

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

## **Analyse fonctionnelle et cinétique de la $\beta$ -lactamase OXA-143 et de son mutant P227S**

Par

**Gabriella Santos Vignoles**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.)  
en microbiologie et biotechnologie

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Eric Déziel  
Institut national de la recherche  
scientifique

Examineur externe

Pascale B. Beauregard  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Nicolas Doucet  
Institut national de la recherche  
scientifique

© Droits réservés de « Gabriella Santos Vignoles », août 2023

## REMERCIEMENTS

---

J'aimerais tout d'abord remercier énormément mon directeur de recherche, Nicolas Doucet, pour l'opportunité qu'il m'a offerte d'apprendre des nouveaux concepts, évoluer professionnellement, et principalement pour le bon soutien qu'il m'a donné durant ces dernières trois années. La maîtrise a été réellement un changement de vie et de route, qui m'a impacté ainsi que les gens de mon entourage. Sans cette opportunité je ne serais jamais venu au Canada. Nick, merci beaucoup, c'était un immense privilège de travailler avec toi.

J'aimerais également remercier Denize Favaro de m'avoir permis de travailler sur ce projet, ainsi que de m'avoir transmis toute son expertise au sujet des oxacilinases. Merci de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire à Campinas au Brésil pour que je puisse y travailler pendant six mois durant la pandémie, avant mon arrivée au Canada. Mes sincères remerciements à tous mes collègues de laboratoire à Unicamp : Yara et Victor Antunes, qui m'ont aussi aidé à débiter ce long parcours.

Je tiens aussi à remercier Myriam Létourneau, qui m'a accueillie de la meilleure façon possible au laboratoire de Nicolas. Merci de m'avoir enseigné une multitude de techniques, ainsi que d'avoir été toujours très ouverte et patiente pour m'écouter et m'expliquer chaque technique.

J'aimerais également remercier Éric Déziel de m'avoir permis d'effectuer une partie de ma maîtrise dans son laboratoire, ainsi que Marie-Christine Groleau, qui m'a enseigné des concepts précieux qui ont enrichi ce projet.

À tous les membres du laboratoire Doucet, merci pour votre aide tout au cours de ma maîtrise, à la fois en présence ou à distance. Particulièrement, Alex Paré pour sa sympathie, son amitié et son support, qui ont été fondamentaux. Aussi, je tiens à remercier à Quynh pour son soutien, elle qui a toujours été très ouverte pour écouter mes doutes et m'encourager pendant mes études. À Hieu, pour sa bonne humeur et son aide à n'importe quel moment, qui me faisait déstresser lorsqu'un essai tournait mal.

À vous, ma famille, je suis éternellement reconnaissante pour tout ce que je suis, pour tout ce que j'ai pu gagner et pour la confiance que j'ai. Sans vous, aucun accomplissement n'aurait été possible. Merci, Mario, mon père, Susi, ma mère, Bia, ma petite sœur, Maria Luiza, ma grand-mère, d'avoir toujours su me supporter. Mamie, merci pour la vie que tu m'as donnée, pour tous tes conseils précieux. Je ne vais jamais oublier ton amour pour moi, c'est tatoué dans mon cœur. Enfin, merci à mes chiennes Pipoca et Nuvem, qui sont mes gardes personnelles. À vous tous, merci pour tous les efforts que vous avez faits pour m'amener jusqu'ici et merci d'avoir été la force motrice derrière cette réalisation.

À mon mari, Rafael, premièrement merci d'avoir cru en moi dès le début. Merci pour être mon meilleur ami et confident, pour ton amour inconditionnel et tes encouragements. Nous avons vécu tant d'années ensemble que ce rêve est aussi devenu ton rêve, et cette réalisation est aussi la tienne. Merci mon amour, pour ta complicité et ta loyauté.

À mes amis également. Après tout, qui sommes-nous sans nos amis ? Vous tous, qui êtes au Brésil, et faites partie de cette conquête, merci pour le soutien, pour l'épaule qui a vu beaucoup de larmes et pour l'encouragement dans tous les moments. À la famille que j'ai faite ici à Montréal : vous m'avez changée. Communauté Nova – Saint Nom, vous m'avez relevé et vous êtes restés à mes côtés dès le premier moment. Nous ne sommes pas liés par le sang, mais par l'amitié et le Saint-Esprit.

Finalement, je tiens aussi à remercier Dieu et Notre-Dame, parce qu'ils sont avec moi, me guidant, m'éclairant, écoutant les prières de ma mère et de ma grand-mère. Ils ne m'ont jamais

laissé seule une seconde, même quand je suis partie toute seule, à 8199 km de ma maison pour accomplir ce rêve.

## RÉSUMÉ

---

La production d'enzymes  $\beta$ -lactamases par les bactéries à Gram-négatif représente un des plus importants mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ces enzymes ont la capacité de dégrader le noyau des antibiotiques de type  $\beta$ -lactamines, i.e. pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames. Les  $\beta$ -lactamases de classe D hydrolysant les carbapénèmes (LDHC) sont des enzymes de type oxacilinasés qui sont actives contre ces antibiotiques de dernier recours. La majorité des oxacilinasés ont été identifiées chez *Acinetobacter baumannii*, un pathogène causant des infections nosocomiales. Parmi les LDHCs, OXA-143 partage avec les autres oxacilinasés un motif catalytique STFK strictement conservé et la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6, qui influence la spécificité de reconnaissance des substrats. Des études récentes ont identifié qu'un mutant P227S dans la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 semble être associé à une activité enzymatique supérieure à l'enzyme native. En revanche, les mécanismes moléculaires et évolutifs qui sous-tendent l'apparition de cette mutation et son effet fonctionnel demeurent inconnus. L'hypothèse formulée est que la réorganisation structurale et/ou dynamique du site actif de OXA-143 pourrait permettre une plus grande efficacité catalytique et/ou une meilleure affinité des substrats chez P227S. L'optimisation de l'expression et de la purification de OXA-143 native et du mutant P227S a été entreprise dans le but de réaliser des études cinétiques et des analyses bactériennes des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en présence de pénicillines, de céphalosporines, de carbapénèmes et de monobactames. Les résultats mettent en lumière l'effet cellulaire et cinétique de cette mutation dans la résistance chez des pathogènes opportunistes comme *A. baumannii*.

Mots-clés :  $\beta$ -lactamases, OXA-143, LDHC, *Acinetobacter baumannii*, carbapénemases, chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC), cinétique enzymatique, concentrations minimales inhibitrices (CMI).



## ABSTRACT

---

The production of  $\beta$ -lactamase enzymes by Gram-negative bacteria is the most important antibiotic resistance mechanism. These enzymes can break down the  $\beta$ -lactam ring of  $\beta$ -lactam antibiotics, i.e., penicillin, cephalosporins, carbapenems and monobactams. Class D  $\beta$ -lactamases hydrolysing carbapenems (CHDL) are oxacilinase enzymes that are active against these last resort antibiotics. The majority of oxacilinases have been identified in *Acinetobacter baumannii*, a pathogen causing nosocomial infections. Among LDHCs, OXA-143 shares with other oxacilinases a strictly preserved STFK catalytic motif and the  $\beta$ 5- $\beta$ 6 loop, which influence the specificity of substrate recognition. Recent studies have identified that a P227S mutant in the  $\beta$ 5- $\beta$ 6 loop appears to be associated with higher enzyme activity than the native enzyme. However, the molecular and evolutionary mechanisms underlying this mutation and its functional effect remain unknown. We hypothesized that a structural and/or dynamic reorganization of the active site of OXA-143 could allow for greater catalytic efficiency and/or better substrate affinity in P227S. Optimization of expression and purification of native OXA-143 and mutant P227S was undertaken to perform kinetic studies and minimum inhibitory concentrations (MIC) assays in the presence of penicillin, cephalosporins, carbapenems and monobactams. Our results highlight the cellular and kinetic effect of this mutation in resistance in opportunistic bacteria such as *Acinetobacter baumannii*.

Keywords :  $\beta$ -lactamases, OXA-143, LDHC, *Acinetobacter baumannii*, carbapenemases, immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), enzyme kinetics, minimum inhibitory concentrations (MIC)



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>I</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 LA PROBLÉMATIQUE DES RÉSISTANCES BACTÉRIENNES AUX ANTIBIOTIQUES.....	- 1 -
1.1.1 <i>La bactérie Acinetobacter baumannii</i> .....	- 2 -
1.2 BRÈVE HISTOIRE DES B-LACTAMINES.....	- 3 -
1.2.1 <i>Le mécanisme d'action des <math>\beta</math>-lactamines</i> .....	- 4 -
1.2.2 <i>Pénicillines</i> .....	- 6 -
1.2.3 <i>Céphalosporines</i> .....	- 7 -
1.2.4 <i>Carbapénèmes</i> .....	- 8 -
1.2.5 <i>Monobactames</i> .....	- 9 -
1.3 BRÈVE HISTOIRE DES B-LACTAMASES.....	- 9 -
1.3.1 <i>Le mécanisme général d'action des sérine – <math>\beta</math> – lactamases</i> .....	- 10 -
1.3.2 <i><math>\beta</math>-lactamases de Classe D</i> .....	- 11 -
1.3.3 <i>Le mécanisme d'action des <math>\beta</math>-lactamase de classe D</i> .....	- 13 -
1.4 OXA-143 .....	- 15 -
1.4.1 <i>Les variantes de l'OXA-143</i> .....	- 17 -
1.5 LE MUTANT P227S DE L'OXA-143 .....	- 17 -
1.6 HYPOTHÈSE .....	- 19 -
1.7 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....	- 20 -
1.7.1 <i>Objectif Général</i> .....	- 20 -
1.7.2 <i>Objectifs Spécifiques</i> .....	- 20 -
<b>2 MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>21</b>
2.1 EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTÉINES.....	21
2.1.1 <i>Cellules compétentes (CaCl<sub>2</sub>)</i> .....	22
2.1.2 <i>Protocole d'extraction plasmidique</i> .....	22
2.1.3 <i>Transformation bactérienne par choc thermique</i> .....	23
2.1.4 <i>Optimisation de l'expression recombinante des oxacilinasés d'intérêt</i> .....	24
2.1.5 <i>Purification par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) de type Nickel-NTA</i> .....	24

2.1.6	<i>Dichroïsme Circulaire (CD) – Essai de dénaturation thermique</i> .....	25
2.1.7	<i>Électrophorèse par SDS-PAGE</i> .....	25
2.2	ESSAIS DE CINÉTIQUE ENZYMATIQUE .....	26
2.3	TESTS DE SUSCEPTIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES .....	26
2.4	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS EN UTILISANT LA RÉSAZURINE .....	28
2.4.1	<i>Analyse sur Image J</i> .....	29
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>31</b>
3.1	OPTIMISATION DE L'EXPRESSION ET PURIFICATION DES B-LACTAMASES D'INTÉRÊT.....	31
3.1.1	<i>Optimisation des tampons utilisés dans la purification par dichroïsme circulaire</i> ..	31
3.1.2	<i>Purification par chromatographie IMAC et vérification sur gels SDS-PAGE 4-20%</i>	33
3.2	CINÉTIQUE ENZYMATIQUE AVEC LA PÉNICILLINE G .....	35
3.3	TESTS DE SUSCEPTIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES .....	43
3.3.1	<i>Calculs des concentrations minimales inhibitrices</i> .....	43
3.3.2	<i>Ampicilline (AMP)</i> .....	46
3.3.3	<i>Aztréonam (AZT)</i> .....	46
3.3.4	<i>Ceftazidime (CTZ)</i> .....	46
3.3.5	<i>Méropénem (MER)</i> .....	47
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>48</b>
4.1	UTILISATION DE LA SOUCHE <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21 (DE3) .....	48
4.2	INTERPRÉTATION DE L'ANALYSE DE CINÉTIQUE ENZYMATIQUE POUR LES ENZYMES OXA-143 ET P227S .....	49
4.3	ANALYSE COMPARATIVE DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI).....	51
4.3.1	<i>Analyse des résultats de concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ampicilline</i>	53
4.3.2	<i>Analyse des résultats de concentrations minimales (CMI) inhibitrices de l'aztréonam.</i>	53
4.3.3	<i>Analyse des résultats de concentrations minimales (CMI) inhibitrices de la ceftazidime</i>	54
4.3.4	<i>Analyse des résultats de concentrations minimales inhibitrices (CMI) du méropénem</i>	55
4.3.5	<i>L'influence de la présence de l'IPTG sur les résultats de CMI</i> .....	56
<b>5</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXE</b> .....	<b>73</b>

# LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1.1: STRUCTURE DE LA PÉNICILLINE G.....	- 3 -
FIGURE 1.2: LE MÉCANISME D'ACTION DES B-LACTAMINES À PARTIR DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE PRÉSENT À LA PAROI DES BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF, COMME <i>A. BAUMANII</i> .....	- 5 -
FIGURE 1.3 : STRUCTURE GÉNÉRALE DE LA FAMILLE DES PÉNICILLINES.....	- 6 -
FIGURE 1.4 : STRUCTURE GÉNÉRALE DES CÉPHALOSPORINES.....	- 7 -
FIGURE 1.5 : STRUCTURE GÉNÉRALE DES CARBAPÉNÈMES.....	- 8 -
FIGURE 1.6 : STRUCTURE GÉNÉRALE DES MONOBACTAMES.....	- 9 -
FIGURE 1.7 : SUPERPOSITION DES STRUCTURES DES OXA- $\beta$ -LACTAMASES.....	- 12 -
FIGURE 1.8: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU MÉCANISME CATALYTIQUE DE L'OXA-143 ENVERS LE SUBSTRAT PÉNICILLINE G.....	- 15 -
FIGURE 1.9: STRUCTURE DE L'OXA-143.....	- 16 -
FIGURE 1.10: REPRÉSENTATION STRUCTURELLE DE LA SUBSTITUTION D'UNE PROLINE PAR UNE SÉRINE À LA POSITION 227 CHEZ L'OXA-143.....	- 18 -
FIGURE 1.11: STRUCTURE DU MUTANT P227S DE L'OXA-143.....	- 19 -
FIGURE 2.1: CARTOGRAPHIE DU VECTEUR D'EXPRESSION PET28A UTILISÉ POUR LA PRODUCTION DES DEUX BÊTA-LACTAMASES D'INTÉRÊT.....	21
FIGURE 2.3: EXEMPLE DE PLAQUE DE 96 PUIITS UTILISÉ POUR EFFECTUER LES TESTS DE SUSCEPTIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES.....	27
FIGURE 2.4: RÉACTION DE REDOX DE LA RÉSAZURINE DE COULEUR BLEU SE TRANSFORMANT EN RÉSORUFINE DE COULEUR ROSE (FLUORESCENTE) EN PRÉSENCE DE BACTÉRIES MÉTABOLIQUEMENT ACTIVES...	29
FIGURE 3.1: ESSAI DE DÉNATURATION THERMIQUE PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE (DC) DU MUTANT P227S.....	32
FIGURE 3.2: COLONNE HIS-TRAP <sup>TM</sup> HP DE 5 ML UTILISÉE POUR TOUTES LES PURIFICATIONS DE L'OXA-143 ET DE SON MUTANT P227S.....	33
FIGURE 3.3: ANALYSE SUR GEL SDS-PAGE DES FRACTIONS RÉCOLTÉES À LA SUITE DE LA PURIFICATION DE L'OXA-143.....	34
FIGURE 3.4 : ANALYSE SUR GEL DE SDS-PAGE DES FRACTIONS RÉCOLTÉES À LA SUITE DE LA PURIFICATION DU MUTANT P227S.....	35
FIGURE 3.5: EXEMPLE D'HYPERBOLE OBTENUE PAR L'ÉQUATION DE MICHAELIS-MENTEN.....	37

FIGURE 3.6: CINÉTIQUE DE LA DÉGRADATION DE LA PÉNICILLINE G PAR L'ENZYME OXA-143. ....	38
FIGURE 3.7: EXEMPLE D'ANALYSE POUR LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE DE L'OXA-143 (40 nM) AVEC LA PÉNICILLINE G À 500 $\mu$ M. ....	39
FIGURE 3.8: COURBES DE MICHAELIS-MENTEN PRODUITES À PARTIR DES VALEURS CALCULÉES DE VITESSES INITIALES ( $\mu$ M/MIN) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SUBSTRAT [S] ( $\mu$ M).....	42
FIGURE 3.9: PLAQUES DE CMI DE L'ESSAI 1 POUR OXA-143 NATIVE.....	44
FIGURE 3.10: PLAQUES DE CMI DE L'ESSAI 1 POUR LE MUTANT P227S.....	44

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 2.1: VALEURS DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) EN MG/ML, PUBLIÉES POUR <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) ET <i>E. COLI</i> DH10B PORTANT DES B-LACTAMASES : OXA-143, OXA-24/40 ET OXA-160.	27
TABLEAU 3.1: VITESSES D'HYDROLYSE INITIALES CALCULÉES POUR L'OXA-143 POUR CHAQUE CONCENTRATION TESTÉE DE PÉNICILLINE G.	40
TABLEAU 3.2: VITESSES D'HYDROLYSE INITIALES CALCULÉES POUR LE MUTANT P227S POUR CHAQUE CONCENTRATION TESTÉE DE PÉNICILLINE G.	41
TABLEAU 3.3 : PARAMÈTRES DE CINÉTIQUE ENZYMATIQUE DE L'OXA-143 ET P227S ENVERS LA PÉNICILLINE G.	43
TABLEAU 3.4: CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) DE DIVERS SUBSTRATS B-LACTAMINES CALCULÉES POUR LA B-LACTAMASE OXA-143 CHEZ <i>E. COLI</i> BL21 (DE3).	45
TABLEAU 3.5: CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) DE DIVERS SUBSTRAT B-LACTAMINES CALCULÉES POUR LA B-LACTAMASE P227S CHEZ <i>E. COLI</i> BL21 (DE3).	45
TABLEAU 4.1 : PARAMÈTRES DE CINÉTIQUE ENZYMATIQUE DE L'OXA-143 ET P227S CONTRE LA PÉNICILLINE G.	49
TABLEAU 4.2: CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) EXPÉRIMENTALES CALCULÉES POUR LES B-LACTAMASES OXA-143 ET P227S CHEZ <i>E. COLI</i> BL21(DE3) COMPARÉES AUX VALEURS UTILISÉES COMME RÉFÉRENCE DANS LA LITTÉRATURE CALCULÉE POUR L'OXA-143 CHEZ <i>E. COLI</i> BL21(DE3) ET POUR LES OXA-24/40 ET 160 CHEZ <i>E. COLI</i> DH10B.	52



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

D-Ala-D-Ala	D-alanyl-D-alanine
AMP	<i>Ampicilline</i>
AZT	<i>Aztréonam</i>
7-ACA	Acide 7-aminocéphalo-acétique
CMI	<i>Concentration Minimale Inhibitrice</i>
CRAB	<i>Bactéries Acinetobacter baumannii résistantes aux carbapénèmes</i>
CTZ	<i>Ceftazidime</i>
ESBLs	<i>β-lactamase à large spectre de reconnaissance</i>
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
LHDC	β-lactamases de classe D hydrolysant les carbapénèmes
MER	<i>Méropénem</i>
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
NAG	<i>N-acétylglucosamine</i>
NAM	<i>N-acétylmuramique</i>
OXA	<i>Oxacilinase</i>
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
P227S	<i>Mutant de l'OXA-143 (Proline 227 → Sérine)</i>

UDP-NAG

*uridine diphosphate N-acétylglucosamine*

UDP-NAM

*uridine diphosphate acide N-acétylmuramique*



# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 La problématique des résistances bactériennes aux antibiotiques

Les bactéries sont des organismes procaryotes, dont certaines peuvent être avantageuses ou néfastes pour l'humain. Les antibiotiques sont les armes utilisées pour lutter contre les bactéries. Parmi les antibiotiques, il existe ceux qui possèdent un large spectre d'activité et ceux qui sont spécifiques à certaines bactéries (Williamson et Gutmann, 1987; Cavallo et al., 2004a; Sridhar Rao, 2012).

Depuis quelques années, le monde assiste à l'aggravation d'un phénomène particulier appelé la résistance aux antibiotiques. Ce phénomène a été observé par la communauté scientifique à la suite de la mise en circulation d'antibiotiques en milieu clinique, se manifestant par des signes de résistance comme la perte d'efficacité observée lors de traitements avec des doses supérieures à celles recommandées, ce qui pose de graves problèmes de santé publique au niveau mondial (Christensen, 2021). Or, comment peut-on expliquer ce phénomène de résistance aux antibiotiques ?

Les organismes procaryotes comme les bactéries se reproduisent par division cellulaire. Cependant, lors de la réplication de l'ADN, des mutations peuvent être engendrées, ce qui cause l'apparition de cellules génétiquement modifiées capables de posséder des traits physiologiques potentiellement avantageux. Par conséquent, lorsqu'un antibiotique agit sur cette population bactérienne, la pression sélective, dérivée du principe connu de la sélection naturelle, causera l'élimination des représentants qui ne résistent pas, par exemple ceux qui ne contiennent pas la mutation bénéfique. À partir de ce moment, ces traits génétiques seront transmis à la prochaine génération et ce cycle se répètera plusieurs fois jusqu'au moment où l'antibiotique n'aura plus aucun effet sur cette population (Fernandes, Amador et Prudêncio, 2012; Christensen, 2021).

Ainsi donc, l'usage des antibiotiques peut conduire à l'avènement des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, ce qui mène à l'accroissement des infections chez l'être humain. À titre d'exemple, les infections nosocomiales acquises dans des secteurs de soins peuvent notamment être causées par ces bactéries : *Clostridioides difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, entre autres (Kyriakidis et al. 2021; Girija, Priyadharsini, et Paramasivam, 2020).

### 1.1.1 La bactérie *Acinetobacter baumannii*

La bactérie *Acinetobacter baumannii* est un coccobacille à Gram-négatif, non fermentaire, aérobic. Elle peut coloniser la peau et peut être isolée des sécrétions oropharyngées de personnes infectées. Elle cause diverses infections nosocomiales, notamment des pneumonies, des septicémies, et des méningites (Howard et al., 2012). Ce pathogène opportuniste a une incidence élevée chez les personnes immunosupprimées, en particulier celles qui font un séjour prolongé à l'hôpital, ainsi que chez les gens âgés (Howard et al., 2012; AlAmri et al., 2019).

Ces dernières années, cette bactérie a été désignée comme un agent pathogène en « alerte rouge » par l'OMS, générant de l'inquiétude chez la communauté médicale. Ceci découle en grande partie du niveau en croissance de sa résistance aux antibiotiques, principalement, en ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines de type carbapénèmes (Dijkshoorn, Nemec et Seifert, 2007; Kyriakidis et al., 2021).

