer, K. H. Simplified Scheme for Routine Identification of Human *Staphylococcus* Speciesg. *J CLIN MICROBIOL* **7**.
23. Hébert, G. A., Crowder, C. G., Hancock, G. A., Jarvis, W. R. & Thornsberry, C. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the family Micrococcaceae. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1939–1949 (1988).
24. Compton, S. T. *et al.* Evaluation of Pyrrolidonyl Arylamidase Activity in *Staphylococcus delphini*. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 859–864 (2017).
25. Mitchell, J., Tristan, A. & Foster, T. J. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology* **150**, 3831–3841 (2004).
26. Argemi, X. *et al.* VISLISI trial, a prospective clinical study allowing identification of a new metalloprotease and putative virulence factor from *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 334.e1-334.e8 (2017).
27. Fournier, J. M. *et al.* New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1342–1344 (1993).

28. Blake, J. E. & Metcalfe, M. A. A Shared Noncapsular Antigen Is Responsible for False-Positive Reactions by *Staphylococcus epidermidis* in Commercial Agglutination Tests for *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 544–550 (2001).
29. van Griethuysen, A., Bes, M., Etienne, J., Zbinden, R. & Kluytmans, J. International Multicenter Evaluation of Latex Agglutination Tests for Identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 86–89 (2001).
30. Reimer, L. C. *et al.* BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. *Nucleic Acids Res.* **47**, D631–D636 (2019).
31. Yoshikawa, H. GENE CONSERVATION IN BACILLUS SPECIES, I. CONSERVED GENETIC AND NUCLEIC ACID BASE SEQUENCE HOMOLOGIES* BY DAVID DUBNAU, ISSAR SMITH, PIERRE M\IORELL, AND JULIUS 'MARMUR. **8**.
32. Clarridge, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 840–862 (2004).
33. Gribaldo, S., Cookson, B., Saunders, N., Marples, R. & Stanley, J. Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative staphylococcal species important in hospital infection. *J. Med. Microbiol.* **46**, 45–53 (1997).
34. Maes, N. & Gheldre, Y. D. Rapid and Accurate Identification of *Staphylococcus* Species by tRNA Intergenic Spacer Length Polymorphism Analysis. *J CLIN MICROBIOL* **35**, 5 (1997).
35. Becker, K. *et al.* Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4988–4995 (2004).
36. Drancourt, M. & Raoult, D. rpoB Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* Species. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1333–1338 (2002).
37. Mellmann, A. *et al.* Sequencing and Staphylococci Identification. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 333–336 (2006).
38. Goh, S. H. *et al.* HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 818–823 (1996).
39. Goh, S. H. *et al.* Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3116–3121 (1997).
40. Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C. & Trieu-Cuot, P. Rapid and Accurate Species-Level Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Using the sodA Gene as a Target. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4296–4301 (2001).
41. Martineau, F. *et al.* Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2541–2547 (2001).

42. Pinsky, B. A., Samson, D., Ghafghaichi, L., Baron, E. J. & Banaei, N. Comparison of Real-Time PCR and Conventional Biochemical Methods for Identification of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3472–3477 (2009).
43. Hirotaki, S., Sasaki, T., Kuwahara-Arai, K. & Hiramatsu, K. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3627–3631 (2011).
44. Anhalt, J. P. & Fenselau, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60352a007> (2002) doi:10.1021/ac60352a007.
45. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151–153 (1988).
46. Karas, Michael. & Hillenkamp, Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
47. Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. & Gordon, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1584–1586 (1996).
48. Krishnamurthy, T. & Ross, P. L. Rapid Identification of Bacteria by Direct Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Whole Cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1992–1996 (1996).
49. Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. & Wolk, D. M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 547–603 (2013).
50. Edwards-Jones, V. *et al.* Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* **49**, 295–300 (2000).
51. Carbonnelle, E. *et al.* Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2156–2161 (2007).
52. van Veen, S. Q., Claas, E. C. J. & Kuijper, E. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 900–907 (2010).
53. Carbonnelle, É. & Nassif, X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences* **27**, 882–888 (2011).
54. Dubois, D. *et al.* Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 941–945 (2010).
55. Cavalier-Smith, T. The neomuran origin of archaebacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 7–76 (2002).