Les carbapénèmes continuent à être les agents principaux choisis pour le traitement contre *A. baumannii*, malgré qu'une croissance constante de bactéries résistantes aux carbapénèmes (CRAB) aient été observées ces dernières années. Les trois mécanismes principaux de résistances aux  $\beta$ -lactames observés chez cette bactérie sont les suivants (Kyriakidis et al., 2021) :

- 1) Augmentation de l'activité des pompes à efflux ou réduction de la perméabilité de la membrane
- 2) Modification des protéines de liaisons des pénicillines (*Penicilin Binding Proteins*, PBPs) ou réduction de la pénétration des antibiotiques à travers des porines
- 3) Inactivation de l'antibiotique par l'action des  $\beta$ -lactamases

La bactérie *A. baumannii* possède comme arme principale une importante plasticité génétique, une capacité intrinsèque de promouvoir avec facilité des nombreuses mutations dans ses éléments géniques, ainsi que la capacité d'acquérir des gènes de résistance codant pour des  $\beta$ -lactamases (Lemos et al., 2014; Kyriakidis et al., 2021).

## 1.2 Brève histoire des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont un groupe d'antibiotiques qui se définit par la présence d'un noyau  $\beta$ -lactame. Cette classe d'antibiotiques est de grande importance en raison de son excellente efficacité thérapeutique et de sa faible toxicité (Scheffers et Pinho, 2005). En 1928, la pénicilline G (ou benzylpénicilline, Figure 1.1) a été découverte par Alexander Fleming, se présentant comme la plus grande arme bactériologique jamais découverte pour le traitement des maladies infectieuses (Bush et Bradford, 2016).

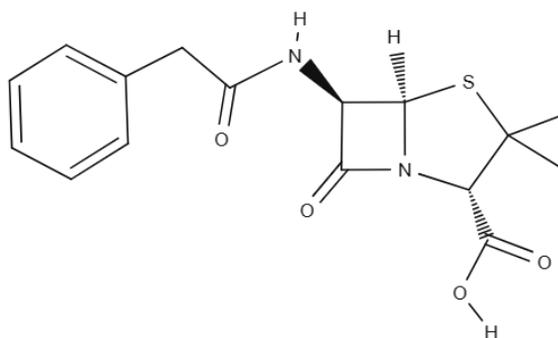


Figure 1.1: Structure de la Pénicilline G.

Référence : PubChem, 2004.

Après cette découverte, de nombreuses molécules d'antibiotiques appartenant à d'autres familles chimiques ont été découvertes, comme la streptomycine (1944) provenant des colonies de *Streptomyces griseus*, le chloramphénicol (1947) extrait des colonies de *Streptomyces venezuelae*, la vancomycine (1956) et la gentamycine (1963), entre autres. Cependant, le développement de nouvelles molécules a été rendu possible grâce à l'évolution des techniques de synthèse chimique et des procédés de fermentation (Cavallo et al., 2004).

L'acquisition de résistance à ces molécules par les bactéries a stimulé la recherche de nouvelles  $\beta$ -lactamines dans le domaine pharmaceutique, conduisant à l'apparition de céphalosporines de troisième génération (céfotaxime en 1981), de carbapénèmes (imipénem en 1985) et de monobactames (aztréonam en 1986) (Cavallo et al., 2004a; Fernandes, Amador et Prudêncio, 2012; Bush et Bradford, 2016).

En même temps, de nouvelles pénicillines ont été produites (notamment les uréidopénicillines), alors que la médecine a commencé à utiliser les associations d'antibiotiques  $\beta$ -lactamines avec des inhibiteurs de bêta-lactamases, tels que les combinaisons de l'amoxicilline avec l'acide clavulanique (1984) et l'ampicilline avec le sulbactam (1985) (Cavallo et al., 2004; Aminov, 2010).

### 1.2.1 Le mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

Les antibiotiques  $\beta$ -lactamines inhibent la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, qui est principalement composée de polymères de peptidoglycane. Ce polymère est constitué de sucres alternés de *N*-acétylglucosamine (NAG) et d'acide *N*-acétylmuramique (NAM) (Bush, 2018b). La synthèse se déroule en trois phases (Figure 1.2). La première phase se produit dans le cytoplasme, où se forment des précurseurs essentiels à la formation du peptidoglycane : la synthèse de l'uridine diphosphate acide *N*-acétylmuramique (UDP-NAM) et de l'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (UDP-NAG) (Poole, 2004; Tooke et al., 2019).

Dans la deuxième phase, ces précurseurs sont transportés vers la membrane cytoplasmique. Les nucléotides d'uridine sont libérés et le NAG est lié au NAM (Bush, 2018a). Pendant la troisième phase se produit l'arrêt de la formation du polymère de peptidoglycane. Chaque NAM est lié à un petit peptide, qui diffère entre les espèces bactériennes. Ce peptide se lie à un autre peptide par un « pont » d'acides aminés, cette réaction étant catalysée par la transpeptidase PBP. Pour la formation du peptidoglycane, les activités des carboxypeptidases et transpeptidases des PBPs sont nécessaires, étant donné qu'elles présentent comme substrat la D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) (Bush, 2018). Le noyau  $\beta$ -lactame présente une affinité élevée pour les PBP et forme une liaison covalente, ne permettant pas la liaison avec le substrat D-Ala-D-Ala. Par conséquent, cette inhibition des PBP ne permet plus la formation du peptidoglycane et mène à la mort cellulaire (Bush, 2018; Tooke et al., 2019).

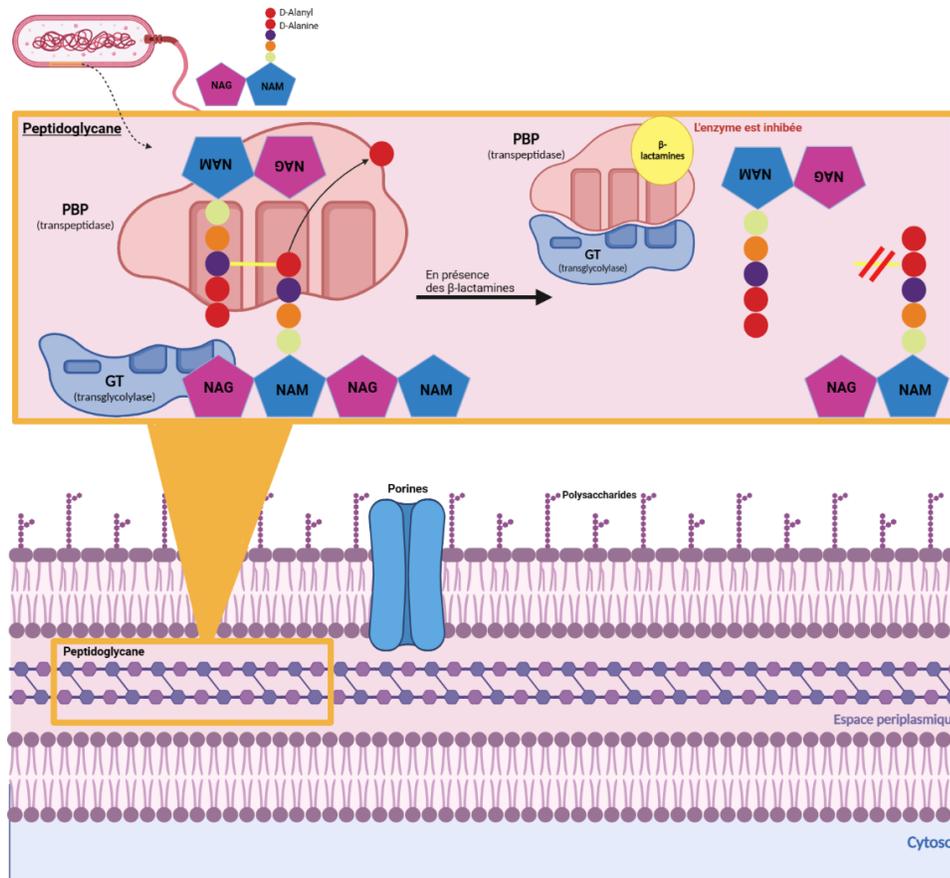


Figure 1.2: Le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines à partir de la synthèse du peptidoglycane présent à la paroi des bactéries à Gram négatif, comme *A. baumannii*.

Figure construite à l'aide de BioRender.

Le noyau  $\beta$ -lactame détermine le mécanisme d'action de l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Figure 1.2). Les molécules de ce groupe se lient aux PBPs, qui sont des enzymes impliquées dans la synthèse et le remodelage de la paroi cellulaire peptidoglycane de bactéries (Suárez et Gudiol, 2009). Dès que ce lien est établi, un blocage se produit de façon permanente sur la réticulation des monomères peptidoglycanes dans la paroi cellulaire bactérienne, entraînant la mort cellulaire. Par conséquent, pour survivre, les bactéries ont évolué des mécanismes pour se défendre contre les  $\beta$ -lactamines (Vollmer, Blanot, et De Pedro, 2008). Le noyau  $\beta$ -lactame est constitué de 3 atomes de carbone et un d'azote pouvant contenir plusieurs radicaux substituants qui le rendent actif.

La famille des composés  $\beta$ -lactames n'est pas homogène. Autrement dit, sa chimie n'est pas la même et peut contenir différents types de chaînes, différenciant ainsi leurs caractéristiques, leurs spectres d'action et la résistance conférée par les  $\beta$ -lactamases. Ainsi, la famille des  $\beta$ -lactamines est formée de carbapénèmes, de pénicillines, de céphalosporines et de monobactames (Williamson et Gutmann, 1987; Suárez et Gudiol, 2009).

### 1.2.2 Pénicillines

La pénicilline a été le premier vrai antibiotique à être mis au point et utilisé en clinique (Figure 1.3). Les premières pénicillines utilisées dans la pratique médicale ont été isolées du champignon du genre *Penicillium* et sont appelées pénicilline G cristalline, pénicilline G procaïne et pénicilline G benzidine. Ces pénicillines sont également appelées benzylpénicillines. Appartenant également à ce groupe, la pénicilline V est utilisée par voie orale en raison de sa résistance à l'action de l'acide gastrique (Ratnaningsih et Achmad, 2008).

Les autres pénicillines sont inactivées par la sécrétion gastrique et sont donc d'utilisation parentérale (Rollinson, 1998). De la structure de base des pénicillines naturelles, de nouveaux antibiotiques ont été synthétisés, constituant les pénicillines semi-synthétiques ou synthétiques. Cette évolution est née du besoin d'antibiotiques résistant à l'action enzymatique des  $\beta$ -lactamases bactériennes, des enzymes qui clivent aisément le noyau  $\beta$ -lactame des pénicillines, en plus du besoin grandissant de spectre d'action contre les bactéries à Gram négatif (Bush et Bradford, 2016; Christensen, 2021).

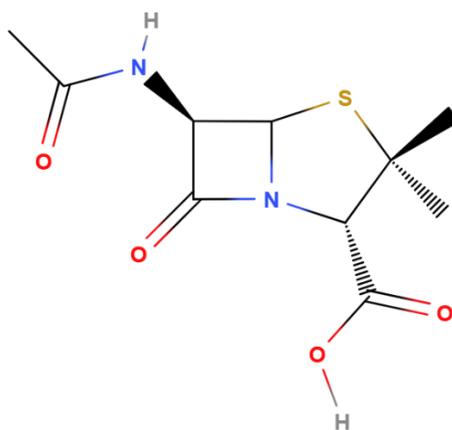


Figure 1.3 : Structure générale de la famille des pénicillines.

Référence : PubChem, 2004.

### 1.2.3 Céphalosporines

Le groupe des céphalosporines est vaste et est divisé en cinq générations, en fonction du spectre d'activité qu'elles présentent (Figure 1.4). Les céphalosporines à large spectre sont utilisées en cas d'infections graves aux bactéries à Gram-négatif. Lorsque les bactéries sont résistantes à ceux-ci, la sous-classe des carbapénèmes est la seule option de traitement parmi la classe des  $\beta$ -lactamines (CDC, 2013). Les céphalosporines ressemblent chimiquement aux pénicillines, présentant l'acide 7-aminocéphalo-acétique (7-ACA) comme noyau central. Cette substance est constituée de deux noyaux, l'un étant le noyau  $\beta$ -lactame et l'autre la dihydrothiazine. Toutes les céphalosporines en usage clinique sont des dérivées semi-synthétiques du 7-ACA, qui a été initialement obtenu à partir d'un antibiotique naturel, la céphalosporine C, issue de l'espèce de champignon *Cephalosporium acremonium* (aujourd'hui *Acremonium chrysogenum*) (Antunez et al., 2006).

En fonction des groupes chimiques ajoutés et du spectre d'action qu'ils possèdent, les céphalosporines peuvent être regroupées en 5 groupes, appelés 1<sup>re</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> génération (Antunez et al., 2006).

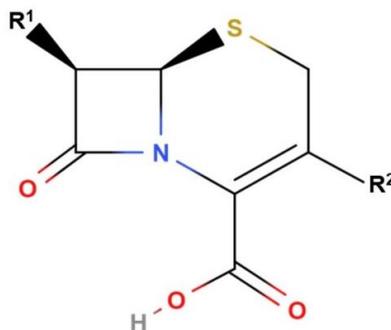


Figure 1.4 : Structure générale des céphalosporines.

Référence : PubChem, 2004.

### 1.2.4 Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont considérés comme la thérapie de dernière ligne contre de nombreuses infections causées par des bactéries à Gram négatif (Figure 1.5). Les deux antibiotiques de type carbapénèmes imipénem et méropénem ont un large spectre d'action *in vitro*, avec une activité contre les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et anaérobies, à l'exception de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM, de l'anglais « *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ») et *Enterococcus faecium* (Mohr, 2008). Quant à l'ertapénème, ce médicament possède un spectre d'action plus limité, ne pouvant pas agir contre les bacilles à Gram négatif non-fermenteurs (Fernandes, Amador et Prudêncio, 2012).

Finalement, le doripénem est le plus récent des antibiotiques de type carbapénème, combinant les spectres d'action de l'imipénem et du méropénem et possédant une activité plus puissante contre *Pseudomonas aeruginosa* (Song et al. 2019).

Les antibiotiques du groupe des carbapénèmes ont été considérés comme une thérapie de choix en raison de leur large spectre d'action, de leur stabilité et du fait qu'ils sont des médicaments bien tolérés par les patients avec peu d'effets secondaires. Cependant, au cours des dernières années, les indices de résistance contre ces composés ont considérablement augmenté, notamment en ce qui a trait à la réponse adaptative des bactéries via l'émergence de carbapénémases causée par l'utilisation indiscriminée de ces antibiotiques (Fripiat et al., 2013).

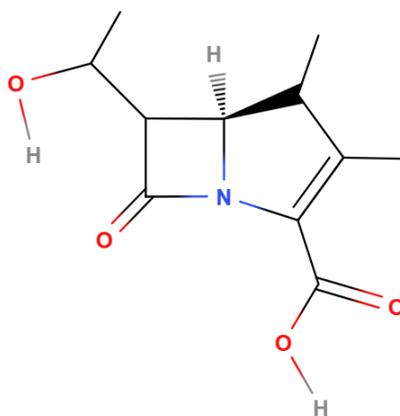


Figure 1.5 : Structure générale des carbapénèmes.

Référence : Cavallo *et al*, 2004.

### 1.2.5 Monobactames

Le terme « monobactame » est utilisé pour décrire les antibiotiques qui possèdent un noyau  $\beta$ -lactame monocyclique par opposition aux structures à deux noyaux des pénicillines, des céphalosporines et des carbapénèmes (Sykes et Bonner, 1985) (Figure 1.6). Les monobactames naturels n'ont pas une activité antibactérienne élevée et n'ont aucune activité contre les microorganismes Gram-positifs ou anaérobies stricts. Parmi les quelques composés de ce groupe, le seul commercialisé est l'aztréonam. L'aztréonam est un monobactame entièrement synthétique qui combine certaines des caractéristiques utiles des autres antibiotiques  $\beta$ -lactamines. Par exemple, l'une des chaînes latérales de l'aztréonam intègre le groupe aminotazole, qui améliore considérablement la couverture contre les bactéries aérobies à Gram-négatif comme à celle des céphalosporines de troisième génération (e.g. la ceftazidime) (Sykes et Bonner, 1985).

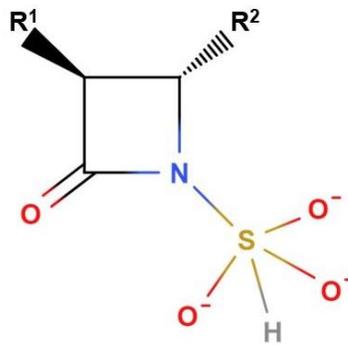


Figure 1.6 : Structure générale des monobactames.

Référence : Cavallo *et al*, 2004.

### 1.3 Brève histoire des $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamines sont le groupe d'antibiotiques les plus utilisés au monde comme traitement des infections causées par les bactéries (Bush, 2018b). En raison de l'exposition continue aux  $\beta$ -lactamines, les souches bactériennes ont provoqué une augmentation dans la production et l'apparition des différentes  $\beta$ -lactamases, enzymes capables de dégrader les  $\beta$ -lactamines. La majorité des  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser des  $\beta$ -lactamines de dernière

génération sont codées sur des éléments mobiles plutôt que directement sur les génomes, ce qui est l'une des raisons pour lesquelles la résistance aux antibiotiques peut se propager rapidement d'une souche bactérienne à l'autre. Comme par exemple, la famille des  $\beta$ -lactamases SHV de *Klebsiella pneumoniae* et AmpC de *Pseudomonas aeruginosa* (Yoon et Jeong, 2021a).

Parmi les bacilles à Gram négatif, notamment chez la bactérie *A. baumannii*, la résistance aux  $\beta$ -lactamines conférée par la production de  $\beta$ -lactamases est l'un des plus grands problèmes de santé au niveau mondial (Zander et al., 2014). À partir de la classification d'Amblar, ces enzymes sont classées en 4 groupes selon leurs similarités de séquence d'acides aminés. Les groupes A, C et D sont les  $\beta$ -lactamases qui utilisent un résidu sérine au site actif pour l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines, tandis que le groupe B rassemble toutes les métallo- $\beta$ -lactamases (Hall et Barlow, 2005).

### 1.3.1 Le mécanisme général d'action des sérine – $\beta$ – lactamases

Les sérine  $\beta$ -lactamases (SBLs) ont des séquences très hétérogènes, mais un mécanisme catalytique similaire pour l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines. Premièrement, se produit l'étape d'acylation où a lieu une attaque nucléophile au carbone carbonyle à partir du résidu sérine (nucléophile). Cette attaque engendre la formation d'une liaison covalente entre la sérine et le substrat, un intermédiaire appelé acyl-enzyme. Ensuite, se déroule l'étape de désacylation qui consiste à hydrolyser l'intermédiaire stable acyl-enzyme à partir de la rupture du lien ester. Survient alors le relâchement du substrat hydrolysé (biologiquement inactif) et la régénération de l'enzyme libre (Drawz et Bonomo, 2010; De Luca et al., 2011; Tooke et al., 2019).

Les étapes d'acylation et de désacylation sont seulement rendues possibles grâce à la présence d'une base générale. L'objectif de la base générale vise à déprotoner la sérine catalytique pour qu'elle puisse agir comme résidu nucléophile apte à attaquer le carbonyle et ouvrir le noyau  $\beta$ -lactame (Tooke et al., 2019b). La principale différence parmi les classes de SBLs réside en la nature de l'acide aminé que constitue cette base générale. Pour les SBLs de classe A, l'acide glutamique agit typiquement comme la base générale activant la sérine catalytique, comme par exemple Glu166 dans le mécanisme catalytique de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 (Brown et al. 2009; Vandavasi et al., 2017). Pour les SBLs de classe C, le résidu Tyr150 chez AmpC est un des exemples de base générale jouant ce rôle (Chen et al., 2006).

### 1.3.2 $\beta$ -lactamases de Classe D

Les SBLs de classe D ont une catalyse très similaire aux sérine protéases, toutes deux étant considérées des hydrolases utilisant la sérine comme résidu catalytique. Ces enzymes partagent des motifs conservés (Figure 1.7) (Drawz et Bonomo, 2010; Leonard, Bonomo et Powers, 2013; Yoon et Jeong, 2021).

Le premier motif conservé en commun avec les classes A et C est le site actif : Ser70 – X – Lys73 (He et al. 2020; Lamotte-Brasseur et al. 1994). Ce motif a toujours comme premier élément la sérine catalytique, ensuite deux résidus variables et enfin un résidu lysine invariable. Ensuite, les motifs Phe/Tyr144-Gly145-Asn146 et Lys216-Thr/Ser217-Gly218 se perpétuent comme des séquences de motifs hautement conservés entre toutes les SBLs. Parmi les SBLs de classe D, d'autres motifs sont considérés importants, comme Ser118-X-Val/Ile120, lié au relâchement du produit (Lamotte-Brasseur et al., 1994; Queenan et Bush, 2007; Jeon et al., 2015).

D'autres éléments structuraux demeurent également importants chez les  $\beta$ -lactamases de classe D, comme la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6. Cet élément structurel est utilisé comme évidence expérimentale pour justifier l'apparition des  $\beta$ -lactamases de classe D hydrolysant les carbapénèmes (LDHC). En effet, cette boucle est associée avec l'évolution de l'activité catalytique contre les carbapénèmes en raison de la relation entre ses résidus et la modulation de la spécificité par laquelle le substrat est reconnu (De Luca et al., 2011; Kaitany et al., 2013).

Le dernier élément qui doit être noté par rapport la structure d'une  $\beta$ -lactamase de classe D est le fait exceptionnel de la lysine carboxylée, qui agit comme une base générale lors de la réaction catalytique (Che et al., 2014; Stojanoski et al., 2016).

Il est pertinent d'évaluer les distinctions qui permettent de catégoriser les SBLs de classe D. Dans un premier temps, la classe D a été identifiée comme des « oxacilinasés » grâce à leur capacité d'hydrolyser l'oxacilline plus rapidement que la benzylpénicilline. Actuellement, il existe plus de 250 enzymes de classe D déjà décrites, qui proviennent en majorité de bactéries à Gram-négatif, comme *P. aeruginosa* (ex. : OXA-10), *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, et *Acinetobacter* spp. (ex. : OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA -58) (Leonard, Bonomo, et Powers, 2013). Cette classe de SBLs possède un profil catalytique divers, reconnaissant les pénicillines (ex. :

ampicilline), céphalosporines (ex. : céfotaxime, ceftazidime et céfépime) et carbapénèmes (Tooke et al., 2019).

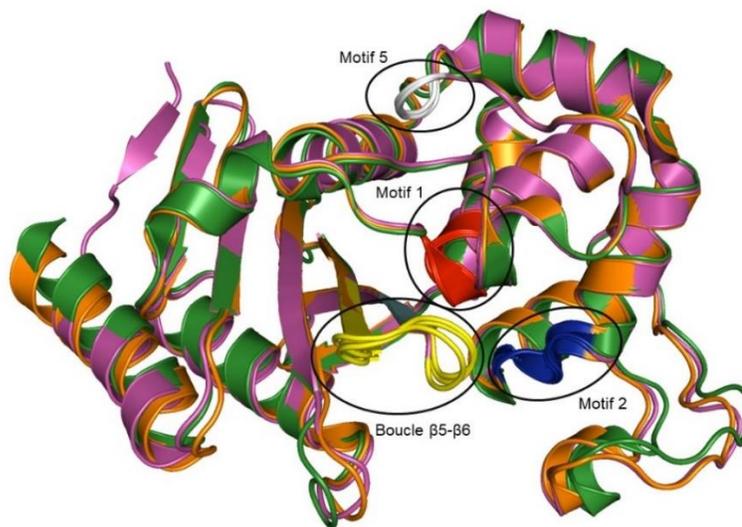


Figure 1.7 : Superposition des structures des OXA-β-lactamases.

OXA-143 (vert), OXA-23 (rose) et OXA-24-40 (orange). La zone rouge correspond au motif 1 : Pro-Ser-Thr-Phe-Lys (PASTFK). La zone bleue correspond au motif 2 : Ser-Ala-Val. La zone blanche correspond au motif 5 : Phe-Gly-Asn. La boucle β5-β6 est représentée en jaune.

Parmi le groupe D, un nouveau sous-groupe d'enzymes a été découvert : les β-lactamases de classe D hydrolysant des carbapénèmes (LDHC). Ces enzymes sont des oxacillines qui ont élargi leur spectre de reconnaissance des substrats pour y inclure les carbapénèmes (N. T. Antunes et Fisher, 2014). Après la découverte de ce groupe avec la β-lactamase OXA-23, toute une gamme d'enzymes variantes ont été observées : OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-143 et OXA-235 (Smith et al., 2013; Rodríguez, Nastro et Famiglietti, 2018).

Les gènes de l'expression des β-lactamases OXA-23 et OXA-24/40 ont été identifiés comme ceux principalement liés à la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii*. Cette observation provient principalement de la découverte d'une interaction hydrophobe observée lors de la résolution de la structure cristallographique de l'OXA-24/40 en 2007 (Santillana et al., 2007). Ce phénomène structural est créé par la tyrosine 112 et la méthionine 223, qui font du site actif un domaine plus accessible et plus hydrophobe pour l'interaction avec les carbapénèmes. Cependant, cette interaction n'est pas présente chez toutes les LDHC, comme chez OXA-48, qui

se lie moins fortement à ces substrats en raison de l'absence de cette interaction hydrophobe (Queenan et Bush, 2007; Docquier et al., 2009; Evans et Amyes, 2014).

En ce qui concerne l'OXA-143, cette  $\beta$ -lactamase présente 88% d'homologie avec l'OXA-24/40. Dans des études expérimentales avec des isolats cliniques, il a été observé que la suppression du gène  $bla_{\text{oxa-24/40}}$  rendait la bactérie plus sensible aux carbapénèmes, pénicillines et céphalosporines. Ceci expliquerait l'augmentation de la résistance aux carbapénèmes chez toutes les variantes de l'OXA-24/40 (Queenan et Bush, 2007; Gionco et al., 2012; Périchon et al., 2014; Rodríguez, Nastro et Famiglietti, 2018; Yoon et Jeong, 2021).

Une autre étude chez l'OXA-24/40, l'OXA-23 et son mutant OXA-146 a démontré l'importance de la boucle  $\beta 5$ - $\beta 6$  en déterminant la spécificité par laquelle le substrat est reconnu. L'OXA-146 se différencie de l'OXA-23 seulement par la duplication de l'alanine 220, placée entre les brins  $\beta 5$ - $\beta 6$ . Cette mutation a permis l'acquisition d'une meilleure affinité pour les substrats ceftazidime et aztreonam grâce au déplacement de la méthionine positionnée où se situe le pont hydrophobe. Ce fait permet d'élargir encore plus le spectre d'activité des enzymes OXA, suggérant que les carbapénemases pourraient représenter un point d'attention dans l'avenir (Kaitany et al., 2013).

### 1.3.3 Le mécanisme d'action des $\beta$ -lactamase de classe D

Les substrats  $\beta$ -lactamines sont reconnus par les oxacilinasés dans l'espace périplasmique des bactéries (Figure 1.8). Dans la phase d'acylation, la sérine (Ser) catalytique est activée par une molécule d'eau, permettant l'attaque nucléophile de ce résidu vers le noyau  $\beta$ -lactame et la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme (AE) (Toth et al., 2017).

Dans l'étape suivante, la lysine carboxylée présente seulement chez les  $\beta$ -lactamases de classe D permet (Toth et al. 2017; Golemi et al. 2001) :

1. Au carboxylate de déprotoner une molécule d'eau
2. Cette molécule d'eau (l'eau de la désacylation) attaque ensuite la liaison acyle entre la sérine et le noyau  $\beta$ -lactamine
3. Pour finalement libérer le produit inactivé

Ainsi, le fait d'avoir une lysine carboxylée dans le site active des OXA- $\beta$ -lactamases est obligatoire au bon fonctionnement de ces enzymes. Il faut souligner qu'après le premier cycle de réaction, la lysine est décarboxylée, un mécanisme réversible qui peut être contrôlé par la

quantité de CO<sub>2</sub> disponible en solution. la quantité de CO<sub>2</sub> présente dans la solution a un impact significatif sur l'activité enzymatique. Une fois que, des variations dans la concentration de CO<sub>2</sub> peut influencer la vitesse et l'efficacité de la réaction enzymatique, ce qui souligne l'importance de maintenir des conditions appropriées pour garantir l'activité optimale de ces enzymes. (Golemi et al., 2001; Verma et al., 2011).

### Carboxylation de la lysine ↔ La récupération d'activité enzymatique

De plus, l'environnement autour de cette lysine a pu se développer, au cours de l'évolution, pour favoriser ce résidu dans sa forme carboxylée (Laurent et al. 2000; Smith et al. 2013; Santillana et al. 2007; Che et al. 2012), ce qui permet :

1. La présence du pont d'hydrogène formé avec le résidu Trp167 présent dans la boucle  $\Omega$  est essentiel pour le processus de catalyse, une fois que ce résidu stabilise la lysine en promouvant la configuration optimale du site actif, afin de soutenir l'orientation favorable de clivage du substrat.
2. Un voisinage hydrophobe construit à partir des résidus : valine, phénylalanine et tryptophane qui composent l'ambiance autour du site actif et favorise, également, la stabilisation de la lysine carboxylée.

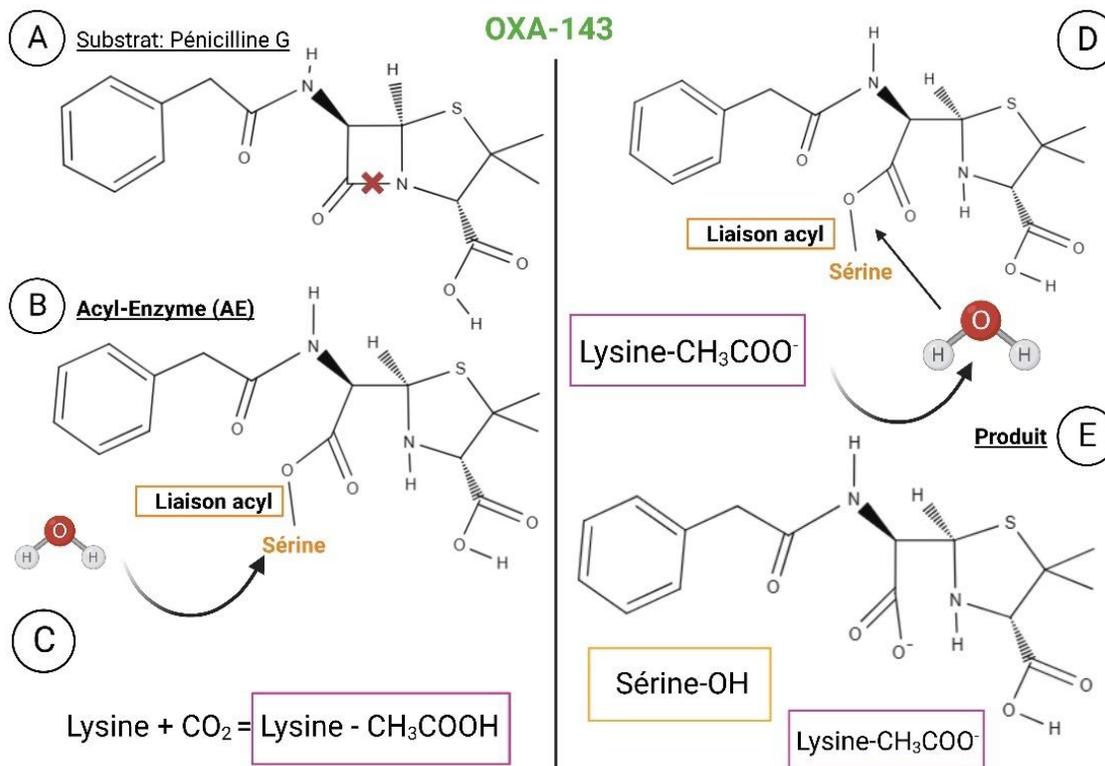


Figure 1.8: Représentation schématique du mécanisme catalytique de l'OXA-143 envers le substrat pénicilline G.

Figure construite à l'aide de BioRender.

## 1.4 OXA-143

L'OXA-143 (Figure 1.9) a d'abord été isolée au Brésil en 2004, puis décrite comme une LDHC en 2009 (Higgins et al. 2009; V. U. Antunes et al. 2019). Depuis ce temps, le nombre de souches bactériennes contenant le gène codant pour cette  $\beta$ -lactamase a augmenté, formant la famille d'enzymes OXA-143. À ce jour, cinq variantes de cette enzyme ont été caractérisées : OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253 et OXA-255 (V. U. Antunes et al. 2019; Sarikhani, Nazari, et Nateghi Rostami 2017).

Les enzymes OXA partagent des séquences de motifs hautement conservés près du site actif, comme la séquence STFK, en plus d'éléments structuraux comme la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 et  $\Omega$ . Dans l'OXA-143, le motif Ser81-Thr82-Phe83-Lys84 contient la sérine catalytique et la base générale lysine participant à la stabilisation du substrat lors de la réaction catalytique et la désacylation (Toth et al. 2017; V. U. Antunes et al. 2019).

Se maintiennent d'autres motifs aussi importants à la composition des SBLs et des enzymes de classe D, comme Ser128-Ala129-Val130 (SAV), Lys217-Ser218-Gly219 (KSG) et Phe152-Gly153-An154 (FGN) (Yoon *et al.*, 2021). Le premier participe au relâchement du produit à la fin de la réaction catalytique (Evans and Amyes, 2014; Antunes *et al.*, 2019), alors que les deuxième et troisième sont des motifs hautement conservés parmi toutes les sérines  $\beta$ -lactamases. Toutefois, des substitutions sont observées dans le deuxième motif, où la Ser218 substitue la thréonine, alors que la Phe152 substitue la tyrosine dans le troisième motif (Higgins *et al.*, 2009; Sarikhani, Nazari et Nateghi Rostami, 2017).

Des éléments structuraux particuliers sont aussi présents. Par exemple, la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 (résidus 221-230) est située à proximité du site actif et contient la méthionine 223, qui forme une interaction hydrophobe avec la tyrosine 112. La boucle  $\Omega$  contient les résidus Trp167-Leu168, qui stabilisent la lysine 84 et contribuent à la modulation de l'hydrolyse des carbapénèmes (Evans et Amyes, 2014; Mitchell *et al.*, 2015).

Les enzymes de la famille OXA-143 sont liés à des hauts niveaux de résistance à des carbapénèmes quand exprimés en isolation et en combinaison avec d'autres mécanismes de résistance à des antibiotiques. Jusqu'à maintenant les bactéries hôtes connues sont *A. baumannii* et *Acinetobacter pittii*, isolées du Brésil, de la Corée du sud et de l'Iran (Evans et Amyes 2014; Yoon et Jeong, 2021a; Sarikhani, Nazari, et Nateghi Rostami, 2017; Higgins *et al.* 2009; Kim *et al.* 2010)

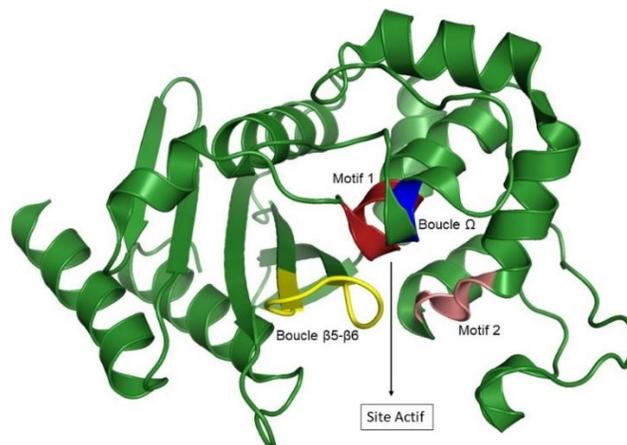


Figure 1.9: Structure de l'OXA-143.

La zone limitée en jaune correspond aux résidus acides aminés de la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 (résidus 221-230). La zone en rouge correspond au motif 1, composé des résidus extrêmement conservés parmi les  $\beta$ -lactamases : P80-S81-T82-F83-K84. La zone en bleu correspond à la boucle  $\Omega$ , incluant notamment les résidus W167 et L168. La zone en rose correspond au motif 2, composé des résidus S127-A128-V130. Toutes ces composantes, en plus des motifs 4 et 5 (K217-S218-G219 et F152-G153-N154, qui ne sont pas présentés dans la figure), constituent le site actif de l'OXA-143.

#### 1.4.1 Les variantes de l'OXA-143

Comme précédemment mentionné, cinq variantes de l'OXA-143 ont été observées à ce jour : OXA-143, OXA-182, OXA-231, OXA-253 et OXA-255 (Evans et Amyes, 2014). La première variante (OXA-231) a été isolée en 2007 de prélèvements cliniques de *A. baumannii*, en provenance d'un hôpital universitaire du sud du Brésil. Cette variante possède la mutation Asp230Ala (D230A), qui se situe à côté du motif conservé Lys217-Ser218-Gly219 (KSG) et près de la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6. De plus, cette mutation est aussi adjacente au résidu méthionine 223, qui forme une interaction hydrophobe avec la tyrosine 112. (Gionco et al., 2012).

La deuxième variante (OXA-182) a été rapportée en 2007 après une éclosion d'infections multirésistantes de *A. baumannii* en Corée du Sud (Kim et al. 2010). La troisième variante, l'OXA-255, a également été rapportée en 2007, après l'apparition de souches *A. baumannii* et *A. pittii* multirésistantes en Indiana, aux États-Unis. La comparaison des séquences de ces trois variantes permet de constater que l'OXA-231 possède seulement la substitution D230A, l'OXA-182 présente 19 substitutions (93% d'homologie avec l'enzyme native) et l'OXA-255 possède 21 substitutions (92% d'homologie) (ZanDer et al., 2014; N. T. Antunes et al., 2014).

D'autre part, l'OXA-253 possède 94% de similarité avec l'OXA-143, possédant un total de 17 substitutions. Cette variante a été rapportée en 2014 à partir d'isolats cliniques de *A. baumannii* prélevés à l'hôpital de Minas Gerais, au Brésil. Aucune substitution n'a été observée près d'un motif conservé du site actif, ou encore entraînant des changements conformationnels importants (Girlich et al., 2014).

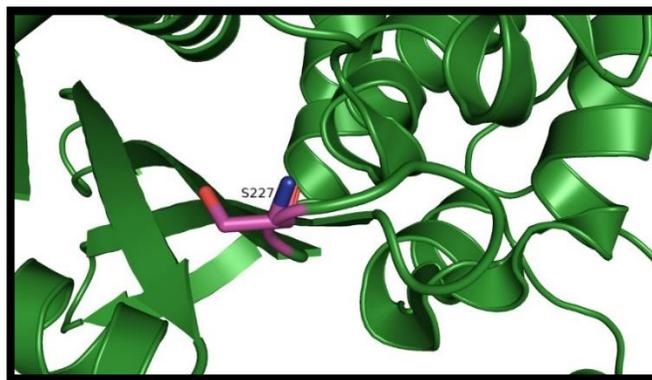
#### 1.5 Le mutant P227S de l'OXA-143

Deux autres variantes ont été étudiées par Mitchell *et al.* : OXA-160 et OXA-225 (Mitchell *et al.*, 2015). La première est une variante de l'OXA-24/40 présente dans des souches de *A. baumannii* recouvrée d'un poumon transplanté. La deuxième est une variante de l'OXA-23. Ces deux variantes possèdent des mutations à des positions homologues, acquises par substitution d'un résidu proline par un résidu sérine. Elles possèdent une activité catalytique contre les

pénicillines, carbapénèmes, céphalosporines et aztreonam, en plus de démontrer une augmentation d'affinité pour la majorité des non-carbapénèmes, sans perdre leurs capacités contre les carbapénèmes (Mitchell et al., 2015; Tian et al., 2011).

Le gain d'activité catalytique chez les variantes OXA-160 et OXA-225 est principalement causé par une mutation par substitution d'un aminoacide proline pour un aminoacide sérine à la proximité de la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6. En 2014, June *et al.* ont démontré qu'en raison du maintien de la fonction de carbapénémase chez l'OXA-24/40, cette enzyme sacrifie sa fonction d'oxacilinaise (June *et al.*, 2014). Dès que l'interaction hydrophobe formée par la tyrosine et la méthionine doit être déplacé hors du site actif afin d'accueillir le substrat oxacilline, un changement significatif est observé dans la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6, une des causes principales de la catalyse de carbapénèmes chez les LDHC. Ceci démontre à nouveau l'importance de la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 dans la reconnaissance des substrats chez ces enzymes (Mitchell et al., 2015; June et al., 2014).

D'autre part, une étude a démontré l'existence d'un motif conservé présent chez toutes les LDHC : PXXG (De Luca *et al.*, 2011). Ce motif est observé en C-terminal de la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 (Figure 1.11). Mitchell *et al.* ont également observé que la mutation de la proline de ce motif mène à une réorganisation structurale de la boucle, rendant la protéine plus flexible et capable de constituer nouveaux ponts hydrogène, changeant ainsi l'interaction de la boucle avec les résidus avoisinants (De Luca et al., 2011; Mitchell et al., 2015).



**Figure 1.10: Représentation structurale de la substitution d'une proline par une sérine à la position 227 chez l'OXA-143.**

C'est précisément dans cette région chez OXA-143 que se trouve la mutation P227S (Figure 1.10). Comme déjà mentionné, cette mutation semble être associée à une flexibilité accrue de la protéine et à une activité enzymatique supérieure par rapport aux substrats  $\beta$ -lactamines (V. U. Antunes et al., 2019).

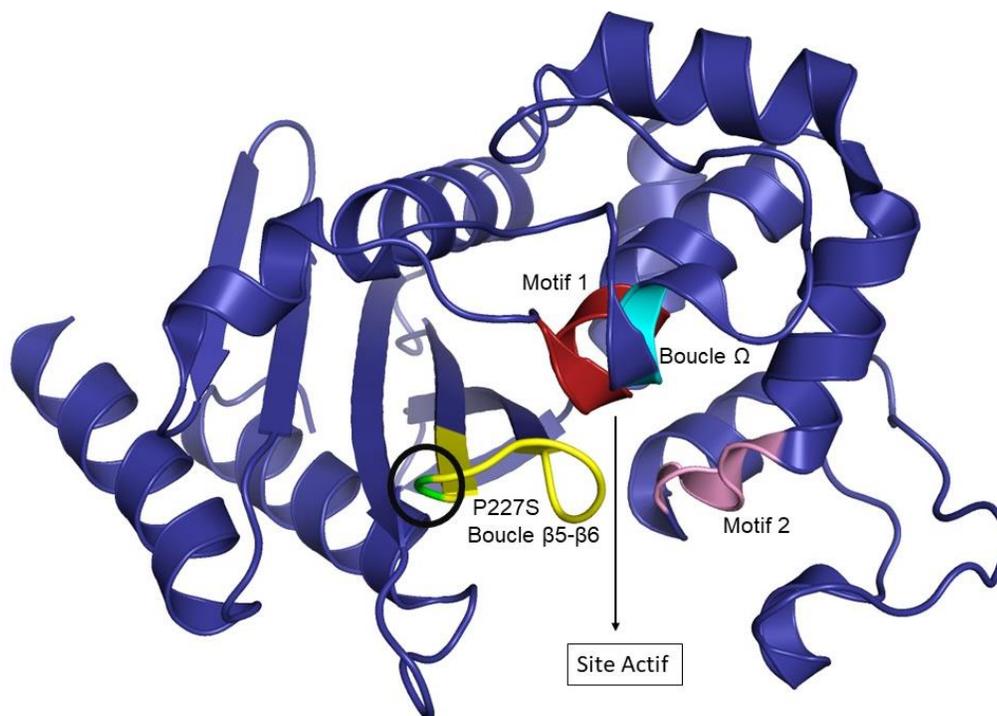


Figure 1.11: Structure du mutant P227S de l'OXA-143.

La zone limitée en jaune correspond à la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 (résidus 221-230), alors que la zone colorée en vert correspond au site de la mutation P227S. La zone en rouge correspond au motif 1 : P80-S81-T82-F83-K84. La zone en bleu correspond à la boucle  $\Omega$  : W167-L168. La zone en rose correspond au motif 2 : S127-A128-V130. Toutes ces composantes, en plus des motifs 4 et 5 (K217-S218-G219 et F152-G153-N154, qui ne sont pas présentés dans la figure), constituent le site actif.

## 1.6 Hypothèse

À ce jour, l'effet de la mutation P227S de l'OXA-143 demeure inconnue dans un contexte de survie cellulaire en présence de toutes les  $\beta$ -lactamines. En plus de contenir le résidu P227, la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6 est située près du site actif de l'OXA-143. Tel que précédemment suggéré par les études structurales, cette boucle semble étroitement liée à la spécificité de reconnaissance du substrat chez OXA-23, OXA-24/40, OXA-48 et OXA-160. L'hypothèse formulée est que la mutation P227S confèrera une plus haute résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines sélectionnés (aztréonam, méropénem, ceftazidime et ampicilline), en raison d'une activité enzymatique plus élevée et d'une plus grande flexibilité associée à la mutation dans la boucle  $\beta$ 5- $\beta$ 6.

## **1.7 Objectifs du projet de recherche**

### **1.7.1 Objectif Général**

Cette étude a pour objectif général d'évaluer qualitativement le profil d'activité la  $\beta$ -lactamase OXA-143 et de son mutant P227S envers les  $\beta$ -lactamines de différents types et générations, notamment l'aztréonam, le méropénem, la ceftazidime et l'ampicilline.