56. Gibbons, N. E. & Murray, R. G. E. Proposals Concerning the Higher Taxa of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 1–6 (1978).
57. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. (Springer-Verlag, 2009). doi:10.1007/978-0-387-68489-5.
58. Hauduroy, P. *Dictionnaire des bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes; suivi de la liste des êtres microscopiques conservés dans collections de cultures types*. (Masson, 1953).
59. Grice, E. A. & Segre, J. A. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 244–253 (2011).
60. Grice, E. A. *et al.* Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science* **324**, 1190–1192 (2009).
61. Costello, E. K. *et al.* Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* **326**, 1694–1697 (2009).
62. Herchline, T. E. & Ayers, L. W. Occurrence of *Staphylococcus lugdunensis* in consecutive clinical cultures and relationship of isolation to infection. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 419–421 (1991).
63. Vandenesch, F., Eykyn, S. J., Etienne, J. & Lemozy, J. Skin and post-surgical wound infections due to *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**, 73–74 (1995).
64. van der Mee-Marquet, N. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis* Infections: High Frequency of Inguinal Area Carriage. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1404–1409 (2003).
65. Ho, P.-L. *et al.* Carriage niches and molecular epidemiology of *Staphylococcus lugdunensis* and methicillin-resistant *S. lugdunensis* among patients undergoing long-term renal replacement therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **81**, 141–144 (2015).
66. Cornaglia, G. *et al.* *European manual of clinical microbiology*. (European Society for Clinical Microbiology and Infections Diseases, 2012).
67. Argemi, X., Hansmann, Y., Riegel, P. & Prévost, G. Is *Staphylococcus lugdunensis* Significant in Clinical Samples? *J. Clin. Microbiol.* **55**, 3167–3174 (2017).
68. Bocher, S., Tønning, B., Skov, R. L. & Prag, J. *Staphylococcus lugdunensis*, a Common Cause of Skin and Soft Tissue Infections in the Community. *J CLIN MICROBIOL* **47**, 5 (2009).
69. Heldt Manica, L. A. & Cohen, P. R. *Staphylococcus lugdunensis* Infections of the Skin and Soft Tissue: A Case Series and Review. *Dermatol. Ther.* **7**, 555–562 (2017).
70. Bellamy, R. & Barkham, T. *Staphylococcus lugdunensis* Infection Sites: Predominance of Abscesses in the Pelvic Girdle Region. *Clin. Infect. Dis.* **35**, e32–e34 (2002).
71. Hubiche, T., Giudice, P. D. & Roudière, L. *Staphylococcus lugdunensis* in Skin Infections: Pathogen or Colonizing Bacterium? *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3057–3057 (2009).
72. Thomas, S., Hoy, C. & Capper, R. Osteomyelitis of the ear canal caused by *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Infect.* **53**, e227–e229 (2006).

73. Ros, M. J. *et al.* [Infection by *Staphylococcus lugdunensis*: clinico-microbiologic characterization of 25 cases]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **17**, 223–226 (1999).
74. Hung, T., Zaghi, S., Yousefzadeh, J. & Leibowitz, M. Necrotizing Fasciitis Associated with *Staphylococcus lugdunensis*. *Case Reports in Infectious Diseases* vol. 2012 e453685 <https://www.hindawi.com/journals/criid/2012/453685/> (2012).
75. Etienne, J., Brun, Y. & Fleurette, J. *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *J. Clin. Pathol.* **42**, 892–893 (1989).
76. Fleurette, J. *et al.* Clinical isolates of *Staphylococcus lugdunensis* and *S. schleiferi*: bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents. *Res. Microbiol.* **140**, 107–118 (1989).
77. Liu, P.-Y. *Staphylococcus lugdunensis* Infective Endocarditis: A Literature Review and Analysis of Risk Factors. 7.
78. Sabe, M. A., Shrestha, N. K., Gordon, S. & Menon, V. *Staphylococcus lugdunensis*: a rare but destructive cause of coagulase-negative *Staphylococcus* infective endocarditis: *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care* (2014) doi:10.1177/2048872614523350.
79. Miro, J. M. *et al.* *Staphylococcus aureus* Native Valve Infective Endocarditis: Report of 566 Episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. 11.
80. Whitener, C., Caputo, G. M., Weitekamp, M. R. & Karchmer, A. W. Endocarditis due to coagulase-negative staphylococci. Microbiologic, epidemiologic, and clinical considerations. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **7**, 81–96 (1993).
81. Chu, V. H. *et al.* Emergence of Coagulase-Negative Staphylococci as a Cause of Native Valve Endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 232–242 (2008).
82. Anguera, I. *Staphylococcus lugdunensis* infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles. *Heart* **91**, e10–e10 (2005).
83. Shah, N. B. *et al.* Laboratory and Clinical Characteristics of *Staphylococcus lugdunensis* Prosthetic Joint Infections. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1600–1603 (2010).
84. Douiri, N. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis*: a virulent pathogen causing bone and joint infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 747–748 (2016).
85. Argemi, X. *et al.* *Staphylococcus lugdunensis* small colony variant conversion resulting in chronic prosthetic joint infection. *Médecine Mal. Infect.* **47**, 498–501 (2017).
86. Lourtet-Hascoët, J., Bicart-See, A., Félicé, M. P., Giordano, G. & Bonnet, E. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Infect. Dis.* **51**, 56–61 (2016).
87. Munoz-Davila, M. J., Perez, T., Cascales, E. & Gallego, M. C. Urinary tract infection due to *Staphylococcus lugdunensis* in a 70-year-old woman with cystocele grade 3. 3.