### **1.7.2 Objectifs Spécifiques**

Dans le but de supporter cet objectif général, trois objectifs spécifiques ont été planifiés :

1. Optimiser l'expression recombinante et la purification de l'OXA-143 et de son mutant P227S.

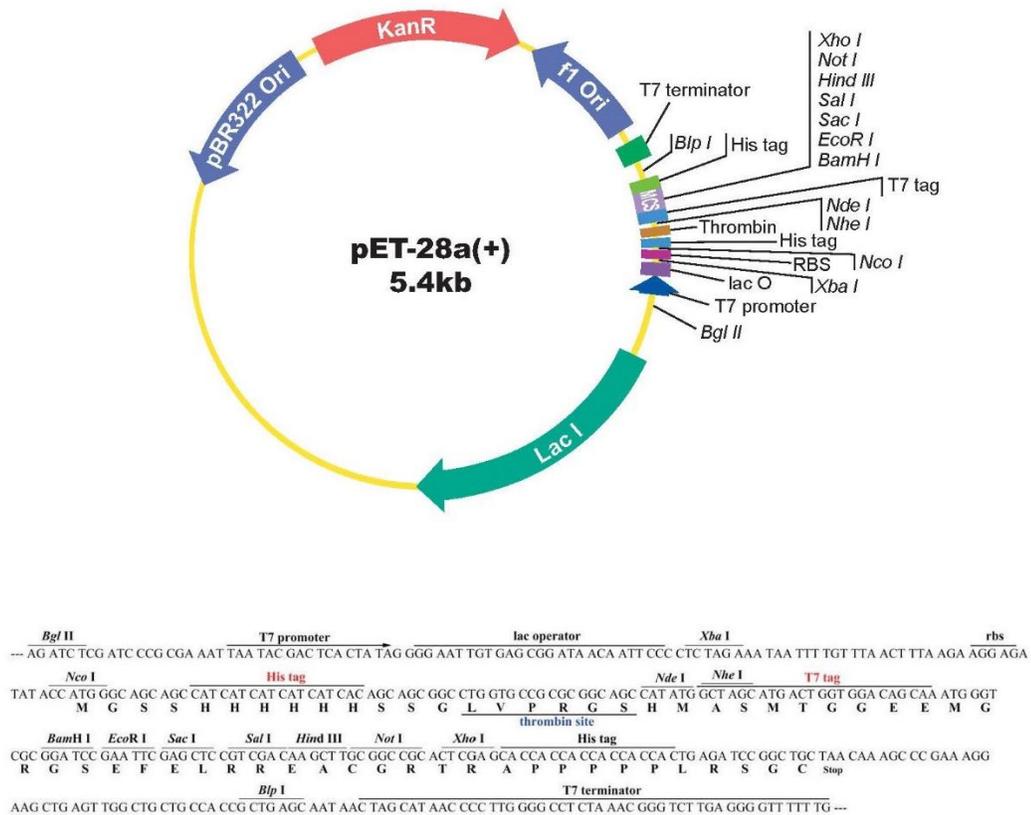
2. Caractériser la cinétique enzymatique de l'OXA-143 et de son mutant P227S en présence de pénicilline G dans le but de confirmer l'intégrité fonctionnelle et l'activité de ces enzymes.

3. Vérifier l'effet de la mutation P227S *in vivo* en effectuant des essais de concentration minimale inhibitrice chez *E. coli* pour chaque substrat choisi.

## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Expression et purification des protéines

Le plasmide pET28a(+) (Figure 2.1) encodant la séquence du gène de la  $\beta$ -lactamase OXA-143 (WT ou P227S) a été transformé chez *Escherichia coli* BL21 (DE3).



**Figure 2.1: Cartographie du vecteur d'expression pET28a utilisé pour la production des deux  $\beta$ -lactamases d'intérêt.**

Les deux vecteurs d'expression (OXA-143 et P227S) ont été fournis par la Professeure Denize Favaro, de l'Université Fédéral de Campinas. Selon l'article d'Antunes *et al.*, 2019 utilisé comme base pour cette étude, premièrement l'ADN plasmidique issu d'une souche d'*A. baumannii* Ab804 a été extrait en utilisant le kit Thermo Scientific. Les segments d'ADN (ID D0UHC8 sur UniProt) pour l'OXA-143 ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques : l'amorce avant (5'-AAAATCATGACTAAATTTGAAGACACT-3') et l'amorce arrière (5'-TATACTCGAGCCTAAATTCTCTAATGA-3'). Par la suite, l'amplicon obtenu a été soumis à une

digestion enzymatique avec les enzymes de restriction BspHI et XhoI, puis cloné dans le vecteur d'expression pET28a. Pour la création de la variante P227S, le kit de mutagenèse dirigée par site QuickChange d'Agilent (n° de catalogue 200518) a été employé. Le produit de la réaction en chaîne de la polymérase a été soumis à une digestion avec l'enzyme DpnI avant d'être transféré dans des cellules super compétentes XL1-Blue. La conformité de la formation et de la mutation a été confirmée par séquençage de l'ADN par la méthode de Sanger (V. U. Antunes et al. 2019).

### **2.1.1 Cellules compétentes (CaCl<sub>2</sub>)**

Dans un protocole standard, une culture initiale de 250 ml permet généralement d'obtenir entre soixante et soixante-dix tubes de 200 µl de cellules compétentes.

Au premier jour, une préculture des cellules dans un milieu LB de 2 à 5 ml a été faite et incubée pendant la nuit. Parallèlement, une solution de 150 mL de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 M a été préparée et autoclavée, et conservée à 4°C pendant la nuit.

Au deuxième jour, la culture initiale a été préparée dans 250 mL de milieu LB et cultivée jusqu'à ce que les cellules atteignent un OD<sub>600</sub> d'environ 0,4. Après centrifugation et égouttage, le culot a été resuspendu dans 125 ml de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 M. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes sur de la glace, centrifugées et égouttées. À nouveau, le culot a été resuspendu dans 12,5 mL de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 M et laissé reposer toute la nuit à 4° C.

Au troisième et dernier jour, du glycérol à 15 % a été ajouté (environ 2 ml), mélangé doucement par pipetage tout en maintenant une température basse. Le mélange a été conservé à 4° C pendant 15 minutes. Ensuite, des aliquotes de 200 µL ont été faites et congelées rapidement à -80° C en utilisant un bain d'éthanol/de glace sèche pour garantir la préservation.

### **2.1.2 Protocole d'extraction plasmidique**

Le kit d'extraction plasmidique utilisé (Figure 2.2) a été fourni par la compagnie « Bio-Basic Inc. » (Joshua et Lucate, 2018). Une culture de bactéries de 3 ml de milieu Lysogeny Broth (LB) avec 30 mg/L de kanamycine provenant d'une solution stock de concentration égale à 30 mg/ml. La culture a été incubée à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, les cultures ont été centrifugées à une vitesse de 13871 x g pendant 2 minutes (Thermo Scientific, modèle Sorvall Legend Micro21R Microcentrifuge) et le surnageant a été jeté pour en conserver le culot.

Au culot ont été ajoutés 100 µl de solution 1, mélangée au vortex et laissée en repos à température ambiante pendant 1 minute, à la suite de quoi 1 µl de solution « VisualLyse » fut

ajouté. La solution 2 fut ensuite ajoutée en quantité égale au volume de solution (200 µl) et doucement mélangée à la main en inversant le microtube 4-6 fois. Enfin, le mélange fut laissé au repos à température ambiante pendant 1 minute. À ce moment, si l'étape d'ajout de la solution « VisualLyse » a été faite correctement, le mélange devient bleu.

Ultérieurement, 350 µl de solution 3 a été ajouté et mélangé doucement à la main. À nouveau, le mélange a été laissé au repos à température ambiante pendant 1 minute. À cette étape, un nouveau changement de couleur est produit par la solution « VisualLyse » antérieurement ajoutée, après quoi le mélange devient incolore avec des petits traits bleus qui doivent être bien mélangés pour disparaître.

Par la suite, le mélange est centrifugé à une vitesse de 13871 x g pendant 5 minutes. Alors, le surnageant est transféré vers la colonne EZ-10 et le culot jeté. La colonne contenant le surnageant est centrifugée à une vitesse de 9633 x g pendant 2 minutes. Le « flow-through » (FT) est jeté et 750 µl de solution de lavage est ajouté, centrifugé à une vitesse de 9633 x g pendant 2 minutes. La dernière étape se répète jusqu'à ce qu'aucun vestige de solution de lavage soit présent.

Enfin, ce qui reste dans la colonne est transféré dans un nouveau microtube de 1,5 ml, et 50 µl de tampon d'élution est ajouté. Alors, le microtube est mis en repos à 37 °C pour 2 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé à une vitesse de 9633 x g pendant 2 minutes. La colonne EZ-10 est jetée et le FT est conservé à -20°C. La quantité d'ADN est ensuite calculée avec l'aide d'un NanoDrop (Thermo Fisher).

### **2.1.3 Transformation bactérienne par choc thermique**

Initialement, 3 µl (19,5 ng/ µl) de plasmide est mélangé avec 1.5 ml de cellule compétentes de *E. coli* BL21 (DE3) dans un microtube (1,5 ml) et le mélange est incubé sur glace pendant 30 minutes. Pendant ce temps d'incubation, un bain d'eau thermique est préparé à 42°C.

Après incubation, le mélange est soumis à un choc thermique à 42°C pendant 1,5 minute pour permettre la transformation des cellules. Immédiatement, le mélange est remis sur glace pendant plus de 15 minutes. Par la suite, le mélange est ajouté à des tubes d'essais (3 ml) contenant 1 ml de milieu LB et incubé à 37°C pendant 1 heure à 250 rpm.

Enfin, le mélange est étalé sur des géloses de milieu LB Agar et 30 mg/L de kanamycine. Finalement, les géloses sont incubées à 37°C en position inversée pendant toute la nuit.

#### **2.1.4 Optimisation de l'expression recombinante des oxacilinasés d'intérêt**

La préculture a été préparée dans deux flacons de type Erlenmeyers (125 ml) stériles, auxquels ont été ajoutés 25 ml de milieu LB stérile, 30 mg/L de kanamycine et une colonie transformée provenant de la gélose. Ces derniers ont été incubés à 37°C pendant la nuit à 250 rpm.

Dans des flacons de type Erlenmeyers de deux litres contenant 1 L de milieu LB stérile, 30 mg/L de kanamycine ont été ajoutés avec 25 mL de préculture. Ensuite, les cultures ont été incubées à 37°C (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O) à 600 nm de 0.6. À ce moment, l'expression du promoteur T7 a été induite avec 1 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cet ajout se fait sur glace, pour que la température des cultures abaisse graduellement. Une fois l'IPTG ajouté, les cultures ont été incubées à 16°C pour 16-18 heures à 250 rpm.

Ultérieurement, les cultures ont été centrifugées à une vitesse de 5171 x g à 4 °C pendant 30 minutes (Beckman, modèle AVANTI J-E series, rotor JLA 9.1000). Le culot est ensuite stocké dans un tube (50 ml) à -20°C et le milieu est jeté. Par la suite, le culot est resuspendu dans 30 ml de tampon de lyse (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10% de sucrose, pH 7,5). Les cellules sont lysées par sonication (Branson Sonifier 450) pendant 4 cycles de 2 minutes (ON et OFF) à puissance maximale de 8 et « duty cycle » de 50%. Le tout est centrifugé à nouveau à une vitesse de 27,167 x g à 4°C pendant 1 heure (Beckman, modèle AVANTI J-E series, rotor JA-20). Après cette étape, la protéine se trouvera dans le surnageant, dans la partie soluble du mélange.

#### **2.1.5 Purification par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) de type Nickel-NTA**

Les constructions géniques contenant une étiquette polyhistidine en C-terminal, la purification des oxacilinasés peut être effectuée par affinité (IMAC). Un FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA Pure (GE Healthcare) a été utilisé pour la chromatographie d'affinité avec une colonne HisTrap™ HP de 5 ml (GE Healthcare). Il faut souligner que toute solution utilisée a été filtrée sur 0,45 microns et dégazée au préalable. Le tampon A est constitué de 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM imidazole à pH = 7.5 et 25 mM (OXA-143) ou 100 mM (P227S) NaHCO<sub>3</sub>. Le tampon B est constitué de 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM d'imidazole à pH = 7.5 et 25 mM (OXA-143) ou 100 mM (P227S) NaHCO<sub>3</sub>.

Tout d'abord, la colonne a été nettoyée avec 5 volumes de colonne (CV) d'eau milli-Q, à la suite de quoi elle a été équilibrée avec 5 CV du tampon A à une vitesse de 5 ml/min. Le surnageant (lysate cellulaire) a été injecté à la colonne à une vitesse 2 ml/min. Subséquemment, l'éluion a été faite avec le tampon B (3 CV) à une vitesse 3 ml/min pendant 60 minutes avec un fractionnement de 3 ml. Le chromatogramme fut analysé et la pureté des fractions positives fut vérifiée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Finalement, la colonne fut nettoyée avec 5 CV d'eau milli-Q et 20% d'éthanol, puis conservée au réfrigérateur.

### **2.1.6 Dichroïsme Circulaire (CD) – Essai de dénaturation thermique**

Un essai de dénaturation thermique des enzymes a été effectué à l'aide d'un spectromètre CD Jasco J-720, en utilisant différentes concentrations de  $\text{NaHCO}_3$  pour en étudier l'effet sur la stabilité des enzymes. L'enzyme P227S a été diluée à une concentration de 6,5  $\mu\text{M}$  dans des tampons différents : 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 25, 100, 200 ou 500 mM de  $\text{NaHCO}_3$ . Un total de 300  $\mu\text{l}$  de solution furent ajoutés à une cuvette de quartz et le spectre CD a été enregistré à 222 nm entre les températures de 10 à 70 °C.

### **2.1.7 Électrophorèse par SDS-PAGE**

La technique d'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, SDS) permet la migration des protéines en les séparant en fonction de leur poids moléculaire, car le détergent SDS peut dénaturer les protéines et masquer leur charge par sa propre charge négative. Des gels et kit Mini PROTEAN TGX Stain Free Gels avec gradient de 4-20% de polyacrylamide ont été utilisés. Tous les échantillons ont été dénaturés dans le tampon de chargement Laemmli (250 mM Tris-Cl, 5% SDS, 50% glycérol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.1% bleu de bromophénol, pH 6.8). Puisque le tampon est concentré 5X, 10  $\mu\text{l}$  de tampon et 40  $\mu\text{l}$  d'échantillon furent ajoutés à chaque microtube (1,5 ml). Ce mélange a ensuite été chauffé à 95°C pendant 15 minutes. Par la suite, 14  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon fut déposé dans un puits avec 4  $\mu\text{l}$  de tampon « Precision Plus Protein All Blue standards » et du tampon « Precision Plus Protein Unstained standards », selon les recommandations du manufacturier. Ces deux tampons contiennent les bandes de protéines utilisées comme référence à 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 et 250 kDa solubilisées dans une solution qui contient 30 % (p/v) glycérol, 2% SDS, 62,5 mM Tris, 50 mM DTT, 5 mM EDTA, 0,02%  $\text{NaN}_2$ , 0.01% bleu de bromophénol, pH 6.8. La migration fut effectuée à 150 volts pendant 60 minutes. Par la suite, des images des gels ont été prises en utilisant le ChemiDoc XRS+ System de Bio-Rad.

## 2.2 Essais de cinétique enzymatique

Les essais cinétiques Michaelis-Menten ont été effectués selon le protocole publié dans l'article de Antunes *et al.* (2019), avec l'objectif de tester l'intégrité des enzymes produites.

La réaction de catalyse a été évaluée avec l'utilisation d'un spectromètre UV-vis 300 Cary Bio à 25°C. Dans une cuvette de quartz (parcours optique de 10 mm, volume de 1 ml) ont été mélangés 40 nM d'enzyme (OXA-143 ou P227S), des concentrations de pénicilline G entre 50 et 500 µM et du tampon de cinétique contenant 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à pH 7,5 et 25 mM (OXA-143) ou 100 mM (P227S) NaHCO<sub>3</sub>. Les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $k_{cat}$  ont été déterminés par régression non-linéaire de la vitesse (taux) par rapport à la concentration du substrat en utilisant l'équation de Michaelis-Menten dans le logiciel GraphPad Prism. La valeur de  $k_{cat}$  fut calculée à l'aide de l'équation  $k_{cat} = V_{max} / [E]$ .

Chaque courbe fut acquise pendant 5 minutes et les valeurs d'absorbance (235 nm) ont été enregistrées à chaque 0,1 seconde. Le coefficient d'extinction molaire de la pénicilline G utilisé est de  $\Delta\epsilon_{235}=1,879 \text{ cm}^{-1}$ . Pour chacune des concentrations (50, 100, 120, 150, 200 et 500 µM), le protocole a été répété cinq fois de manière indépendante. Les données ont ensuite été analysées sur GraphPad Prism dans le but d'en extraire les paramètres cinétiques provenant des analyses Michaelis-Menten de chaque enzyme.

## 2.3 Tests de susceptibilité aux antibiotiques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) furent testées sur des souches bactériennes d'intérêt, en suivant le protocole officiel de microdilution du Clinical Laboratory Standards Unit (CLSI - document : M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically – Eleventh Edition ; Approved Standard 2018) (CLSI, 2011).

Cette méthode vise à choisir une gamme de concentrations d'antibiotiques à tester en présence de la même quantité de bactéries dans une plaque de 96 puits. Les β-lactamines choisies étaient les suivantes et correspondaient à des types et des générations différentes : aztréonam, méropénem, ceftazidime et ampicilline. La gamme de concentrations pour chacun de ces composés a été établie à partir de données déjà publiées dans la littérature (Tableau 2.1 – colonnes OXA-143 et CLSI). Ainsi comme, les valeurs de CMI pour l'OXA-24/40 et OXA-160 ont été prises en considération avec l'objectif de faire des comparaisons entre l'OXA-24/40 et l'OXA-143, et entre l'OXA-160 et P227S. Une fois que, l'OXA-143 et l'OXA-24/40 partagent 86,2%-99,6% d'identité en aminoacides. Et en ce qui concerne l'OXA-160 et l'enzyme P227S, les deux

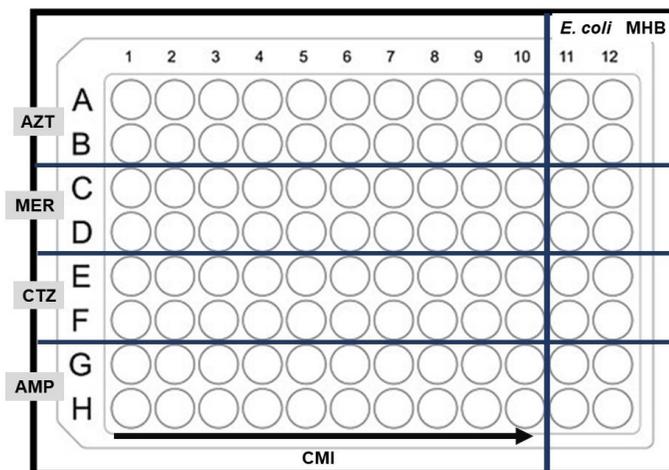
ont les mêmes substitutions et ont une activité hydrolytique accrue contre l'aztréonam, le ceftazidime, le méropénem et l'ampicilline par rapport aux espèces natives. Étant l'OXA-160 le mutant P→S pour l'OXA-24/40.

**Tableau 2.1: Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en µg/mL, publiées pour *E. coli* BL21 (DE3) et *E. coli* DH10B portant des β-lactamases : OXA-143, OXA-24/40 et OXA-160.**

Substrats	OXA-143	OXA-24/40	OXA-160	CLSI	Gamme
<b>AZT</b>	0,062	0,12-0,25	0,125	-----	0,002-1
<b>MER</b>	1	0,125-0,5	0,016	16	0,008-4
<b>CTZ</b>	0,25	0,25-0,5	-----	16	0,008-4
<b>AMP</b>	128-1024	128	16	128	0,25-128

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011; Toth et al., 2017; Tian et al., 2011) AZT – aztréonam; MER – méropénem; CTZ – ceftazidime; AMP – ampicilline; CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.

En premier lieu, 3 ml d'une préculture bactérienne de chaque construction génique a été préparée avec 30 mg/L de kanamycine et incubée à 37°C pour 24h. Des stocks à 5 mg/mL ont été préparés pour chaque antibiotique, dans 10 mL d'eau milli-Q. Les dilutions nécessaires pour chaque substrat antimicrobien ont été effectuées dans des microtubes de 1,5 mL stériles. Des plaques de 96 puits ont été identifiées et 200 µL de chaque antibiotique ont été déposés dans la colonne 10 (Figure 2.3). Un volume de 100 µL de milieu Mueller Hinton Broth (MHB) a été déposé dans les colonnes 1 à 9. Subséquemment, des dilutions en série de 100 µL de chaque antibiotique ont été effectuées dans chaque puits.



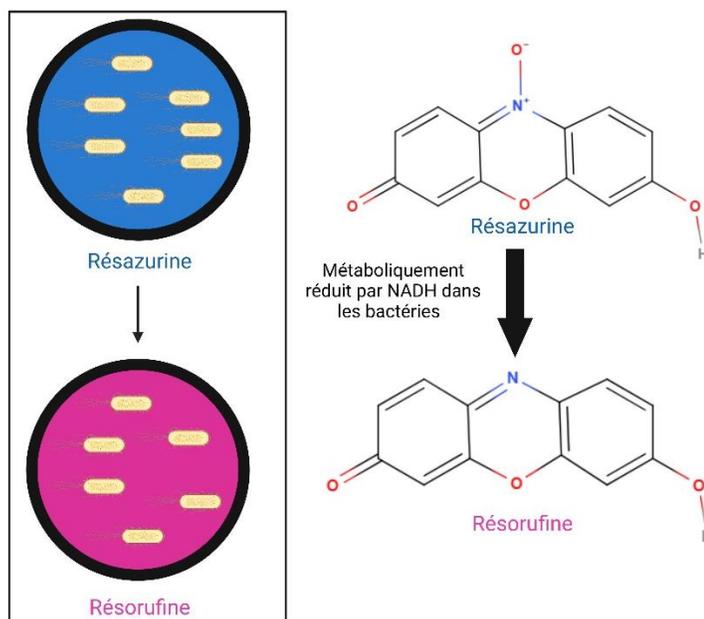
**Figure 2.2: Exemple de plaque de 96 puits utilisé pour effectuer les tests de susceptibilité aux antibiotiques.**

Les puits A-B correspondent à l'aztréonam, C-D au méropénem, E-F à la ceftazidime et G-H à l'ampicilline. Les colonnes 11 et 12 ont été utilisées comme contrôles de culture bactérienne et stérilité du milieu MHB. La flèche noire indique la direction de lecture de la valeur de CMI, de la concentration la plus faible à la plus élevée. Figure construite à l'aide de BioRender.

Par la suite, 10 ml de suspension bactérienne ont été préparés à une densité optique ( $DO_{600}$ ) égale à 0,006, puis 100  $\mu$ L de suspension bactérienne ont été distribués dans chaque puits pour que la DO finale soit égale à 0,003. Finalement, les plaques ont été incubées à 37°C pour 24h, sans agitation. La lecture visuelle des plaques a été effectuée en détectant l'activité bactérienne grâce à la résazurine (Elshikh *et al*, 2016). Pour ce faire, 50  $\mu$ L d'un stock de 0,1 mg/mL de résazurine (préparé en milieu MHB) fut ajouté à chacun des puits et la plaque fut incubée à 37°C pour 1h avant d'effectuer la lecture. Chaque essai de CMI a été effectué en quadruple dans des essais indépendants.

## 2.4 Interprétation des résultats en utilisant la résazurine

Dans la présente étude, les tests de susceptibilité aux antibiotiques ont été analysés et interprétés visuellement par le changement de couleur de la résazurine, ou Alamar Blue (Figure 2.4). La résazurine est un indicateur déjà très utilisé dans l'industrie, notamment pour monitorer la contamination du lait. Dans les essais *in vitro*, ce composé permet une mesure directe, visuelle, rapide et sensible de l'activité métabolique des bactéries. Dans les dernières 50 années, ce colorant a été beaucoup utilisé dans les essais de viabilité cellulaire et en cytotoxicité (Elshikh *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2021; Crane *et al.*, 2021; Abd Algaffar *et al.*, 2022).



**Figure 2.3: Réaction de redox de la résazurine de couleur bleu se transformant en résorufine de couleur rose (fluorescente) en présence de bactéries métaboliquement actives.**

Figure construite à l'aide de BioRender.

À la suite de la réduction en résorufine, cette molécule peut être subséquemment réduite en dihydrorésorufine, qui est invisible. Dans la réaction de réduction de la résazurine en résorufine, l'enzyme NADH déshydrogénase agit comme un donneur d'électrons en faisant le transfert de  $H^+$  vers la résazurine. Cette réaction peut être mesurée par fluorométrie ou par fluorescence, en analysant la résorufine (Costa et al., 2021). La méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) est ainsi grandement simplifiée et permet l'établissement de ces valeurs avec précision (Sarker, Nahar et Kumarasamy, 2007).

### 2.4.1 Analyse sur Image J

Pour l'analyse des gels SDS-PAGE, le logiciel « [ImageJ.JS \(imjoy.io\)](https://imagej.nih.gov/ij/) » a été utilisé comme outil pour calculer la pureté des deux protéines obtenues. Premièrement, les images sont importées dans le logiciel et chaque bande est sélectionnée. Après le traitement des données, chaque bande est représentée par un pic de densité, en utilisant l'outil, la zone de chacun

de ses pics est sélectionnée et calculée. Puis, ces valeurs sont transférées sur Excel et la pureté est calculé en pourcentage.

## 3 Résultats

---

### 3.1 Optimisation de l'expression et purification des $\beta$ -lactamases d'intérêt

#### 3.1.1 Optimisation des tampons utilisés dans la purification par dichroïsme circulaire

Selon des études expérimentales de la structure cristallographique et du mécanisme catalytique qui régit les principales  $\beta$ -lactamases de classe D tel que OXA-1, OXA-10, OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-48 et OXA-58, la lysine carboxylée est la clé de la désacylation et de l'activité catalytique optimale de l'enzyme (Héritier et al., 2005; Santillana et al., 2007; Docquier et al., 2009; De Luca et al., 2011; Verma et al., 2011; Che et al., 2014; Sarikhani, Nazari et Nateghi Rostami, 2017; Taylor et al., 2021).

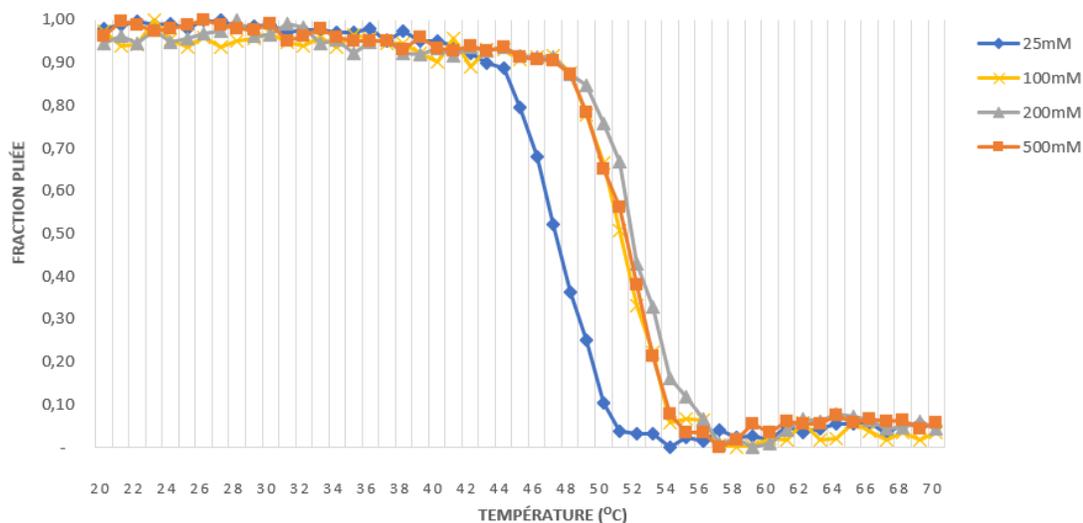
Cette carboxylation se fait grâce à la réaction du groupe amine non-protoné de la lysine avec le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). La lysine revient à son état décarboxylé après le premier cycle de réaction (acylation-désacylation), avec carboxylation réversible de la lysine (Golemi et al., 2001; Che et al., 2014). Cependant, l'excès de  $\text{CO}_2$  dans le tampon peut inhiber cette décarboxylation et permettre une re-carboxylation immédiate. Par conséquent, la concentration de  $\text{CO}_2$  dans le milieu influence la quantité de lysine carboxylée et indirectement l'efficacité enzymatique (Verma et al., 2011).

Afin d'augmenter cette concentration, du bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) a été ajouté aux tampons de purification. Cet ajout permet à toutes les enzymes en solution d'avoir une lysine carboxylée, sans décarboxylation pendant la catalyse. Pour analyser la meilleure concentration de  $\text{NaHCO}_3$  à employer, l'essai de dénaturation thermique par dichroïsme circulaire (DC) a été utilisé.

Cette technique spectroscopique peut servir :

- 1) À évaluer les taux de structures secondaires : hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$  et régions non-structurées.
- 2) Caractériser la stabilité thermique d'une protéine (par dénaturation).

Ainsi, le DC a été la technique employée pour suivre la dénaturation de la structure de la protéine en fonction de la température du milieu (20-70°C) et en présence de différentes concentrations de  $\text{NaHCO}_3$  (25 à 500 mM) (Figure 3.1).



**Figure 3.1: Essai de dénaturation thermique par dichroïsme circulaire (DC) du mutant P227S.**  
 L'axe des ordonnées correspond à la quantité de protéine repliée en solution. L'axe des abscisses correspond à la température (20-70°C).

Le bicarbonate de sodium favorise non seulement la formation et le maintien de la lysine carboxylée, mais il améliore aussi la stabilité thermique de l'enzyme lorsque la concentration de NaHCO<sub>3</sub> est ajoutée au tampon (25 à 100 mM). La valeur de la constante de température de fusion (T<sub>m</sub>) passe ainsi de 37,85 °C (0 mM) (Antunes *et al*, 2019) à 51 °C (100 mM). Cependant, les solutions plus concentrées (200 à 500 mM) n'offrent pas d'avantage supplémentaire, une fois que la T<sub>m</sub> se maintient à 51 °C. Par conséquent, les nouveaux tampons ont été optimisés (A et B) en utilisant 100 mM de NaHCO<sub>3</sub> durant la purification du variant P227S.

Bien que des variations de stabilité thermique aient été observées avec le mutant P227S, aucun problème n'a été rencontré lors de la purification de l'enzyme native OXA-143. Par conséquent, la même concentration de 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, précédemment optimisée dans le protocole de l'enzyme native par Antunes *et al.* (2019), a été utilisée.

### 3.1.2 Purification par chromatographie IMAC et vérification sur gels SDS-PAGE 4-20%

Après avoir optimisé les tampons du mutant P227S en modifiant la concentration  $\text{NaHCO}_3$  et avoir adopté comme nouvelle concentration 100 mM, a été effectuée une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) de type Nickel-NTA (Figure 3.2).

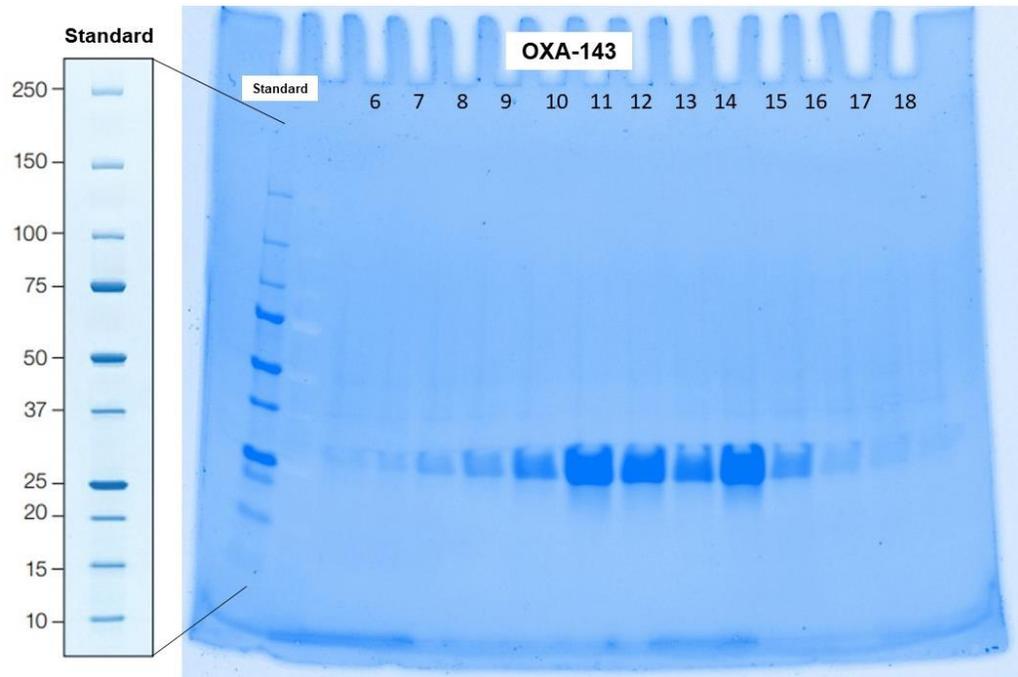


**Figure 3.2: Colonne His-Trap™ HP de 5 ml utilisée pour toutes les purifications de l'OXA-143 et de son mutant P227S.**

Une fois le vecteur acquis du laboratoire de la Prof. Denize Favaro (Université Fédérale de Campinas, São Paulo, Brésil), OXA-143 et son mutant P227S ont été exprimées et purifiées selon le protocole publié dans l'article de Antunes *et al.* (2019). La purification de ces  $\beta$ -lactamases est rendue possible grâce à l'ajout d'une étiquette d'hexahistidine (6 x His-Tag) à la protéine recombinante après la transcription. Le 6 x His-Tag possède une grande affinité pour le  $\text{Ni}^{+2}$  immobilisé dans la matrice Ni-NTA de la colonne. L'imidazole présent dans le tampon A et B agit comme un compétiteur pour se lier à la matrice (IBA Solutions for Life Sciences, 2021). La concentration de cet additif augmente entre les tampons dans deux buts :

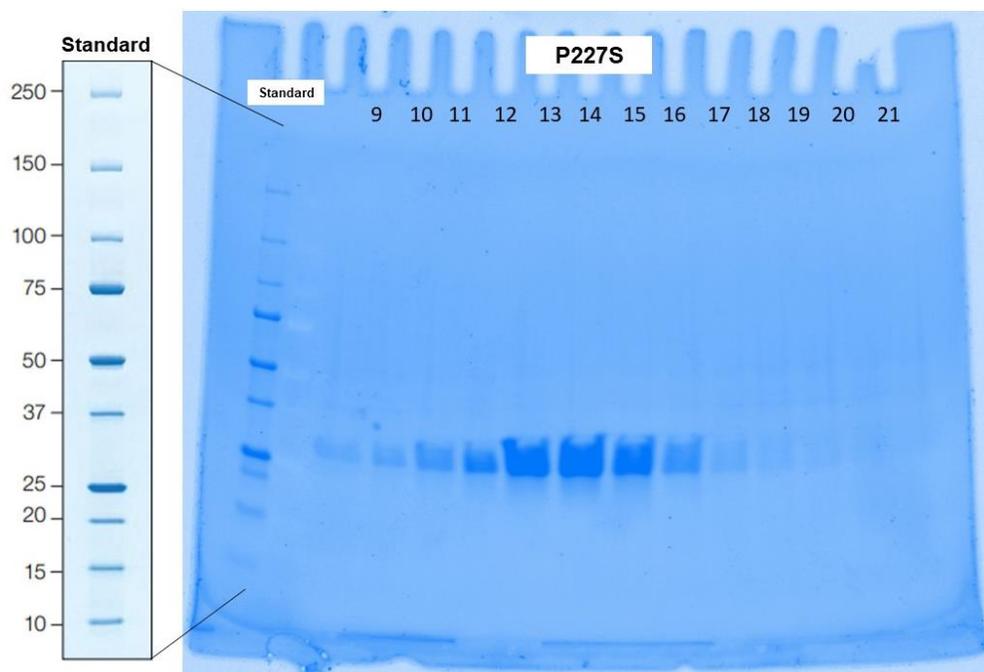
- 1) Tampon A : possède une concentration de 20 mM afin d'inhiber des liaisons non-spécifiques d'autres protéines
- 2) Tampon B : possède une concentration de 500 mM afin de permettre le relâchement des toutes protéines recombinantes possédant l'étiquette 6 x His-Tag

Ainsi, le processus de purification a été accompli avec succès. À la suite de cet essai, la pureté et estimé la quantité de protéine purifiée par SDS-PAGE 4-20% ont été vérifiées (Figures 3.3 et 3.4), en sachant que le poids moléculaire de l'OXA-143 est 27,284 Da.



**Figure 3.3: Analyse sur gel SDS-PAGE des fractions récoltées à la suite de la purification de l'OXA-143.**

**Le puits 1 correspond au standard de poids moléculaire de référence « Precision Plus Protein All Blue », qui démarque les poids moléculaires de protéines de référence en kDa. Les puits 6-18 correspondent aux fractions récoltées suite à la purification IMAC. Le rendement de production est de 320 mg/l, déduit à partir de la concentration de la fraction 11 utilisée pour les essais de cinétique.**



**Figure 3.4 : Analyse sur gel de SDS-PAGE des fractions récoltées à la suite de la purification du mutant P227S.**

Le puits 1 correspond au standard de poids moléculaire de référence « Precision Plus Protein All Blue », qui démarque les poids moléculaires de protéines de référence en kDa. Les puits 9-21 correspondent aux fractions récoltées. Le rendement de production est de 210 mg/l, déduit à partir de la concentration de la fraction 14 utilisée pour les essais de cinétique.

L'analyse des gels à l'aide du logiciel ImageJ, a suggéré que les deux protéines avaient été obtenues avec une pureté supérieure à 95%.

### 3.2 Cinétique enzymatique avec la pénicilline G

Pour donner suite à l'expression et à la purification des enzymes recombinantes, des essais cinétiques ont été entrepris pour en vérifier l'intégrité structurale et fonctionnelle. Le protocole utilisé est celui utilisé par Antunes *et al.* (2019), avec certaines modifications. Les paramètres suivants ont été déterminés pour les deux  $\beta$ -lactamases envers le substrat pénicilline G (Figure 1.1) :

- 1) Constante de Michaelis:  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ )
- 2) Constante catalytique, ou "turnover number":  $k_{\text{cat}}$  ( $\text{s}^{-1}$ )
- 3) Efficacité catalytique:  $k_{\text{cat}}/K_m$  ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ),

La concentration d'enzyme était constante dans tous les essais et a été fixée 40 nM. À partir d'une fraction de purification, la concentration de protéine a été calculée à l'aide d'un NanoDrop en utilisant des valeurs de coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) pour l'OXA-143 de 43,430 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> et un poids moléculaire de 27,284 Da. Toutes ces données ont été recueillies à partir de l'analyse de la séquence de l'OXA-143 à l'aide de l'outil ProtParam (<https://www.expasy.org/> accès : 11/08/2021, 8h02). Les concentrations de pénicilline G testées ont été choisies à partir de la valeur de  $K_m = 167,6 \mu\text{M}$  précédemment publiée par Antunes *et al.* (2019). Les gammes de concentrations de substrat choisies étaient de 50, 100, 120, 150, 200, 400, 500, 600 et 700  $\mu\text{M}$ .

L'équation de Michaelis-Menten a été utilisée pour extraire les paramètres  $K_m$  et de vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) de chaque enzyme (Patel, 2012) :

$$V_o = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{(K_m + [S])}$$

Dans laquelle :

$V_o$  = Vitesse initiale d'hydrolyse

$V_{\text{max}}$  = vitesse maximale

[S] = concentration de substrat

$K_m$  = Constante de Michaelis

En sachant que la concentration de substrat [S] influence la vitesse de catalyse par l'enzyme, l'équation de Michaelis-Menten s'exprime comme une hyperbole où la vitesse augmente jusqu'à l'atteinte d'un plateau, en raison de la saturation de l'enzyme par le substrat (Figure 3.5) (Punekar, 2018).

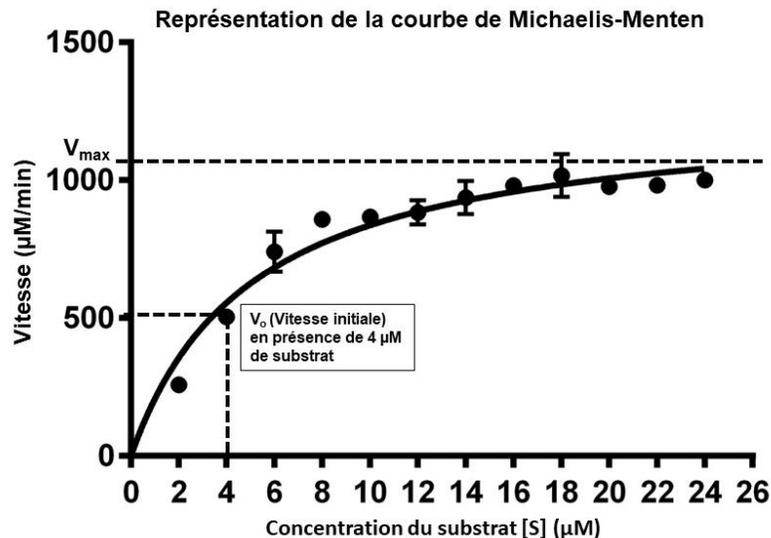
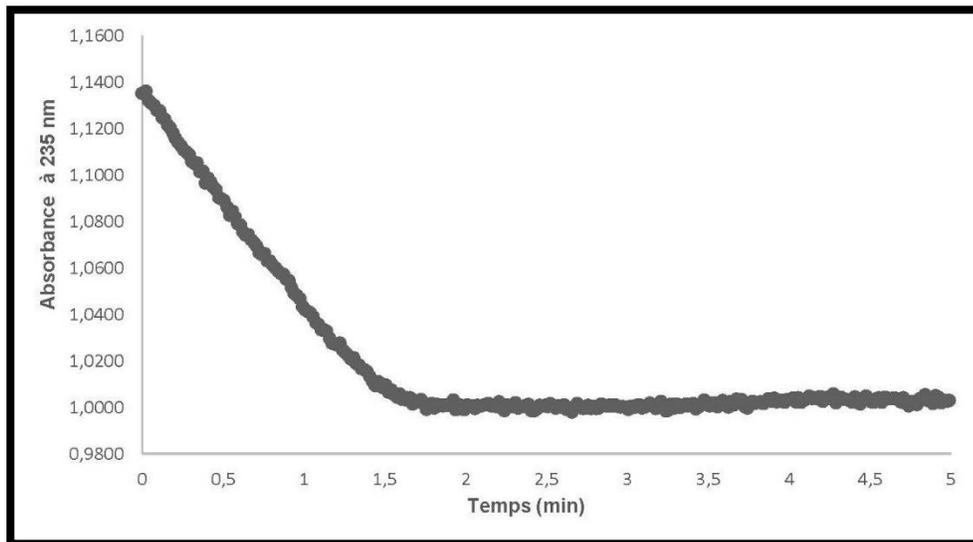


Figure 3.5: Exemple d'hyperbole obtenue par l'équation de Michaelis-Menten.

Les valeurs traitées sont exclusivement illustratives. La valeur de  $K_m$  dans cet exemple correspond à 4 µM, soit la concentration de substrat nécessaire pour atteindre 50 % de la vitesse maximal  $V_{max}$ .

Les données d'absorbance (densité optique) en fonction du temps aux concentrations de substrat choisies ont été acquises à une longueur d'onde de 235 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ultraviolet-visible (UV-Vis) et analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 6.07).

Pour construire les graphes de Michaelis-Menten, les vitesses initiales relatives à chaque concentration de substrat ont été obtenues par mesure directe et continue de la concentration de de la pénicilline G en suivant l'absorbance en fonction du temps pour chaque concentration pendant 5 minutes (Figure 3.6). Tous les essais ont été effectués en triplicata en utilisant une nouvelle expression et purification de l'OXA-143 et du mutant P227S. Ainsi, chaque essai correspond à la caractérisation d'une enzyme fraîchement purifiée (i.e., triplicata biologique).



**Figure 3.6: Cinétique de la dégradation de la pénicilline G par l'enzyme OXA-143.**

**Concentrations initiales du substrat était à 500  $\mu$ M et de l'enzyme 40 nM. Exemple de donnée générée par le spectrophotomètre UV-Vis. L'ordonnée (y) correspond à l'absorbance à 235 nm, l'abscisse (x) correspond au temps en minutes.**

La figure 3.6 représente un exemple de données acquises. En se basant sur ces données, les vitesses initiales pour l'OXA-143 et son mutant P227S ont été calculées. Cela est envisageable grâce à deux concepts :

- 1) La loi de Beer-Lambert
- 2) La vitesse est égale à la pente de la courbe

La loi de Beer-Lambert peut s'exprimer ainsi (Oshina et Spigulis, 2021):

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

A = absorbance (unité d'absorbance - UA)

$\epsilon$  = coefficient d'extinction molaire

l = largeur du parcours optique (cm)

c = concentration (M)

Cette loi précise l'existence d'une proportionnalité entre concentration et absorbance à une certaine longueur d'onde. Objectivement, ce principe vise à expliquer le rapport entre le faisceau de lumière qui passe à travers une solution et les propriétés de cette solution (Oshina and Spigulis, 2021). Cependant, quel est le lien entre la loi de Beer-Lambert et les calculs de vitesses initiales ?