88. Hayakawa, I., Hataya, H., Yamanouchi, H., Sakakibara, H. & Terakawa, T. Neonatal *Staphylococcus lugdunensis* urinary tract infection. *Pediatr. Int.* **57**, 783–785 (2015).
89. Matas, A., Veiga, A. & Gabriel, J. P. Brain Abscess due to *Staphylococcus lugdunensis* in the Absence of Endocarditis or Bacteremia. *Case Rep. Neurol.* **7**, 1–5 (2015).
90. Li, Y. M., Blaskiewicz, D. J. & Hall, W. A. Shunt-Related Intracranial Abscess Caused by *Staphylococcus lugdunensis* in a Hydranencephalic Patient. *World Neurosurg.* **80**, e387–e389 (2013).
91. Tibebu, M. Severe hospital acquired pneumonia and septicemia due TO methicillin resistant *Staphylococcus lugdunensis* in a newborn in Northwestern Ethiopia. *Ethiop. Med. J.* **52**, 99–101 (2014).
92. Kleiner, E., Monk, A. B., Archer, G. L. & Forbes, B. A. Clinical Significance of *Staphylococcus lugdunensis* Isolated from Routine Cultures. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 801–803 (2010).
93. Yen, T.-Y. *et al.* Emergence of oxacillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* carrying staphylococcal cassette chromosome mec type V in central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **49**, 885–891 (2016).
94. Taha, L., Stegger, M. & Söderquist, B. *Staphylococcus lugdunensis*: antimicrobial susceptibility and optimal treatment options. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **38**, 1449–1455 (2019).
95. Matynia, B., Młodzinska, E. & Hryniewicz, W. Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* in Poland obtained by the National Quality Assurance Programme. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 379–385 (2005).
96. Gitau, W., Masika, M., Musyoki, M., Museve, B. & Mutwiri, T. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at Kenyatta National Hospital. *BMC Res. Notes* **11**, 226 (2018).
97. Rj, G. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* colonization is highly clonal across US cardiac centers. *J. Infect. Dis.* **205**, 1391–1398 (2012).
98. Barros, E. M., Ceotto, H., Bastos, M. C. F., dos Santos, K. R. N. & Giambiagi-deMarval, M. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 166–168 (2012).
99. Argemi, X. *et al.* Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 2030–2036 (2015).
100. Tse, H. *et al.* Complete Genome Sequence of *Staphylococcus lugdunensis* Strain HKU09-01. *J. Bacteriol.* **192**, 1471–1472 (2010).

101. Heilbronner, S. *et al.* Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors: *Staphylococcus lugdunensis* genome sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **322**, 60–67 (2011).
102. Argemi, X. *et al.* Whole genome sequencing of 7 strains of *Staphylococcus lugdunensis* allows identification of mobile genetic elements. *Genome Biol. Evol.* (2017) doi:10.1093/gbe/evx077.
103. Malachowa, N. & DeLeo, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3057–3071 (2010).
104. Foster, T. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**, 484–488 (1998).
105. Paulsson, M., Petersson, A.-C. & Ljungh, A. Serum and tissue protein binding and cell surface properties of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Med. Microbiol.* **38**, 96–102 (1993).
106. Ton-That, H., Faull, K. F. & Schneewind, O. A BRANCHED PEPTIDE THAT LINKS THE CARBOXYL TERMINUS OF PROTEINS TO THE CELL WALL. 9.
107. Zhang, R. *et al.* Structures of Sortase B from *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis* Reveal Catalytic Amino Acid Triad in the Active Site. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **12**, 1147–1156 (2004).
108. Hendrickx, A. P. A., Budzik, J. M., Oh, S.-Y. & Schneewind, O. Architects at the bacterial surface — sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 166–176 (2011).
109. Hassan, I., Saxena, A. & Ahmad, F. Structure and function of von Willebrand factor: the protein that is deficient and/or abnormal in inherited von Willebrand disease. 12.
110. Huck, V., Schneider, M. F., Gorzelanny, C. & Schneider, S. W. The various states of von Willebrand factor and their function in physiology and pathophysiology. *Thromb. Haemost.* **111**, 598–609 (2014).
111. A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **7** (2004).
112. Giormezis, N. *et al.* Virulence factors among *Staphylococcus lugdunensis* are associated with infection sites and clonal spread. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 773–778 (2015).
113. Liesenborghs, L. *et al.* Shear-Resistant Binding to von Willebrand Factor Allows *Staphylococcus lugdunensis* to Adhere to the Cardiac Valves and Initiate Endocarditis. *J. Infect. Dis.* **213**, 1148–1156 (2016).
114. Kattula, S., Byrnes, J. R. & Wolberg, A. S. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, (2017).
115. Pieters, M. & Wolberg, A. S. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **3**, 161–172 (2019).
116. Nilsson, M., Bjerketorp, J., Guss, B. & Frykberg, L. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**, 87–93 (2004).