Puisque l'équation qui régit une droite est une fonction affine qui peut s'écrire sous la forme :

$$y = ax + b$$

a = coefficient directeur

b = ordonnée à l'origine

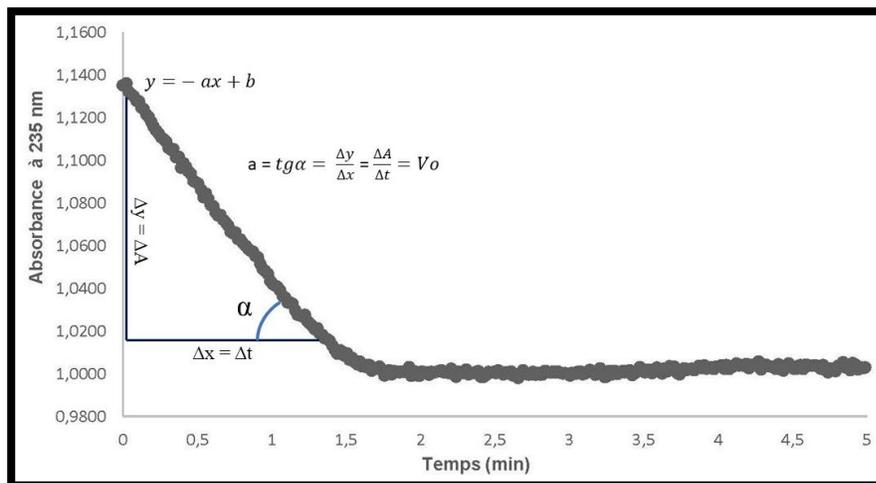


Figure 3.7: Exemple d'analyse pour la cinétique enzymatique de l'OXA-143 (40 nM) avec la pénicilline G à 500 µM.

Le graphique vise à exemplifier l'analyse faite pour chaque essai effectué. L'ordonnée (y) correspond à l'absorbance à 235 nM, l'abscisse (x) correspond au temps en minutes.

D'après la figure 3.7, il est possible de calculer la valeur absolue du coefficient directeur, qui est égal à la tangente de l'angle  $\alpha$ , dont la valeur est égale à  $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ . En sachant que la vitesse initiale ( $V_o$ ) est égale à  $\frac{\Delta[S]}{\Delta t}$ , considérant la largeur de cuvette (l) de 1 cm, en conclusion (Bisswanger, 2008; Marchal et al., 2009; Oshina et Spigulis, 2021) :

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \varepsilon \cdot \frac{\Delta[S]}{\Delta t}$$

Alors,

$$V_o = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon} = \frac{a}{\varepsilon} \times 10^6 \text{ (}\mu\text{M/min)}$$

En se basant sur cette conclusion, toutes les vitesses initiales ont été calculés et sont présentées dans le Tableau 3.1 pour l'OXA-143 et dans le Tableau 3.2 pour le mutant P227S.

**Tableau 3.1: Vitesses d'hydrolyse initiales calculées pour l'OXA-143 pour chaque concentration testée de pénicilline G.**

Pénicilline G ( $\mu\text{M}$ )	Essai 1 ( $\mu\text{M/min}$ )	Essai 2 ( $\mu\text{M/min}$ )	Essai 3 ( $\mu\text{M/min}$ )
50	0,4513	0,8289	0,5710
100	1,2342	0,9210	0,9187
120	0,9487	1,1582	1,0891
150	0,9164	1,2687	1,3217
200	1,5588	1,3263	1,4598
400	1,6560	1,6560	1,6560
500	1,8374	1,7269	1,9133
600	2	1,9870	1,9650
700	2	2	1,9980

**Tableau 3.2: Vitesses d'hydrolyse initiales calculées pour le mutant P227S pour chaque concentration testée de pénicilline G.**

Pénicilline G ( $\mu\text{M}$ )	Essai 1 ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Essai 2 ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Essai 3 ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )
50	0,4605	0,8957	0,7506
100	1,1513	1,3493	0,9694
120	1,3723	1,1213	1,3447
150	1,4092	1,4828	1,6072
200	1,6671	1,7845	1,6164
400	1,8900	1,7980	1,8900
500	2,0239	2,1137	2,1414
600	2,1314	2,1415	2,1500
700	2,1500	2,1499	2,1412

Par la suite, les valeurs de vitesse ont été analysées par la relation de Michaelis-Menten, tel que présenté dans la Figure 3.8 :

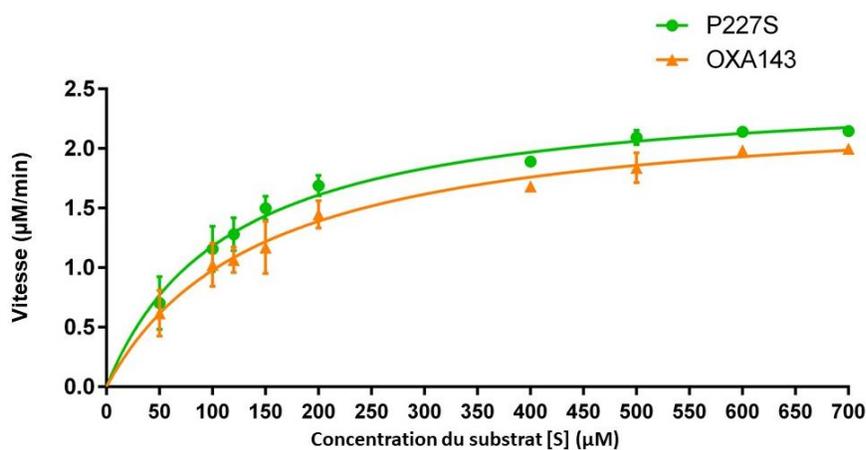


Figure 3.8: Courbes de Michaelis-Menten produites à partir des valeurs calculées de vitesses initiales (μM/min) en fonction de la concentration de substrat [S] (μM).

L'hyperbole verte correspond au mutant P227S et l'hyperbole orange à l'OXA-143.

Par ailleurs, les constantes  $K_m$ ,  $k_{cat}$  et  $k_{cat}/K_m$ , ainsi que la  $V_{max}$  pour chacune des enzymes ont été calculées. Les paramètres  $K_m$  et  $V_{max}$  ont été obtenus directement des calculs de GraphPad Prism, alors que la constante catalytique  $k_{cat}$  a été calculée selon l'équation suivante (Gan et Allen S. J., 2003; Bisswanger, 2008; Punekar, 2018) :

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

Où :

$k_{cat}$  = constante catalytique

$V_{max}$  = vitesse maximale de l'enzyme

[E] = concentration d'enzyme utilisée

Ainsi, les paramètres cinétiques calculés pour l'OXA-143 et P227S sont présentés dans le Tableau 3.3.

**Tableau 3.3 : Paramètres de cinétique enzymatique de l'OXA-143 et P227S envers la pénicilline G.**

$\beta$ -lactamases	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
<b>OXA-143</b>	145,2	59,95	$4,13 \times 10^5$
<b>P227S</b>	114,7	63,33	$5,52 \times 10^5$

### 3.3 Tests de susceptibilité aux antibiotiques

#### 3.3.1 Calculs des concentrations minimales inhibitrices

Au cours de la période d'étude, dix essais de CMI ont été réalisés. Il est important de souligner que pour chaque expérience, une nouvelle transformation bactérienne du vecteur d'expression de OXA-143 et de son mutant P227S ont été réalisés chez la souche *E. coli* BL21(DE3), en utilisant toujours un milieu frais pour la croissance des cellules.

L'IPTG n'a pas été utilisé pour les tests de susceptibilité aux antibiotiques, car a été pris en compte l'expression basale des vecteurs pET en l'absence d'IPTG (Gomes, Monteiro, et Mergulhão, 2020). Dans les tableaux 3.4 et 3.5 sont présentés les quatre meilleurs essais. Les autres essais ont été exclus des analyses en raison d'erreurs expérimentales ou d'absence de croissance bactérienne.

Les substrats analysés sont les suivants : ampicilline (AMP), aztréonam (AZT), ceftazidime (CTZ) et méropénem (MER). Ces antibiotiques sont des représentants typiques de l'éventail des substrats  $\beta$ -lactamines de type pénicilline, céphalosporine, monobactame et carbapénème, respectivement.

Les figures 3.9 et 3.10 font référence à l'essai 1. Les figures des essais 2, 3 et 4 sont dans la partie Annexe I à VI.

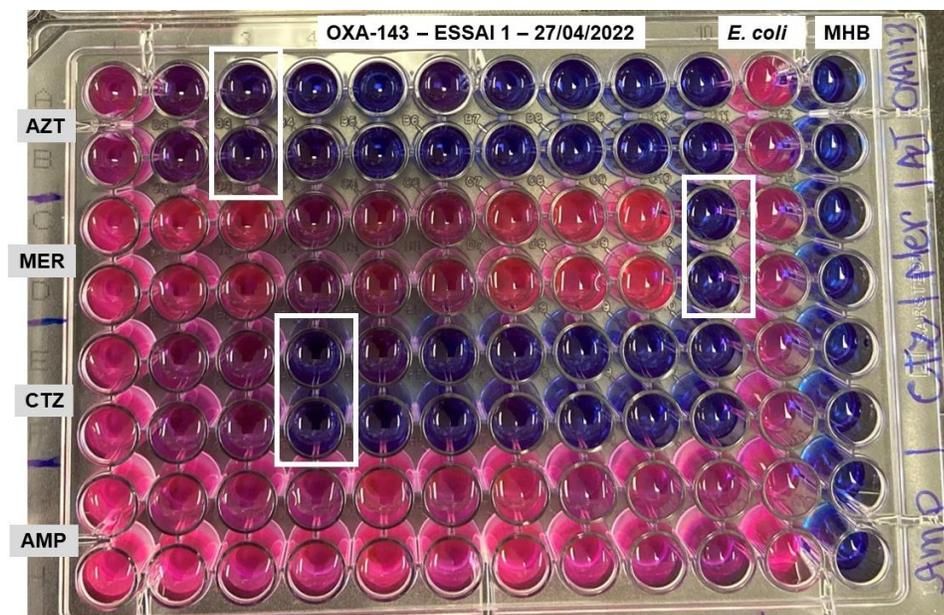


Figure 3.9: Plaques de CMI de l'essai 1 pour OXA-143 native.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. Les colonnes 11 et 12 démarquent respectivement les contrôles positif (*E. coli*) et négatif (MHB).

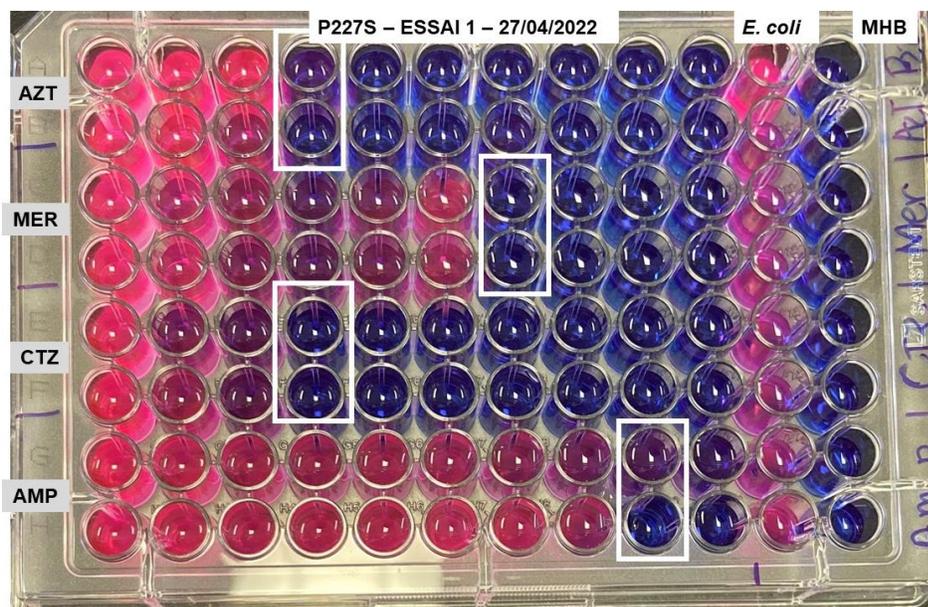


Figure 3.10: Plaques de CMI de l'essai 1 pour le mutant P227S.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. Les colonnes 11 et 12 démarquent respectivement les contrôles positif (*E. coli*) et négatif (MHB).

**Tableau 3.4: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de divers substrats  $\beta$ -lactamines calculées pour la  $\beta$ -lactamase OXA-143 chez *E. coli* BL21 (DE3).**

Substrats ( $\mu\text{g/mL}$ )	Essai 1 27/04/2022	Essai 2 13/07/2022	Essai 3 04/10/2022	Essai 4 06/10/2022
AZT	0,008	0,03	0,016	0,008
MER	4	>4	0,125	0,25
CTZ	0,06	0,125	0,06	0,03
AMP	>128	>128	1	>128

Toutes les concentrations sont présentées en  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tableau 3.5: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de divers substrat  $\beta$ -lactamines calculées pour la  $\beta$ -lactamase P227S chez *E. coli* BL21 (DE3).**

Substrats ( $\mu\text{g/mL}$ )	Essai 1 27/04/2022	Essai 2 13/07/2022	Essai 3 04/10/2022	Essai 4 06/10/2022
AZT	0,016	0,008	0,008	0,004
MER	0,5	0,5	0,03	0,06
CTZ	0,06	0,03	0,06	0,06
AMP	64	1	4	64

Toutes les concentrations sont présentées en  $\mu\text{g/mL}$ .

Les plaques ont été interprétées visuellement à l'aide de la coloration à la résazurine. Cet indicateur bleu/violet non fluorescent est réduit métaboliquement par les cellules actives et génère une coloration rose. Par conséquent, les puits colorés en rose correspondent à ceux où la croissance bactérienne est observée, alors que ceux de couleur bleu-violet ne présentent aucune croissance bactérienne (Elshikh *et al*, 2016). À partir de la définition de la CMI, que la littérature définit comme la plus faible concentration d'un antimicrobien inhibant visuellement la croissance d'un microorganisme cible, les valeurs de CMI pour chaque  $\beta$ -lactamine exprimées par *E. coli* BL21 (DE3) ont été choisies en se basant sur l'inhibition de la croissance visible de bactéries (Figure 3.9).

### 3.3.2 Ampicilline (AMP)

Les résultats obtenus pour l'OXA-143 en face de l'ampicilline ont démontré un clair profil de résistance (>128 µg/ml) des bactéries détentrices de cette β-lactamase en présence de cet antibiotique pour la gamme (0,25 – 128 µg/mL) choisie. Malgré l'inconsistance dans le profil de croissance à l'essai 3 (Annexe III).

En revanche, les résultats obtenues pour le mutant P227S ont été pas concluants, une fois que dans les essais 2 et 3 (Annexes II et IV) les valeurs obtenues ne vont pas à l'encontre des attentes en ce qui concerne le mutant étant très faibles. Entre-temps, la valeur de CMI = 64 µg/ml obtenue pour les essais 1 et 4 sont cohérents avec le profil de résistance attendu pour le mutant.

Cependant, selon la littérature l'OXA-143 et l'OXA-24/40 (88% d'homologie) sont des β-lactamases qui démontrent des valeurs de CMI très élevées contre toutes les pénicillines (Toth *et al*, 2017; Tian *et al*, 2011; Gionco *et al*, 2012). Alors, en se basant sur les données publiées dans la littérature, et considérant que cette étude est la première faite pour le mutant *in vivo*, il est probable que les valeurs de CMI pour l'ampicilline soient de  $CMI_{OXA-143} = >128 \mu\text{g/ml}$  et  $CMI_{P227S} = 64 \mu\text{g/ml}$ .

### 3.3.3 Aztréonam (AZT)

Les résultats obtenus pour l'OXA-143 et son mutant en présence d'aztréonam ont été pas concluants. Cependant, dans les essais 2, 3 et 4 (Annexes II – VI) les valeurs acquises de CMI pour la protéine native sont plus élevées, ce qui suggère que les bactéries portant OXA-143-β-lactamase ont un profil plus résistant à cet antibiotique. Mais, ce résultat n'est pas significatif et doit être répété.

### 3.3.4 Ceftazidime (CTZ)

Les résultats obtenus pour l'OXA-143 et P227S en présence de ceftazidime démontrent un écart entre les valeurs de CMI des deux souches. Aux essais 1 et 3 (Annexe III et V) aucun effet distinctif entre les deux enzymes n'a été observé par rapport à la ceftazidime (0,06 µg/ml). À l'essai 2 (Annexes III et IV), la mutation P227S rend la bactérie plus sensible à l'action de cette β-lactamine (0,03 µg/ml) comparativement à la valeur de CMI de la souche sauvage (0,125

µg/ml). Contrairement à cet essai, à l'essai 4 la présence de l'enzyme OXA-143 rend la bactérie plus sensible à cet antibiotique (0,03 µg/ml) comparativement à son mutant (0,06 µg/ml).

Selon Antunes *et al.* (2019), la mutation P227S semble être en mesure d'augmenter l'affinité et l'efficacité catalytique par rapport à ce substrat lors d'essais catalytiques *in vitro*. Or, cette caractéristique ne semble pas se traduire *in vivo*, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette carbapénémase n'est pas encore considérée comme un membre des bactéries productrices des β-lactamases de spectre élargi (ESBL).

### **3.3.5 Méropénem (MER)**

Les résultats obtenus pour l'OXA-143 et P227S en présence de méropénem, une β-lactamine de type carbapénème, démontrent un clair profil de sensibilité produit par les bactéries détentrices de la mutation. L'analyse des valeurs acquises de CMI observées pour l'OXA-143 (4; >4 ; 0,125 et 0,25 µg/ml) comparativement à celles de P227S (0,5; 0,5; 0,03 et 0,06 µg/ml), sont généralement plus élevées pour tous les essais.

## 4 Discussion

---

### 4.1 Utilisation de la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Dans la présente étude, *E. coli* BL21 (DE3) a été choisie comme souche d'expression des protéines recombinantes. Les bactéries *E. coli* sont les plus utilisées dans les milieux académiques et industriels pour la production de protéines recombinantes hétérologues. En effet, cet hôte possède une excellente capacité d'expression et d'atteinte de densités cellulaires élevées à un faible coût (Fathi-Roudsari, Akhavian-Tehrani, et Maghsoudi 2016). Comparée à d'autres souches d' *E. coli*, elle présente certaines caractéristiques distinctes :

- Cette souche est dépourvue de la protéase lon, ce qui peut être avantageux pour la production de protéines sensibles à la dégradation protéique. Par exemple, par rapport à la souche *E. coli* DH5 $\alpha$ , connue pour sa capacité à cloner efficacement les gènes, BL21 est souvent préférée pour la production de protéines, car elle minimise la dégradation de la protéine cible.
- BL21 possède une forte capacité à produire des protéines en grande quantité grâce à la souche T7 lysozyme, ce qui peut être particulièrement bénéfique pour la production industrielle de protéines recombinantes. Comparativement à d'autres souches telles que JM109, BL21 offre souvent de meilleurs rendements pour l'expression de protéines difficiles à produire.

Cependant, BL21 peut présenter des limitations, notamment pour les protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles complexes. Dans de tels cas, d'autres souches comme *E. coli* Rosetta ou Origami peuvent être préférées car elles possèdent des mécanismes de réduction du codon rare et peuvent faciliter la production de protéines complexes ou contenant des ponts disulfure (Gomes, Monteiro, et Mergulhão, 2020).

Dans cette étude, la souche *E. coli* BL21(DE3) a été utilisée pour entreprendre les essais cellulaires, au détriment d'autres souches utilisées dans la littérature, comme *E. coli* TOP10 et *E. coli* DH10B. Ce choix a été motivé par les raisons suivantes :

Tout d'abord, l'utilisation des cellules BL21(DE3) est justifiée par le fait que le gène d'intérêt est sous contrôle du promoteur T7, qui nécessite une ARN polymérase T7 pour obtenir une transcription efficace. *A contrario*, les cellules TOP10 ne peuvent pas exprimer de protéines sous contrôle du promoteur T7 et n'encodent pas l'ARN polymérase T7 (Fathi-Roudsari, Akhavian-Tehrani, et Maghsoudi 2016). De plus, les cellules TOP10 et DH10B ne sont pas des

souches d'expression protéique. En effet, elles servent principalement à l'optimisation du clonage et de l'amplification plasmidique (Khodabakhsh et al. 2013). Finalement, les protéines OXA-143 et P227S sont exprimées à partir d'un vecteur pET28a(+), et lorsqu'un vecteur contenant un promoteur T7 est introduit dans une souche bactérienne exprimant la T7 RNA polymérase, l'ajout d'IPTG induit l'expression du gène cloné sous contrôle du promoteur T7.

L'opéron *lac* comprend le gène *lacZ* et le gène *lacI*. *LacI* code pour le répresseur de l'opéron *lac*, qui se lie à l'opérateur et empêche la transcription du gène *lacZ*. Lorsque l'IPTG est ajouté au milieu de culture, il se lie au répresseur *LacI*, modifiant sa structure et l'empêchant de se fixer à l'opérateur. Cela libère l'opérateur et permet à l'ARN polymérase de se lier au promoteur *lac*, déclenchant ainsi la transcription du gène *lacZ*. Le promoteur T7, quant à lui, est dépendant de la T7 RNA polymérase pour la transcription et est souvent utilisé pour induire la transcription de gènes clonés dans des vecteurs d'expression compatibles avec T7. Cette combinaison est celle privilégiée dans les milieux industriels pour exprimer une quantité élevée de protéines recombinantes (Li et al., 2022; Gomes, Monteiro, et Mergulhão, 2020).

## 4.2 Interprétation de l'analyse de cinétique enzymatique pour les enzymes OXA-143 et P227S

Dans le Tableau 4.1, une comparaison entre les valeurs expérimentales calculées dans la présente étude et les valeurs de référence utilisées pour l'étude de la cinétique enzymatique de l'OXA-143 et son mutant P227S contre la pénicilline G a été effectuée.

Tableau 4.1 : Paramètres de cinétique enzymatique de l'OXA-143 et P227S contre la pénicilline G.

Enzyme	Constantes cinétiques calculées dans la présente étude			Valeurs de référence <sup>a</sup>		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
OXA-143	145,2 $\pm$ 15	59,95	4,13 x 10 <sup>5</sup>	167,6	211	1,26 x 10 <sup>6</sup>
P227S	114,7 $\pm$ 10	63,33	5,52 x 10 <sup>5</sup>	47,4	100,6	2,12 x 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup>(V. U. Antunes et al. 2019)

Étant donné que la constante  $K_m$  indique l'affinité de l'enzyme pour un substrat, cette valeur doit être interprétée en considérant que plus elle est faible, plus la force de liaison entre l'enzyme et son ligand est forte (Emmert-streib, 1996). En analysant ces résultats expérimentaux, il est possible de déduire que, comme dans la littérature de référence, le mutant P227S possède une liaison légèrement plus forte pour la pénicilline G que l'enzyme sauvage. Le mutant P227S possède également une affinité légèrement plus forte que l'OXA-143 pour ce substrat ( $K_m = 114,7 \mu\text{M}$  relativement à  $145,2 \mu\text{M}$  chez l'OXA-143). Même si la différence entre le mutant et l'enzyme native s'avère moins prononcée que dans la littérature, les mêmes tendances sont observées au niveau de l'affinité.

La constante catalytique  $k_{\text{cat}}$  indique à quelle vitesse le complexe enzyme-substrat est transformé (Emmert-streib, 1996). On l'appelle également 'turnover number', soit la vitesse de transformation du substrat par l'enzyme en unité de temps. En analysant les résultats expérimentaux, il est possible d'observer que l'OXA-143 et son mutant possèdent une valeur de  $k_{\text{cat}}$  quasi identique, suggérant que la mutation n'a que peu d'effet sur la vitesse de la réaction catalytique avec la pénicilline G. Ces résultats sont différents de ceux des valeurs de la littérature, où le  $k_{\text{cat}}$  du mutant P227S est environ 2 fois plus faible que celui de l'OXA-143.

Le  $k_{\text{cat}}/K_m$  est une mesure de cinétique enzymatique qui reflète les événements de liaison et de catalyse, en indiquant combien de fois la vitesse varie conformément à la fréquence de liaison entre l'enzyme et le substrat. Ce paramètre indique l'efficacité de l'enzyme dans la conversion du substrat en produit (Srinivasan, 2022). Globalement, les différences de  $k_{\text{cat}}$  et de  $K_m$  que sont observées entre l'OXA-143 et le mutant P227S demeurent somme toute subtiles. En effet, l'efficacité catalytique ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) est pratiquement inchangée et demeure dans le même ordre de grandeur pour les deux enzymes caractérisées, tant pour les valeurs calculées dans la présente étude que celles publiées dans la littérature.

En effet, même si les valeurs publiées d'efficacité catalytique ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) permettent d'observer une différence de 1,7 fois plus élevées pour le mutant P227S par rapport à l'enzyme native en solution (une différence de 1,3 fois pour nos données expérimentales), il est fort probable que cette distinction demeure insuffisante pour justifier une amélioration significative de la résistance à la pénicilline G dans des conditions cellulaires, ce qui est régulièrement observé dans la littérature. Les données confirment toutefois la reproductibilité de l'efficacité catalytique observée dans la littérature, confirmant ainsi que les deux enzymes, OXA-143 et P227S, sont bien repliées et actives *in vitro*.

### 4.3 Analyse comparative des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Dans la présente étude, la CMI de deux  $\beta$ -lactamases liées aux deux dernières éclosions nosocomiales de bactéries à Gram-négatif dans des pays comme le Brésil et les États-Unis ont été évaluées. La mutation P227S de la  $\beta$ -lactamase OXA-143 offrirait une plus grande résistance à l'action des antibiotiques  $\beta$ -lactamines que la forme sauvage. Puisque cette mutation est située dans l'environnement du site actif de l'enzyme, le remplacement d'un résidu proline par une sérine à cette position pourrait influencer la spécificité de reconnaissance et/ou l'efficacité catalytique de l'enzyme face à certains substrats  $\beta$ -lactamines reconnus (Antunes et al., 2019).

Étant donné que la CMI indique la plus faible concentration d'un antimicrobien ayant une action inhibitrice, il est possible de déduire que pour l'interprétation et l'analyse de notre étude, plus élevée est la valeur de CMI, plus résistante à l'action de cet antibiotique est la souche, et par conséquent, supérieure sera l'efficacité de la  $\beta$ -lactamase.

Les essais de CMI ont été effectués sans IPTG, en considérant seulement l'expression basale des vecteurs d'expression. L'expression basale des vecteurs pET28a+ dans *E. coli* BL21 en l'absence d'IPTG, donc sans induction, est généralement maintenue à un niveau minimal. Les vecteurs pET28a+ utilisent le système de régulation T7 pour contrôler l'expression génique, ce qui signifie que sans l'inducteur IPTG, la polymérase T7 RNA et, par conséquent, l'expression du gène d'intérêt ne sont normalement pas activées dans les cellules hôtes BL21. Cependant, il est important de noter que malgré cet état inactif généralement observé, dans certains cas, une expression basale faible de la T7 RNA polymérase peut survenir à partir du promoteur LacUV5 présent sur le vecteur, ce qui pourrait conduire à une expression minimale du gène d'intérêt et entraîner une faible production de la protéine recombinante (Studier *et al.*, 1990).

Les résultats ont été sélectionnés de manière visuelle en employant la rézazurine, une méthode couramment utilisée en microbiologie. La rézazurine agit comme un indicateur coloré, changeant de couleur en fonction de l'activité métabolique des cellules bactériennes. En observant visuellement les changements de couleur dans les puits de la plaque de CMI, les concentrations spécifiques ont été choisies en tant que seuils représentatifs de l'inhibition bactérienne. Les valeurs obtenues dans le tableau résultant (Tableau 4.2) ont été choisies par la combinaison entre les valeurs expérimentales trouvés et les données dans la littérature.

Les valeurs identifiées dans cette étude ne sont pas absolues, mais se situent autour d'une certaine plage de valeurs. Elles peuvent varier, parfois étant légèrement supérieures ou inférieures à la valeur précisément trouvée. Par exemple, pour l'ampicilline en présence de l'OXA-

143, il était attendu des valeurs de CMI supérieures à 128 µg/ml. Les résultats expérimentaux actuels, en accord avec la littérature existante, suggèrent une tendance où les valeurs de CMI en présence d'ampicilline pour l'OXA-143 sont susceptibles d'être égales ou supérieures à 128 µg/ml. Divers facteurs peuvent influencer les variations des résultats entre un essai et autre, tels que les conditions de l'expérience, les méthodologies de mesure utilisées ou la quantité de protéine exprimé, en considérant que pour chaque essai une nouvelle expression a été effectuée. Ainsi, bien que des valeurs spécifiques aient été relevées, il est important de considérer ces résultats comme représentant une tendance générale plutôt qu'une valeur absolue fixe. Les valeurs globales de CMI obtenues expérimentalement pour l'OXA-143 et son mutant P227S sont présentées dans le Tableau 4.2.

**Tableau 4.2: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) expérimentales calculées pour les β-lactamases OXA-143 et P227S chez *E. coli* BL21(DE3) comparées aux valeurs utilisées comme référence dans la littérature calculée pour l'OXA-143 chez *E. coli* BL21(DE3) et pour les OXA-24/40 et 160 chez *E. coli* DH10B.**

Substrats	Valeurs expérimentales (µg/ml)		Valeurs de la littérature (µg/ml)		
	OXA-143	P227S	OXA-143	OXA-24/40	OXA-160
<b>AMP</b>	≥128	64	128-1024	128	16
<b>AZT</b>	≥0,008	-----	0,062	0,12-0,25	0,125
<b>CTZ</b>	≥0,06	≤0,06	0,25	0,25-0,5	-----
<b>MER</b>	≥4	≤0,05	1	0,125-0,5	0,016

(Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011; Toth et al. 2017; Tian et al., 2011)

Selon d'autres sources de la littérature, la mutation P227S a déjà été observée dans d'autres β-lactamases, comme chez l'OXA-24/40, créant ainsi l'OXA-160. Tel que mentionné aux sections 1.3.2 et 1.3.6, l'OXA-24/40 et l'OXA-143 partagent 88% de similarité. De plus, il faut signaler que la proline se trouve dans une région très proche du motif KSG et de la boucle β5-β6 (Santillana et al. 2007; Che et al. 2014, 2012; Evans et Amyes 2014; Tian et al. 2011). Ces deux composantes constituent le site actif de l'enzyme, le premier étant un motif très conservé parmi toutes les sérine-β-lactamases, alors que le deuxième affecte la catalyse des antibiotiques en jouant un rôle principal dans la reconnaissance et dans la capacité de l'enzyme d'effectuer la désacylation des substrats (Yoon et Jeong, 2021).

Nos résultats de CMI pour quelques substrats, comme l'aztréonam et la ceftazidime ne sont pas en concordance avec les données cinétiques *in vitro* de la littérature. Ainsi, il est possible que la mutation P227S ne soit pas stable seule ou qu'elle doive être combinée à d'autres mutations du site actif pour favoriser l'acquisition d'une résistance *in vivo*, comme chez OXA-160. Cela justifie l'importance de la comparaison des valeurs de CMI entre l'OXA-143 et l'OXA-24/40. En effet, la comparaison entre les valeurs de la mutation P227S et celles de l'OXA-160 donnent une perspective sur l'évolution de cette mutation chez la sous-famille des OXA- $\beta$ -lactamases. Il a été hypothétisé qu'en tenant compte de gains d'activité cinétique plus significatifs pour certains substrats, ce mutant pourrait offrir une protection plus forte à la bactérie que la  $\beta$ -lactamase OXA-143, ce qui semble être erroné pour certains antibiotiques.

#### **4.3.1 Analyse des résultats de concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ampicilline**

Les résultats de CMI par rapport l'ampicilline indiquent que l'OXA-143 est plus résistante que le mutant P227S pour cette pénicilline de première génération, mais la différence entre les deux enzymes demeure relativement faible (du simple au double). De manière générale, la valeur de CMI obtenue avec OXA-143 était similaire à celle de l'OXA-24/40, ainsi que les valeurs obtenues pour le mutant P227S par rapport à OXA-160 étaient cohérentes et inférieures aux valeurs de leur souches natives, respectivement. Démontrant que le profil de résistance bactérienne contre cet antibiotique n'est pas affecté de manière significative par cette mutation. Ainsi, les valeurs expérimentales observées pour l'OXA-143 et son mutant P227S se justifient par ce qui a déjà observé dans la littérature.

#### **4.3.2 Analyse des résultats de concentrations minimales (CMI) inhibitrices de l'aztréonam.**

Avant d'être identifiées comme une classe de  $\beta$ -lactamases à part entière dans les années 1970-1980, les OXA- $\beta$ -lactamases n'étaient considérées que comme des pénicillinases capables d'hydrolyser l'oxacilline et la cloxacilline à des taux de 50% plus élevés que la pénicilline G. La mutation P227S a clairement impacté l'activité catalytique envers de nouveaux substrats comme l'aztréonam. Alors que les deux enzymes ont montré une capacité à hydrolyser ce monobactame, le mutant P227S a démontré une efficacité catalytique supérieure à celle de l'enzyme sauvage. Cependant, malgré ces observations, les données expérimentales concernant les valeurs de CMI avec l'aztréonam n'ont pas permis de parvenir à des conclusions claires.

### 4.3.3 Analyse des résultats de concentrations minimales (CMI) inhibitrices de la ceftazidime

En ce qui concerne le ceftazidime, aucune variation significative n'a été observée entre les deux souches, ce qui permet de déduire que, selon ces résultats, la mutation n'a pas eu d'influence sur la réponse face à ce substrat. Même si ces résultats ne semblent pas corroborer avec les données *in vitro* observées dans la littérature (Antunes *et al*, 2019), ces données sont les premières acquises pour la susceptibilité aux antibiotiques en milieu cellulaire.

En ce qui concerne l'aztréonam et ceftazidime, plus d'études sont nécessaires pour identifier la tendance de plus récentes oxacilinasés, comme l'OXA-143, d'avoir ces antibiotiques dans son spectre de résistance. Bien que les études existantes puissent indiquer de résistance dans certaines populations bactériennes, l'adaptabilité microbienne est dynamique et complexe. Des nouvelles souches, mutations génétiques et mécanismes de résistance peuvent apparaître au fil du temps, déifiant les conclusions précédentes.

Les antibiotiques aztréonam et ceftazidime, ne sont pas les antibiotiques de premier secours dans le traitement de *A. baumannii*, les souches y étant exposées lors du traitement d'autres infections ou d'autres traitements prophylactiques. Comme par exemple, dans l'article de Tian *et al.*, 2011, où des isolats bactériens provenant d'une infection pulmonaire sévère ont été identifiées et producteurs de l'OXA-160 (OXA-24/40 avec la mutation P227S) avec un niveau de résistance très élevé envers l'aztréonam. Dans ce cas, le patient a également été infecté par *P. aeruginosa* une espèce qui a pour traitement commun les deux antibiotiques.

Par conséquent, pour bien comprendre les tendances émergentes en matière de résistance à ceftazidime et l'aztréonam des études approfondies et continues sont nécessaires. Cela implique la collecte de données dans différentes régions géographiques, une analyse génétique plus détaillée des bactéries résistantes et la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance.

De plus, cette étude visait à vérifier une hypothèse avancée par plusieurs auteurs dans la littérature : la mutation P227S dans l'OXA-143 pourrait induire une augmentation catalytique envers d'autres classes de bêtalactamines, en dehors de son spectre de résistance connu. Cette mutation pourrait potentiellement créer des ESBLs, car cette substitution favoriserait une flexibilité accrue dans la partie terminale de la boucle  $\beta 5$ - $\beta 6$ . Cette flexibilité accrue pourrait faciliter la formation de nouveaux ponts hydrogène avec d'autres résidus adjacents, impactant directement l'affinité avec les substrats et potentiellement élargissant la capacité de l'enzyme à catalyser des

antibiotiques au-delà de son spectre de résistance habituel (Mitchell *et al.*, 2015; June *et al.*, 2014).

Une hypothèse alternative susceptible d'accroître la résistance à l'antibiotique ceftazidime est liée à des mutations proches de la boucle  $\Omega$ . Entraînant une altération dans le processus de carboxylation de la lysine, ce qui pourrait contribuer à la résistance de la bactérie à la ceftazidime, comme dans la famille OXA-10 (Mitchell *et al.*, 2015).

#### **4.3.4 Analyse des résultats de concentrations minimales inhibitrices (CMI) du méropénem**

En ce qui concerne les résultats de CMI par rapport au méropénem, l'OXA-143 a conféré une plus grande résistance que le mutant P227S dans tous les essais cellulaires effectués.

Dans l'article de Antunes *et al.*, 2019, le mutant P227S a démontré une valeur d'efficacité catalytique environ 4 fois plus importante contre ce carbapénème, qui s'explique à la fois par une légère augmentation de l'affinité et de la constante catalytique (Antunes *et al.*, 2019). Dans d'autres références, cette augmentation d'activité a aussi été observée, s'expliquant principalement en raison du lieu de la mutation au début de la boucle  $\beta 5$ - $\beta 6$ . Cette substitution a engendré une réorganisation structurale significative de ce motif, affectant indirectement l'affinité de l'enzyme pour son ligand (Mitchell *et al.*, 2015).

Il faut souligner que le motif Pro227-X-X-Gly230 se retrouve à la partie C-terminale de la boucle  $\beta 5$ - $\beta 6$ , dans le point d'entrée du feuillet  $\beta 6$  dans le cœur de l'enzyme. De plus, ce motif se révèle présent seulement dans les LDHCs. Également, le motif K217-S218-G218, qui est très conservé au site actif de toutes les sérine- $\beta$ -lactamases, est en proximité. Ce motif est connu pour sa capacité d'agir contre les carbapénèmes. Ainsi, la mutation P227S entrainerait une réorganisation structurale dans un site de reconnaissance du substrat et provoquerait une augmentation d'activité carbapénémase (De Luca *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011; Girlich *et al.*, 2014; June *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2015).

Cependant, les valeurs expérimentales que observées en milieu cellulaire dans la présente étude ont démontré le contraire.

Deux observations peuvent potentiellement expliquer ces différences :

- 1) Les tests de susceptibilité aux antibiotiques effectués avec l'OXA-143 et son mutant P227S n'ont été entrepris qu'avec un seul carbapénème : le méropénem, alors que le traitement des infections causées par *A. baumannii* utilisent principalement le

doripénem et l'imipénem (Howard et al., 2012; Rodríguez, Nastro and Famiglietti, 2018).

- 2) Chez d'autres références où des essais de CMI ont été effectués (notamment entre l'OXA-24/40 et l'OXA-160), les résultats indiquent que les valeurs de résistance pour l'enzyme sauvage sont également plus élevées que chez les mutants. Ces résultats correspondent à ceux observés dans la présente étude. Dans les valeurs expérimentales, également la CMI de l'OXA-143 a été plus élevée.

Ainsi, les valeurs expérimentales de l'OXA-143 pour le méropénem démontrent une résistance claire à ce carbapénème. Dans la littérature, la valeur de CMI pour l'OXA-143 exprimée chez *E. coli* BL21 (DE3) est de 1 µg/ml (4 fois plus élevée que la nôtre). Comparativement aux valeurs de l'OXA-24/40, cet écart augmente de 8 fois. En ce qui concerne le mutant P227S, la comparaison avec OXA-160 indique des valeurs de CMI proches. Toutefois, il est difficile de conclure en une explication définitive quant aux différences de comportements observés pour le méropénem chez ces enzymes *in vitro* et *in vivo*.

#### **4.3.5 L'influence de la présence de l'IPTG sur les résultats de CMI**

La quantité de bêta-lactamases présentes dans une souche bactérienne peut influencer la CMI par rapport à un antibiotique bêta-lactamine. Une plus grande quantité de bêta-lactamases dans une souche bactérienne peut entraîner une résistance accrue aux antibiotiques bêta-lactamines. En conséquence, une souche bactérienne produisant des niveaux plus élevés de bêta-lactamases pourrait nécessiter des concentrations plus élevées de l'antibiotique pour inhiber sa croissance ou son activité, ce qui se reflète dans des valeurs de CMI plus élevées (Kowalska-Krochmal et Dudek-Wicher, 2021).

Lorsque l'IPTG est absent, une expression protéique basale ou non induite se produit, ce qui est appelé dans la littérature par « leaky » : sans l'ajout d'IPTG, il est fréquemment observé une expression de base de l'ARN polymérase T7 initiée par le promoteur *lacUV5*, provoquant ainsi une certaine expression de base ou "leaky" des gènes hétérologues positionnés sous le contrôle du promoteur T7. Cependant, quand le IPTG est ajouté les niveaux d'expression sont très élevés, au cas où la protéine cible représente jusqu'à 50% de la totalité des protéines cellulaires (Zhang *et al.*, 2015; Briand *et al.*, 2016).

Pour cette raison, il serait intéressant d'étudier ultérieurement de manière comparative les résultats de la CMI sans IPTG tels que rapportés par cette étude, et en présence d'IPTG. Une analyse comparative entre les valeurs de CMI avec et sans IPTG contribue à comprendre si les variations dans les niveaux d'expression protéique influencent l'efficacité des antibiotiques contre

les souches bactériennes, offrant ainsi des perspectives précieuses sur l'efficacité des antibiotiques et les mécanismes potentiels de résistance.



## 5 CONCLUSION

---

Les conditions d'expression et de purification de l'enzyme sauvage OXA-143 et de son mutant P227S ont été optimisées avec succès. L'essai de dénaturation thermique par dichroïsme circulaire a rendu possible la quantification de  $\text{NaHCO}_3$  nécessaire à la purification optimale du mutant P227S, en plus d'assurer la stabilité de la lysine catalytique carboxylée (100 mM  $\text{NaHCO}_3$ ). L'optimisation du protocole d'expression et de purification a également permis d'étendre l'analyse cinétique du mutant P227S envers des antibiotiques  $\beta$ -lactamines de génération subséquente.

Les paramètres de cinétique enzymatique obtenus pour la pénicilline G dans ces conditions démontrent une différence d'affinité pour ce substrat pour le mutant, mais l'efficacité catalytique du variant P227S demeure légèrement supérieure à celle de l'enzyme native, tel qu'observé dans la littérature. L'objectif a été atteint par la conservation de l'intégrité structurale et fonctionnelle des deux enzymes.

Par des tests *in vivo*, j'ai étudié les effets de la mutation P227S chez la  $\beta$ -lactamase OXA-143 à l'égard des tests de susceptibilité à certains antibiotiques de la classe des beta-lactamines. Les antibiotiques choisis étaient l'aztréonam, le méropénem, la ceftazidime et l'ampicilline. La méthode choisie était la microdilution en bouillon et la lecture des plaques a été effectuée grâce à la coloration à la résazurine. Afin de tester si la mutation de P227S offrirait possiblement une plus grande résistance à l'action des antibiotiques que la souche sauvage OXA-143 en milieu cellulaire, quatre essais de croissance bactérienne chez *E. coli* BL21(DE3) ont été effectués exprimant les enzymes clonées dans vecteur pET28a(+).

Ces résultats ont été analysés et comparés à des valeurs de référence publiées pour l'OXA-143, l'OXA-24/40 et l'OXA-160. Chaque essai a été traduit en valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI, en  $\mu\text{g/ml}$ ), qui correspond à la plus faible concentration d'un antibiotique qui empêche une population de bactéries de croître. L'analyse des résultats a permis de déduire que la valeur de CMI pour le mutant P227S était inférieure à celle de l'OXA-143 pour le méropénem et pour l'ampicilline, ce qui suppose que la mutation P227S rend la bactérie *E. coli* BL21(DE3) plus sensible aux carbapénèmes dans ce contexte *in vivo*. Puisqu'aucun changement de valeur de CMI n'a été observé avec la ceftazidime, la mutation ne semble provoquer aucune différence de croissance dans le contexte d'une survie bactérienne en présence de cette céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération. Pour l'aztreonam, l'OXA-143 a exprimé une plus grande sensibilité envers ce substrat.

Il reste une somme importante de travail à effectuer pour comprendre si la mutation P227S confère effectivement à l'OXA- $\beta$ -lactamase 143 une plus grande activité enzymatique, et par conséquent une plus grande résistance cellulaire aux  $\beta$ -lactamines. Il faudra éventuellement répéter les essais de CMI avec les antibiotiques testés et d'autres carbapénèmes, notamment l'imipénem et le doripénem puisque ces carbapénèmes sont fortement utilisés dans le traitement des infections contre *A. baumannii*.

À titre de représentants de la classe des LDHC, le fait que l'OXA-143 et son mutant P227S aient la capacité de catalyser l'hydrolyse de substrats antibiotiques qui ne sont pas habituellement utilisés dans le traitement de *A. baumannii* (ex. aztreonam et ceftazidime) démontre la capacité des bactéries à évoluer à une vitesse plus rapide que celle de l'être humain dans la production de médicaments pour les combattre. En suivant cette évolution, le développement de nouveaux monobactames et céphalosporines pourrait être priorisé, ainsi que celui de la synthèse de nouveaux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Tooke *et al*, 2019) (El-Ghali *et al*, 2023)(Naha and Ramaiah, 2023).

## 6 BIBLIOGRAPHIE

---

Abd Algaffar, S. O., A. Verbon, S. A. Khalid, et W. W.J. van de Sande (2022) « Development and validation of a resazurin assay for *in vitro* susceptibility testing of *Actinomadura madurae*: a common causative agent of actinomycetoma ». The Journal of antimicrobial chemotherapy 78 (1). NLM (Medline): 155 60. doi:10.1093/jac/dkac367.