117. Geoghegan, J. A. *et al.* Molecular Characterization of the Interaction of Staphylococcal Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with Fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **285**, 6208–6216 (2010).
118. Moreillon, P. *et al.* Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **63**, 4738–4743 (1995).
119. Szabados, F. *et al.* Fbl is not involved in the invasion of eukaryotic epithelial and endothelial cells by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **324**, 48–55 (2011).
120. Heilbronner, S., Hanses, F., Monk, I. R., Speziale, P. & Foster, T. J. Sortase A promotes virulence in experimental *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Microbiology* **159**, 2141–2152 (2013).
121. F, V. *et al.* Delta-like haemolysin produced by *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**, 65–68 (1991).
122. Vandenesch, F., Projan, S. J., Kreiswirth, B., Etienne, J. & Novick, R. P. Agr-related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 115–122 (1993).
123. Yeh, C.-F. *et al.* Molecular Characteristics of Disease-Causing and Commensal *Staphylococcus lugdunensis* Isolates from 2003 to 2013 at a Tertiary Hospital in Taiwan. *PLOS ONE* **10**, e0134859 (2015).
124. Cheung, G. Y. C., Joo, H.-S., Chatterjee, S. S. & Otto, M. Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 698–719 (2014).
125. Surewaard, B. G. J. *et al.* Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis: *S. aureus* α -PSMs lyse neutrophils from within. *Cell. Microbiol.* **15**, 1427–1437 (2013).
126. Donvito, B. *et al.* Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect. Immun.* **65**, 95–100 (1997).
127. Cassat, J. E. & Skaar, E. P. Iron in Infection and Immunity. *Cell Host Microbe* **13**, 509–519 (2013).
128. Schaible, U. E. & Kaufmann, S. H. E. Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 946–953 (2004).
129. Hammer, N. D. & Skaar, E. P. Molecular Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Iron Acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 129–147 (2011).
130. Haley, K. P., Janson, E. M., Heilbronner, S., Foster, T. J. & Skaar, E. P. *Staphylococcus lugdunensis* IsdG Liberates Iron from Host Heme. *J. Bacteriol.* **193**, 4749–4757 (2011).
131. Zapotoczna, M., Heilbronner, S., Speziale, P. & Foster, T. J. Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *J. Bacteriol.* **194**, 6453–6467 (2012).
132. Farrand, A. J. *et al.* An Iron-Regulated Autolysin Remodels the Cell Wall To Facilitate Heme Acquisition in *Staphylococcus lugdunensis*. *Infect. Immun.* **83**, 3578–3589 (2015).

133. Heilbronner, S. *et al.* Competing for Iron: Duplication and Amplification of the *isd* Locus in *Staphylococcus lugdunensis* HKU09-01 Provides a Competitive Advantage to Overcome Nutritional Limitation. *PLoS Genet.* **12**, e1006246 (2016).
134. Morrissey, J. A., Cockayne, A., Hill, P. J. & Williams, P. Molecular Cloning and Analysis of a Putative Siderophore ABC Transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **68**, 6281–6288 (2000).
135. Beasley, F. C., Marolda, C. L., Cheung, J., Buac, S. & Heinrichs, D. E. *Staphylococcus aureus* Transporters Hts, Sir, and Sst Capture Iron Liberated from Human Transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and Catecholamine Stress Hormones, Respectively, and Contribute to Virulence ∇ . *Infect. Immun.* **79**, 2345–2355 (2011).
136. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol. Spectr.* **6**, (2018).
137. Frank, K. L. & Patel, R. Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infect. Immun.* **75**, 4728–4742 (2007).
138. Argemi, X. *et al.* Kinetics of biofilm formation by *Staphylococcus lugdunensis* strains in bone and joint infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **88**, 298–304 (2017).
139. Frank, K. L., del Pozo, J. L. & Patel, R. From Clinical Microbiology to Infection Pathogenesis: How Daring To Be Different Works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 111–133 (2008).
140. Missineo, A. *et al.* *IsdC* from *Staphylococcus lugdunensis* Induces Biofilm Formation under Low-Iron Growth Conditions. *Infect. Immun.* **82**, 2448–2459 (2014).
141. Hussain, M., Steinbacher, T., Peters, G., Heilmann, C. & Becker, K. The adhesive properties of the *Staphylococcus lugdunensis* multifunctional autolysin AtIL and its role in biofilm formation and internalization. *Int. J. Med. Microbiol.* **305**, 129–139 (2015).
142. Gibert, L. *et al.* The major autolysin of *Staphylococcus lugdunensis*, AtIL, is involved in cell separation, stress-induced autolysis and contributes to bacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **352**, 78–86 (2014).
143. Heilmann, C. Adhesion Mechanisms of Staphylococci. in *Bacterial Adhesion* (eds. Linke, D. & Goldman, A.) vol. 715 105–123 (Springer Netherlands, 2011).
144. Ravaioli, S. *et al.* Various biofilm matrices of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis*: exopolysaccharides, proteins, eDNA and their correlation with biofilm mass. *Biofouling* **36**, 86–100 (2020).
145. Rajendran, N. B. *et al.* Important Contribution of the Novel Locus *comEB* to Extracellular DNA-Dependent *Staphylococcus lugdunensis* Biofilm Formation. *Infect. Immun.* **83**, 4682–4692 (2015).

146. Molloy, E. M., Cotter, P. D., Hill, C., Mitchell, D. A. & Ross, R. P. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 670–681 (2011).
147. Lee, S. W. *et al.* Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5879–5884 (2008).
148. Lu, Y. *et al.* Catalase-Negative *Staphylococcus lugdunensis* Strain with a Novel Point Mutation in the Catalase Gene Isolated from a Patient with Chronic Suppurative Otitis Media. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1310–1312 (2013).
149. Över, U., Tüç, Y. & Söyletir, G. Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare isolate of human infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**, 681–682 (2000).
150. Das, D. & Bishayi, B. Staphylococcal catalase protects intracellularly survived bacteria by destroying H₂O₂ produced by the murine peritoneal macrophages. *Microb. Pathog.* **47**, 57–67 (2009).
151. Cosgrove, K. *et al.* Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**, 1025–1035 (2007).
152. Huseby, M. *et al.* Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**, 8719–8726 (2007).
153. Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T. & Bhakdi, S. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **64**, 2974–2979 (1996).
154. Marshall, M. J., Bohach, G. A. & Boehm, D. F. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J. Nat. Toxins* **9**, 125–138 (2000).
155. Zipperer, A. *et al.* Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535**, 511–516 (2016).
156. Bitschar, K. Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. 14.
157. Bera, A., Biswas, R., Herbert, S. & Götz, F. The Presence of Peptidoglycan O-Acetyltransferase in Various Staphylococcal Species Correlates with Lysozyme Resistance and Pathogenicity. *Infect. Immun.* **74**, 4598–4604 (2006).
158. Masschalck, B. & Michiels, C. W. Antimicrobial Properties of Lysozyme in Relation to Foodborne Vegetative Bacteria. 24.
159. Flanagan, R. S., Watson, D. W., Surewaard, B. G. J., Kubes, P. & Heinrichs, D. E. The surreptitious survival of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis* within macrophages as an immune evasion strategy. *Cell. Microbiol.* **20**, e12869 (2018).

160. Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W. & Kalbacher, H. Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *7*.
161. Peschel, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor Mprf Is Based on Modification of Membrane Lipids with L-Lysine. *J. Exp. Med.* **193**, 1067–1076 (2001).
162. Ayora, S. & Götz, F. Genetic and biochemical properties of an extracellular neutral metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **242**, 421–430 (1994).
163. McDonald, A. G., Boyce, S. & Tipton, K. F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Res.* **37**, D593–D597 (2009).
164. McDonald, A. G., Boyce, S., Moss, G. P., Dixon, H. B. & Tipton, K. F. ExplorEnz: a MySQL database of the IUBMB enzyme nomenclature. *BMC Biochem.* **8**, 14 (2007).
165. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205–218 (1993).
166. Rawlings, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632 (2018).
167. Page, M. J. & Di Cera, E. Evolution of Peptidase Diversity. *J. Biol. Chem.* **283**, 30010–30014 (2008).
168. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597–635 (1998).
169. Nguyen, T. T. H., Myrold, D. D. & Mueller, R. S. Distributions of Extracellular Peptidases Across Prokaryotic Genomes Reflect Phylogeny and Habitat. *Front. Microbiol.* **10**, 413 (2019).
170. Cassandri, M. *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **3**, 17071 (2017).
171. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. (Academic Press, 2012).
172. English, A. C., Done, S. H., Caves, L. S. D., Groom, C. R. & Hubbard, R. E. Locating interaction sites on proteins: The crystal structure of thermolysin soaked in 2% to 100% isopropanol. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **37**, 628–640 (1999).
173. A fundamental catalytic difference between zinc and manganese dependent enzymes revealed in a bacterial isatin hydrolase | Scientific Reports. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31259-y>.

174. Kim, H. & Lipscomb, W. N. X-ray crystallographic determination of the structure of bovine lens leucine aminopeptidase complexed with amastatin: formulation of a catalytic mechanism featuring a gem-diolate transition state. *Biochemistry* **32**, 8465–8478 (1993).
175. Roderick, S. L. & Matthews, B. W. Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme. *Biochemistry* **32**, 3907–3912 (1993).
176. Kinetic and Structural Characterization of Urease Active Site Variants, | *Biochemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi000613o>.
177. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162 (1967).
178. Adekoya, O. A. & Sylte, I. The Thermolysin Family (M4) of Enzymes: Therapeutic and Biotechnological Potential. *Chem. Biol. Drug Des.* **73**, 7–16 (2009).
179. Ligné, T., Pauthe, E., Monti, J.-P., Gacel, G. & Larreta-Garde, V. Additional data about thermolysin specificity in buffer- and glycerol-containing media. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1337**, 143–148 (1997).
180. de Kreij, A., Venema, G. & van den Burg, B. Substrate Specificity in the Highly Heterogeneous M4 Peptidase Family Is Determined by a Small Subset of Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **275**, 31115–31120 (2000).
181. de Kreij, A. *et al.* The effect of changing the hydrophobic S₁' subsite of thermolysin-like proteases on substrate specificity: Mutagenesis of the S₁' subsite of TLP-ste. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4985–4991 (2001).
182. Grøn, H., Meldal, M. & Breddam, K. Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry* **31**, 6011–6018 (1992).
183. Stennicke, H. R., Renatus, M., Meldal, M. & Salvesen, G. S. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *6* (2000).
184. Arolas, J. L., Goulas, T., Cuppari, A. & Gomis-Rüth, F. X. Multiple Architectures and Mechanisms of Latency in Metallopeptidase Zymogens. *Chem. Rev.* **118**, 5581–5597 (2018).
185. Cerdà-Costa, N. & Xavier Gomis-Rüth, F. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains: Metallopeptidase Catalytic Domains. *Protein Sci.* **23**, 123–144 (2014).
186. Gomis-Rüth, F. X., Botelho, T. O. & Bode, W. A standard orientation for metallopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1824**, 157–163 (2012).
187. Pelmeshnikov, V., Blomberg, M. R. & Siegbahn, P. E. A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 284–298 (2002).

188. Kusano, M., Yasukawa, K., Hashida, Y. & Inouye, K. Engineering of the pH-Dependence of Thermolysin Activity as Examined by Site-Directed Mutagenesis of Asn112 Located at the Active Site of Thermolysin. *J. Biochem. (Tokyo)* **139**, 1017–1023 (2006).
189. Kubo, M., Mitsuda, Y., Takagi, M. & Imanaka, T. Alteration of specific activity and stability of thermostable neutral protease by site-directed mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3779–3783 (1992).
190. Marie-Claire, C., Ruffet, E., Tiraboschi, G. & Fournie-Zaluski, M.-C. Differences in transition state stabilization between thermolysin (EC 3.4.24.27) and neprilysin (EC 3.4.24.11). *FEBS Lett.* **438**, 215–219 (1998).
191. Yan, C. & Boyd, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Physiol.* **211**, 19–26 (2007).
192. Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L. & Winberg, J.-O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.* **278**, 28–45 (2011).
193. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 55–71 (2010).
194. Liu, Q., Yeo, W. & Bae, T. The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *Genes* **7**, 81 (2016).
195. Cassat, J. E. *et al.* A Secreted Bacterial Protease Tailors the *Staphylococcus aureus* Virulence Repertoire to Modulate Bone Remodeling during Osteomyelitis. *Cell Host Microbe* **13**, 759–772 (2013).
196. Demidyuk, I. V., Gasanov, E. V., Safina, D. R. & Kostrov, S. V. Structural Organization of Precursors of Thermolysin-like Proteinases. *Protein J.* **27**, 343–354 (2008).
197. Demidyuk, I. V. *et al.* Crystal Structure of the Protealysin Precursor: INSIGHTS INTO PROPEPTIDE FUNCTION. *J. Biol. Chem.* **285**, 2003–2013 (2010).
198. Gao, X. *et al.* Structural basis for the autoprocessing of zinc metalloproteases in the thermolysin family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17569–17574 (2010).
199. Guevara, T., Rodriguez-Banqueri, A., Ksiazek, M., Potempa, J. & Gomis-Rüth, F. X. Structure-based mechanism of cysteine-switch latency and of catalysis by pappalysin-family metallopeptidases. *IUCrJ* **7**, 18–29 (2020).
200. Guevara, T. *et al.* Proenzyme Structure and Activation of Astacin Metallopeptidase. *J. Biol. Chem.* **285**, 13958–13965 (2010).
201. Arolas, J. L. *et al.* Structural basis for the sheddase function of human meprin metalloproteinase at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 16131–16136 (2012).
202. Jozic, D. *et al.* X-ray Structure of Human proMMP-1: NEW INSIGHTS INTO PROCOLLAGENASE ACTIVATION AND COLLAGEN BINDING. *J. Biol. Chem.* **280**, 9578–9585 (2005).

203. Padjasek, M. *et al.* Structural zinc binding sites shaped for greater works: Structure-function relations in classical zinc finger, hook and clasp domains. *J. Inorg. Biochem.* **204**, 110955 (2020).
204. Kocharńczyk, T. *et al.* Metal-coupled folding as the driving force for the extreme stability of Rad50 zinc hook dimer assembly. *Sci. Rep.* **6**, 36346 (2016).
205. Nickerson, N. N., Joag, V. & McGavin, M. J. Rapid autocatalytic activation of the M4 metalloprotease aureolysin is controlled by a conserved N-terminal fungalsin-thermolysin-propeptide domain. *Mol. Microbiol.* **69**, 1530–1543 (2008).
206. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. HOW MATRIX METALLOPROTEINASES REGULATE CELL BEHAVIOR. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516 (2001).
207. Colman, P. M., Jansonius, J. N. & Matthews, B. W. The structure of thermolysin: An electron density map at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **70**, 701–724 (1972).
208. Wu, J.-W. & Chen, X.-L. Extracellular metalloproteases from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 253–262 (2011).
209. Zhou, M.-Y. *et al.* Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Their Extracellular Proteases in the Sediments of the South China Sea. *Microb. Ecol.* **58**, 582–590 (2009).
210. Miyoshi, S. & Shinoda, S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 91–98 (2000).
211. Sikorra, S., Henke, T., Galli, T. & Binz, T. Substrate recognition mechanism of VAMP/synaptobrevin-cleaving clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* **283**, 21145–21152 (2008).
212. Kalandakanond, S. & Coffield, J. A. Cleavage of SNAP-25 by botulinum toxin type A requires receptor-mediated endocytosis, pH-dependent translocation, and zinc. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 980–986 (2001).
213. Goonetilleke, A. & Harris, J. CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, iii35–iii39 (2004).
214. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins Alouf Joseph E., Ladant Daniel, Popoff Michel R. *Librairie Lavoisier* https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/the-comprehensive-sourcebook-of-bacterial-protein-toxins/descriptif_3780873.
215. Schindler, C. A. & Schuardt, V. T. LYSOSTAPHIN: A NEW BACTERIOLYTIC AGENT FOR THE *STAPHYLOCOCCUS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 414–421 (1964).
216. Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G. & Coelho, M. L. V. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals* **3**, 1139–1161 (2010).
217. Saheb, S. A. Purification et caractérisation d'une protéase extracellulaire de *Staphylococcus aureus* inhibée par l'E.D.T.A. *Biochimie* **58**, 793–804 (1976).
218. Laarman, A. J. *et al.* *Staphylococcus aureus* Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. *J. Immunol.* **186**, 6445–6453 (2011).

219. Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J. & Foster, S. J. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **150**, 217–228 (2004).
220. Morihara, K. & Tsuzuki, H. Pseudomonas aeruginosa Elastase: Affinity Chromatography and Some Properties as a Metallo-neutral Proteinase. *Agric. Biol. Chem.* **39**, 1123–1128 (1975).
221. Almagro Armenteros, J. J. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 420–423 (2019).
222. Auclair, S. M., Bhanu, M. K. & Kendall, D. A. Signal peptidase I: Cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **21**, 13–25 (2012).
223. Beckwith, J. The Sec-dependent pathway. *Res. Microbiol.* **164**, 497–504 (2013).
224. Argemi, X. *et al.* Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. *BMC Genomics* **19**, (2018).
225. Shinde, U. & Inouye, M. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 35–44 (2000).
226. Inouye, M. Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme* **45**, 314–321 (1991).
227. Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 442–446 (1993).
228. Ikemura, H., Takagi, H. & Inouye, M. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 7859–7864 (1987).
229. Chen, Y.-J. & Inouye, M. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 765–770 (2008).
230. Laronha, H. & Caldeira, J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* **9**, (2020).
231. Golubkov, V. S. *et al.* Proteolysis of the membrane type-1 matrix metalloproteinase prodomain: implications for a two-step proteolytic processing and activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 36283–36291 (2007).
232. Enghild, J. J., Salvesen, G., Brew, K. & Nagase, H. Interaction of human rheumatoid synovial collagenase (matrix metalloproteinase 1) and stromelysin (matrix metalloproteinase 3) with human alpha 2-macroglobulin and chicken ovostatin. Binding kinetics and identification of matrix metalloproteinase cleavage sites. *J. Biol. Chem.* **264**, 8779–8785 (1989).
233. Sieprawska-Lupa, M. *et al.* Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4673–4679 (2004).
234. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 98–104 (1958).

235. Bernardi, R. C., Cann, I. & Schulten, K. Molecular dynamics study of enhanced Man5B enzymatic activity. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 83 (2014).
236. Veltman, O. R. *et al.* A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases. *Biochemistry* **37**, 5312–5319 (1998).
237. Tajima, M., Urabe, I., Yutani, K. & Okada, H. Role of Calcium Ions in the Thermostability of Thermolysin and *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* Neutral Protease. *Eur. J. Biochem.* **64**, 243–247 (1976).
238. Maffei, B., Francetic, O. & Subtil, A. Tracking Proteins Secreted by Bacteria: What's in the Toolbox? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2017).
239. Monk, I. R., Shah, I. M., Xu, M., Tan, M.-W. & Foster, T. J. Transforming the Untransformable: Application of Direct Transformation To Manipulate Genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* **3**, (2012).
240. Truncated Autoinducing Peptides as Antagonists of *Staphylococcus lugdunensis* Quorum Sensing. - Abstract - Europe PMC. <https://europepmc.org/article/pmc/5234682>.
241. Bae, T. & Schneewind, O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* **55**, 58–63 (2006).
242. Grim, K. P. *et al.* The Metallophore Staphylopine Enables *Staphylococcus aureus* To Compete with the Host for Zinc and Overcome Nutritional Immunity. *mBio* **8**, (2017).
243. Chen, E. I., Li, W., Godzik, A., Howard, E. W. & Smith, J. W. A Residue in the S2 Subsite Controls Substrate Selectivity of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9*. *J. Biol. Chem.* **278**, 17158–17163 (2003).
244. Sørensen, S. B., Bech, L. M., Meldal, M. & Breddam, K. Mutational replacements of the amino acid residues forming the hydrophobic S4 binding pocket of subtilisin 309 from *Bacillus lentus*. *Biochemistry* **32**, 8994–8999 (1993).
245. Rheinhecker, M., Eder, J., Pandey, P. S. & Fersht, A. R. Variants of subtilisin BPN' with altered specificity profiles. *Biochemistry* **33**, 221–225 (1994).
246. Takagi, H., Maeda, T., Ohtsu, I., Tsai, Y. C. & Nakamori, S. Restriction of substrate specificity of subtilisin E by introduction of a side chain into a conserved glycine residue. *FEBS Lett.* **395**, 127–132 (1996).
247. Uppalapati, M. *et al.* A Potent d-Protein Antagonist of VEGF-A is Nonimmunogenic, Metabolically Stable, and Longer-Circulating in Vivo. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1058–1065 (2016).
248. Garton, M. *et al.* Method to generate highly stable D-amino acid analogs of bioactive helical peptides using a mirror image of the entire PDB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 1505–1510 (2018).
249. Liu, M. *et al.* D-peptide inhibitors of the p53–MDM2 interaction for targeted molecular therapy of malignant neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14321–14326 (2010).

250. Khan, M. T. H., Fuskevåg, O.-M. & Sylte, I. Discovery of Potent Thermolysin Inhibitors Using Structure Based Virtual Screening and Binding Assays. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jm8008019> (2008) doi:10.1021/jm8008019.
251. Alberts, B. *et al.* The Extracellular Matrix of Animals. *Mol. Biol. Cell 4th Ed.* (2002).
252. Law, R. H. *et al.* An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* **7**, 216 (2006).

YOU'RE GONNA CARRY THAT WEIGHT.

Kevin PROLA



Caractérisation de la Lugdulysine, une zinc métallopeptidase et facteur de virulence synthétisé par *Staphylococcus lugdunensis*

Résumé

Staphylococcus lugdunensis est un staphylocoque à coagulase négative CoNS présentant des particularités microbiologiques et cliniques singulières. En effet, cette bactérie est impliquée dans des infections sévères particulièrement graves. L'intérêt grandissant pour cette bactérie a permis d'identifier et de caractériser un nombre inhabituel de facteur de virulence pour un CoNS. En ce sens, l'étude clinique VISLISI menée par notre laboratoire, a révélé une corrélation entre l'activité de la Lugdulysine et la survenue d'infections ostéoarticulaires. La Lugdulysine est une zinc métallopeptidase, apparentée à l'Hycolysine, enzyme de référence de la famille M30 et synthétisée par *S. hyicus*. Cependant, cette famille n'est pas réellement caractérisée. Pour ces deux raisons, nous avons décidé d'étudier lors de cette thèse le rôle et les caractéristiques de la Lugdulysine. Ce travail a permis notamment de résoudre les structures de la Lugdulysine et de la Prolugdulysine (mutée). Ces deux éléments structuraux ont permis d'établir un modèle de maturation centré autour d'un « aspartate switch », et d'élucider le mécanisme de latence de cette famille. Ces structures ont également révélé un troisième type de chaperonne intramoléculaire puisque la partie N-terminale du propeptide reste liée tout au long de la vie de la Lugdulysine. Nous avons également caractérisé la spécificité de l'enzyme pour des substrats peptidiques peu structurés avec un motif de clivage pouvant être défini comme trois résidus après un acide aminé hydrophobe. Nous avons pu observer un effet protecteur fort de la Lugdulysine contre le LL37, et d'inhibition du développement du biofilm. Pour finir, nous avons développé des 5 substrats fluorescents permettant l'étude des paramètres cinétiques (k_{cat}/K_m) de l'enzyme.

Abstract

Staphylococcus lugdunensis is a coagulase negative staphylococcus (CoNS) that induces various infections of unusual severity. Growing interest for this bacterium allows the identification of various virulence factors. In regard of these considerations, a prospective clinical study was conducted to identify new potential virulence factors. These authors found a correlation between Lugdulysin and osteoarticular infections. Lugdulysin is a zinc metallopeptidase closely related to Hycolysin, the poorly characterized reference member of the M30 family. First, we solved the first two crystal structure of Lugdulysin and mutated Prolugdulysin. We found that the propeptide contains an inhibitory domain running across the catalytic cleft. Prolugdulysin is matured after the cleavage of two bait regions and the removal of Asp73 residue through an aspartate switch. We characterized a third intramolecular chaperone type, signifying that the N-terminal domain of the propeptide stays noncovalently bound to the catalytic domain after the maturation process. We also found that Lugdulysin only hydrolyzes small peptides and cuts 3 aminoacids after and hydrophobic residue. Lugdulysin has a strong protective effect against LL37 antimicrobial activity and can inhibit biofilm formation. Finally, we designed 5 fluorogenic substrates and determined their specificity constants (k_{cat}/K_m).