AlAmri, Aisha M., Ameerah M. AlQurayan, Tunny Sebastian, et Amani M. AlNimr (2019) « Molecular Surveillance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* ». Current Microbiology - Springer Science 77 (3). Springer: 335 42. doi:10.1007/s00284-019-01836-z.

Aminov, Rustam I (2010) « A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future ». Frontiers in Microbiology 1 (134). Frontiers Research Foundation: 17. doi:10.3389/fmicb.2010.00134.

Antunes, Nuno T., et Jed F. Fisher (2014) « Acquired class D  $\beta$ -Lactamases ». Antibiotics 3 (3): 398 434. doi:10.3390/antibiotics3030398.

Antunes, Nuno T., Toni L. Lamoureux, Marta Toth, Nichole K. Stewart, Hilary Frase, et Sergei B. Vakulenko (2014) « Class D  $\beta$ -lactamases: Are they all carbapenemases? ». Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58 (4): 2119 25. doi:10.1128/AAC.02522-13.

Antunes, Víctor U., Edgar E. Llontop, Fernanda N. Da Costa Vasconcelos, Yossef López De Los Santos, Ronaldo J. Oliveira, Nilton Lincopan, Chuck S. Farah, Nicolas Doucet, Anthony Mittermaier, et Denize C. Favaro (2019) « Importance of the  $\beta$ 5- $\beta$ 6 Loop for the Structure, Catalytic Efficiency, and Stability of Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase Subfamily OXA-143 ». Biochemistry 58 (34): 3604 16. doi:10.1021/acs.biochem.9b00365.

Antunez, Cristina, Natalia Blanca-Lopez, Maria Jose Torres, Cristobalina Mayorga, Ezequiel Perez-Inestrosa, Maria Isabel Montañez, Tahia Fernandez, et Miguel Blanca (2006) « Immediate allergic reactions to cephalosporins: Evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins ». Journal of Allergy and Clinical Immunology 117 (2): 404 10. doi:10.1016/j.jaci.2005.10.032.

Bisswanger, Hans (2008) Enzyme kinetics: Principles and Methods. 2<sup>e</sup> éd. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Briand, L., G. Marcion, A. Kriznik, J. M. Heydel, Y. Artur, C. Garrido, R. Seigneuric, et F. Neiers (2016) « A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli* ». Scientific Reports 6 (septembre). Nature Publishing Group. doi:10.1038/srep33037.

Brown, Nicholas G., Sreejesh Shanker, B. V. Venkataram Prasad, et Timothy Palzkill (2009) « Structural and biochemical evidence that a TEM-1  $\beta$ -lactamase N170G active site mutant acts via substrate-assisted catalysis ». Journal of Biological Chemistry 284 (48): 33703 12. doi:10.1074/jbc.M109.053819.

Bush, Karen (2018a) « Past and Present Perspective on  $\beta$ -Lactamase Inhibitors ». Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62 (10): 1 20.

——— (2018b) « Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases ». Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. doi:10.1128/AAC.01076-18.

Bush, Karen, et Patricia A. Bradford (2016) «  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview ». Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 6 (8). Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/cshperspect.a025247.

Cavallo, J. D., R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp, et E. Garrabé (2004a) « Bêtalactamines ». EMC - Maladies Infectieuses. doi:10.1016/j.emcmi.2004.03.003.

———(2004b) « Bêtalactamines » EMC - Maladies Infectieuses. doi:10.1016/j.emcmi.2004.03.003.

Che, Tao, Christopher R. Bethel, Marianne Pusztai-Carey, Robert A. Bonomo, et Paul R. Carey (2014) « The different inhibition mechanisms of OXA-1 and OXA-24  $\beta$ -lactamases are determined by the stability of active site carboxylated lysine ». Journal of Biological Chemistry 289 (9): 6152 64. doi:10.1074/jbc.M113.533562.

Che, Tao, Robert A. Bonomo, Sivaprakash Shanmugam, Christopher R. Bethel, Marianne Pusztai-Carey, John D. Buynak, et Paul R. Carey (2012) « Carboxylation and decarboxylation of active site lysine 84 controls the activity of OXA-24  $\beta$ -lactamase of *Acinetobacter baumannii*: Raman crystallographic and solution evidence ». Journal of the American Chemical Society 134 (27): 11206 15. doi:10.1021/ja303168n.

Chen, Yu, George Minasov, Tomer A. Roth, Fabio Prati, et Brian, K. Shoichet (2006) « The deacylation mechanism of AmpC  $\beta$ -Lactamase at Ultrahigh Resolution ». Journal American Chemistry Society 128 (9): 2970 76.

Christensen, Soren Brogger (2021) « Drugs that changed society: History and current status of the early antibiotics: Salvarsan, sulfonamides, and  $\beta$ -lactams ». *Molecules*, octobre 7. doi:10.3390/molecules26196057.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2011) « Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21 ». Édité par Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania.

Costa, Pedro, Ana T.P.C. Gomes, Márcia Braz, Carla Pereira, et Adelaide Almeida (2021) « Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* inactivation mediated by phages ». *Antibiotics* 10 (8). MDPI AG. doi:10.3390/antibiotics10080974.

Crane, Benjamin, Jack P. Hughes, Samuel J. Rowley Neale, Mamun Rashid, Patricia E. Linton, Craig E. Banks, et Kirsty J. Shaw (2021) « Rapid antibiotic susceptibility testing using resazurin bulk modified screen-printed electrochemical sensing platforms ». *Analyst* 146 (18). Royal Society of Chemistry: 5574 83. doi:10.1039/d1an00850a.

Dijkshoorn, Lenie, Alexandr Nemeč, et Harald Seifert (2007) « An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ». *Nature Reviews Microbiology*, décembre. doi:10.1038/nrmicro1789.

Docquier, Jean Denis, Vito Calderone, Filomena De Luca, Manuela Benvenuti, Francesco Giuliani, Luca Bellucci, Andrea Tafi. (2009) « Crystal Structure of the OXA-48  $\beta$ -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases ». *Chemistry and Biology* 16 (5): 540 47. doi:10.1016/j.chembiol.2009.04.010.

Drawz, Sarah M., et Robert A. Bonomo (2010) « Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors ». *Clinical Microbiology Reviews*. doi:10.1128/CMR.00037-09.

Elshikh, Mohamed, Syed Ahmed, Scott Funston, Paul Dunlop, Mark McGaw, Roger Marchant, et Ibrahim M. Banat (2016) « Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants ». *Biotechnology Letters* 38 (6). Springer Netherlands: 1015 19. doi:10.1007/s10529-016-2079-2.

Emmert-streib, Frank (1996) « Current Statistical Methods for Estimating the  $K_m$  and  $V_{m\max}$  of Michaelis-Menten Kinetics », 945 61. doi:10.3390/make1030054.

Evans, Benjamin A., et Sebastian G.B. Amyes (2014) « OXA  $\beta$ -lactamases ». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (2). American Society for Microbiology: 241 63. doi:10.1128/CMR.00117-13.

Fathi-Roudsari, Mehrnoosh, Asal Akhavian-Tehrani, et Nader Maghsoudi (2016) « Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase ». *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 8 (1): 16 22.

Fernandes, Rúben, Paula Amador, et Cristina Prudêncio (2012) «  $\beta$ -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance ». *Reviews and Research in Medical Microbiology* 24 (1). Lippincott Williams and Wilkins: 7 17. doi:10.1097/MRM.0b013e3283587727.

Frippiat, Frédéric, Christelle Vercheval, Bernard Lambermont, et Pierre Damas (2013) « Is Extended or Continuous Infusion of Carbapenems the Obvious Solution to Improve Clinical Outcomes and Reduce Mortality? ». *Clinical Infectious Diseases* 57 (2): 324 25. doi:10.1093/cid/cit205.

Gan Q., Allen S. J., Taylor G. (2003) « Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. ». *Process Biochemistry* 38: 1003 18.

Gionco, Bárbara, Jacinta S. Pelayo, Emerson J. Venancio, Rodrigo Cayô, Ana C. Gales, et Floristher E. Carrara-Marroni (2012) « Detection of OXA-231, a new variant of blaOXA-143, in *Acinetobacter baumannii* from Brazil: A case report ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (10): 2531 32. doi:10.1093/jac/dks223.

Girija, Smiline As, Jayaseelan Vijayashree Priyadharsini, et Arumugam Paramasivam (2020) « Prevalence of carbapenem-hydrolyzing OXA-type  $\beta$ -lactamases among *Acinetobacter baumannii* in patients with severe urinary tract infection ». *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 67 (1). Akademiai Kiado ZRt.: 49 55. doi:10.1556/030.66.2019.030.

Girlich, Delphine, Quésia S. Damaceno, Adriana Cristina Oliveira, et Patrice Nordmann (2014) « OXA-253, a variant of the carbapenem-hydrolyzing class d  $\beta$ -lactamase OXA-143 in *Acinetobacter baumannii* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (5): 2976 78. doi:10.1128/AAC.02640-13.

Golemi, Dasantila, Laurent Maveyraud, Sergei Vakulenko, Jean-Pierre Samama, Shahriar Mobashery, et Christopher T Walsh (2001) « Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D  $\beta$ -lactamases ». *Biochemistry* 98 (25): 14280 85. www.rcsb.org.

Hall, Barry G., et Miriam Barlow (2005) « Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases [1] ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (6): 1050 51. doi:10.1093/jac/dki130.

He, Yunjiao, Jinping Lei, Xuehua Pan, Xuhui Huang, et Yanxiang Zhao (2020) « The hydrolytic water molecule of Class A  $\beta$ -lactamase relies on the acyl-enzyme intermediate ES\* for proper coordination and catalysis ». *Scientific Reports* 10 (1). Nature Research. doi:10.1038/s41598-020-66431-w.

Héritier, Claire, Laurent Poirel, Thierry Lambert, et Patrice Nordmann (2005) « Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (8): 3198 3202. doi:10.1128/AAC.49.8.3198-3202.2005.

Higgins, Paul G., Laurent Poirel, Marlene Lehmann, Patrice Nordmann, et Harald Seifert (2009) « OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (12): 5035 38. doi:10.1128/AAC.00856-09.

Howard, Aoife, Michael O'Donoghue, Audrey Feeney, et Roy D. Sleator (2012) « *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen ». *Virulence* 3 (3): 243 50. doi:10.4161/viru.19700.

IBA Solutions for Life Sciences (2021) « Expression and purification of proteins using 6xHistidine-tag: A comprehensive manual ». IBA Solutions for Life Sciences.

Jeon, Jeong Ho, Jung Hun Lee, Jae Jin Lee, Kwang Seung Park, Asad Mustafa Karim, Chang Ro Lee, Byeong Chul Jeong, et Sang Hee Lee (2015) « Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance ». *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi:10.3390/ijms16059654.

Joshua Lucate (2018) « Plasmid DNA miniprep protocol for EZ-10 Spin Column Plasmid DNA minipreps kit (BS413) ».

June, Cynthia M., Beth C. Vallier, Robert A. Bonomo, David A. Leonard, et Rachel A. Powers (2014) « Structural origins of oxacillinase specificity in class D  $\beta$ -lactamases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 333 41. doi:10.1128/AAC.01483-13.

Kaitany, Kip Chumba J., Neil V. Klinger, Cynthia M. June, Maddison E. Ramey, Robert A. Bonomo, Rachel A. Powers, et David A. Leonard (2013) « Structures of the class D carbapenemases OXA-23 and OXA-146: Mechanistic basis of activity against carbapenems,

extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (10): 4848-55. doi:10.1128/AAC.00762-13.

Khodabakhsh, Fatemeh, Zohreh Dehghani, Mohammad Farid Zia, Mohammad Rabbani, et Hamid Mir Mohammad Sadeghi (2013) « Cloning and Expression of Functional *Reteplase* in *Escherichia coli* TOP10 ». *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 5 (3): 168-75.

Kim, Chang-Ki, Yangsoo Lee, Hyukmin Lee, Gun-Jo Woo, Wonkeun Song, Mi-Na Kim, Wee-Gyo Lee, Seok Hoon Jeong, Kyungwon Lee, et Yunsop Chong (2010) « Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182 ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 68 (4): 432-38. doi:https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.07.014.

Kowalska-Krochmal, Beata, et Ruth Dudek-Wicher (2021) « The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance ». *Pathogens*. MDPI AG. doi:10.3390/pathogens10020165.

Kyriakidis, Ioannis, Eleni Vasileiou, Zoi Dorothea Pana, et Athanasios Tragiannidis (2021) « *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms ». *Pathogens*. MDPI AG. doi:10.3390/pathogens10030373.

Lamotte-Brasseur, Josette, James Knox, Judith A. Kelly, Paulette Charlier, Eveline Fonze, Otto Dideberg, et Jean Marie Frère (1994) « The structures and catalytic mechanisms of active-site serine  $\beta$ -lactamases ». *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 12 (1): 189-230. doi:10.1080/02648725.1994.10647912.

Laurent, Maveyraud, Golemi Dasantila, P. Kotra Lakshmi, Tranier Samuel, Vakulenko Sergei, Mobashery Shahriar, et Samama Jean-Pierre (2000) « Insights into Class D  $\beta$ -lactamases Are Revealed by the Crystal Structure of the OXA10 Enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* ». *Structures* 8 (décembre): (1289) 98.

Lemos, E. V., F. P. de la Hoz, T. R. Einarson, W. F. Mcghan, E. Quevedo, C. Castañeda, et K. Kawai (2014) « Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: Systematic review and meta-analysis ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (5). Blackwell Publishing Ltd: 416-23. doi:10.1111/1469-0691.12363.

Leonard, David A., Robert A. Bonomo, et Rachel A. Powers (2013) « Class D  $\beta$ -lactamases: A reappraisal after five decades ». *Accounts of Chemical Research* 46 (11): 2407-15. doi:10.1021/ar300327a.

Li, Lele, Hui Li, Qingwu Tian, Baosheng Ge, Xiaotong Xu, Yuanyuan Chi, Huaizhi Zhao (2022) « Expression and purification of soluble recombinant  $\beta$ -lactamases using *Escherichia coli* as expression host and pET-28a as cloning vector ». *Microbial Cell Factories* 21 (244). BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s12934-022-01972-5.

Luca, Filomena De, Manuela Benvenuti, Filippo Carboni, Cecilia Pozzi, Gian Maria Rossolini, Stefano Mangani, et Jean Denis Docquier (2011) « Evolution to carbapenem-hydrolyzing activity in noncarbapenemase class D  $\beta$ -lactamase OXA-10 by rational protein design ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45): 18424-29. doi:10.1073/pnas.1110530108.

Marchal, Stéphane, Josep Font, Marc Ribó, Maria Vilanova, Robert S. Phillips, Reinhard Lange, et Joan Torrent (2009) « Asymmetric kinetics of protein structural changes ». *Accounts of Chemical Research* 42 (6). American Chemical Society: 778-87. doi:10.1021/ar800266r.

Mitchell, Joshua M., Jozlyn R. Clasman, Cynthia M. June, Kip Chumba J. Kaitany, James R. LaFleur, Magdalena A. Taracila, Neil V. Klinger (2015) « The Structural Basis of Activity against Aztreonam and Extended Spectrum Cephalosporins for Two Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamases from *Acinetobacter baumannii* ». *Biochemistry* 54 (10). American Chemical Society: 1976-87. doi:10.1021/bi501547k.

Mohr, John F. (2008) « Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections ». *Clinical Infectious Diseases* 47 (.1): 41-51. doi:10.1086/590065.

Oshina, Ilze, et Janis Spigulis (2021) « Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations ». *Journal of Biomedical Optics* 26 (10). SPIE-Intl Soc Optical Eng. doi:10.1117/1.jbo.26.10.100901.

Patel, Vivek (2012) *Chemical Kinetics*. Édité par Vivek Patel et T. Smiljanic. 1<sup>ère</sup> éd. Rijeka, Croatia: InTech.

Périchon, Bruno, Sylvie Goussard, Violaine Walewski, Lenka Krizova, Gustavo Cerqueira, Cheryl Murphy, Michael Feldgarden (2014) « Identification of 50 class D  $\beta$ -lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (2): 936-49. doi:10.1128/AAC.01261-13.

Poole, K. (2004) « Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (17): 2200-2223. doi:10.1007/s00018-004-4060-9.

Punekar, N. S. (2018) Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-13-0785-0\_22.

Queenan, Anne Marie, et Karen Bush (2007) « Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases ». Clinical Microbiology Reviews. doi:10.1128/CMR.00001-07.

Ratnaningsih, Enny, et Sadiyah Achmad (2008) « Characterization of Extracellular Penicillin G Acylase Produced by A New Local Strain of *Bacillus subtilis* ». Hayati Journal of Biosciences 15 (2): 71 76.

Rodríguez, Carlos Hernán, Marcela Nastro, et Angela Famiglietti (2018) « Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America ». Revista Argentina de Microbiologia 50 (3). doi:10.1016/j.ram.2017.10.006.

Rollinson, George N. (1998) « Forty years of  $\beta$ -lactam research ». Journal of Antimicrobial Chemotherapy 41 (février): 589 603.

Santillana, Elena, Alejandro Beceiro, Germá Bou, et Antonio Romero (2007) « Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis ». [www.pnas.org](http://www.pnas.org) doi10.1073/pnas.0607557104.

Sarikhani, Zohreh, Razieh Nazari, et Mahmoud Nateghi Rostami (2017) « First report of OXA-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran ». Iranian Journal of Basic Medical Sciences 20 (11): (1282) 86. doi:10.22038/IJBMS.2017.9490.

Sarker, Satyajit D., Lutfun Nahar, et Yashodharan Kumarasamy (2007) « Microlitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals ». Methods 42 (4): (321) 24 doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006.

Scheffers, Dirk-Jan, et Mariana G. Pinho (2005) « Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies ». Microbiology and Molecular Biology Reviews 69 (4). American Society for Microbiology: (585) 607. doi:10.1128/mnbr.69.4.585-607.2005.

Smith, Clyde A., Nuno Tiago Antunes, Nichole K. Stewart, Marta Toth, Malika Kumarasiri, Mayland Chang, Shahriar Mobashery, et Sergei B. Vakulenko (2013) « Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23  $\beta$ -Lactamase from *Acinetobacter baumannii* ». Chemistry and Biology 20 (9): (1107) 15 doi:10.1016/j.chembiol.2013.07.015.

Song, Xiangqing, Yi Wu, Lizhi Cao, Dunwu Yao, et Minghui Long (2019) « Is Meropenem as a Monotherapy Truly Incompetent for Meropenem-Nonsusceptible Bacterial Strains? A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling With Monte Carlo Simulation. » *Frontiers in Microbiology* 10 (2777): (1) 15. doi:10.3389/fmicb.2019.02777.

Sridhar Rao, P.N. (2012) « Extended spectrum  $\beta$ -lactamases ». microrao. www.microrao.com.

Srinivasan, Bharath (2022) « A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond ». *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc. doi:10.1111/febs.16124.

Stojanoski, Vlatko, Carolyn J. Adamski, Liya Hu, Shrenik C. Mehta, Banumathi Sankaran, Peter Zwart, B. V. Venkataram Prasad, et Timothy Palzkill (2016) « Removal of the side chain at the active-site serine by a glycine substitution increases the stability of a wide range of serine  $\beta$ -lactamases by relieving steric strain ». *Biochemistry* 55 (17). American Chemical Society: (2479) 90. doi:10.1021/acs.biochem.6b00056.

Suárez, Cristina, et Francesc Gudiol (2009) « Antibióticos betalactámicos » *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27 (2) : (116) 29 doi:https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001.

Sykes, R B, et D P Bonner (1985a) « Aztreonam: The first monobactam ». *The American Journal of Medicine* 78 (2, Supplement 1): 2 10. doi:https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90196-2.

———(1985b) « Discovery and Development of the Monobactams ». *Reviews of Infectious Diseases* 7 (Supplement\_4): S579 93. doi:10.1093/clinids/7.Supplement\_4.S579.

Taylor, Doris Mia, Justin Anglin, Liya Hu, Lingfei Wang, Banumathi Sankaran, Jin Wang, Martin M. Matzuk, B. V. Venkataram Prasad, et Timothy Palzkill (2021) « Unique Di-acidic Fragments Inhibit the OXA-48 carbapenemase and Enhance the Killing of *Escherichia coli* Producing OXA-48 ». *ACS Infectious Diseases* 7 (12): (3345) 54 doi:10.1021/acsinfecdis.1c00501.

Tian, Guo Bao, Jennifer M. Adams-Haduch, Tatiana Bogdanovich, Anthony W. Pasculle, John P. Quinn, Hong Ning Wang, et Yohei Doi (2011) « Identification of diverse OXA-40 group carbapenemases, including a novel variant, OXA-160, from *Acinetobacter baumannii* in Pennsylvania ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (1): 429 32. doi:10.1128/AAC.01155-10.

Tooke, Catherine L., Philip Hinchliffe, Eilis C. Bragginton, Charlotte K. Colenso, Viivi H.A. Hirvonen, Yuiko Takebayashi, et James Spencer (2019a) «  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase

Inhibitors in the 21st Century ». *Journal of Molecular Biology* 431 (18). doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002.

Toth, Marta, Clyde A. Smith, Nuno T. Antunes, Nichole K. Stewart, Lauren Maltz, et Sergei B. Vakulenko (2017) « The role of conserved surface hydrophobic residues in the carbapenemase activity of the class D  $\beta$ -lactamases ». *Acta Crystallographica: Structural Biology* 73 (D). International Union of Crystallography: 692-701 doi:10.1107/S2059798317008671.

Vandavasi, Venu Gopal, Patricia S. Langan, Kevin L. Weiss, Jerry M. Parks, Jonathan B. Cooper, Stephan L. Ginell, et Leighton Coates (2017) « Active-site protonation states in an acyl-enzyme intermediate of a class A  $\beta$ -lactamase with a monobactam substrate ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (1). American Society for Microbiology. doi:10.1128/AAC.01636-16.

Verma, Vidhu, Sebastian A. Testero, Kaveh Amini, William Wei, Jerome Liu, Naresh Balachandran, Tharseekan Monoharan, Siobhan Stynes, Lakshmi P. Kotra, et Dasantila Golemi-Kotra (2011) « Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Acinetobacter baumannii* ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37292-303. doi:10.1074/jbc.M111.280115.

Vollmer, Waldemar, Didier Blanot, et Miguel A. De Pedro. (2008) « Peptidoglycan structure and architecture ». *FEMS Microbiology Reviews*, mars. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.

Williamson, Russell, et Laurent Gutmann (1987) « Paroi bactérienne et bêta-lactamines ». *Synthèse* 3 (2): 75-81.

Yoon, Eun Jeong, et Seok Hoon Jeon (2021a) « Class D  $\beta$ -lactamases ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press. doi:10.1093/jac/dkaa513.

———(2021b) « Class D  $\beta$ -lactamases ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press. doi:10.1093/jac/dkaa513.

ZanDer, Esther, Rémy A. Bonnin, Harald Seifert, et Paul G. Higgins (2014) « Characterization of blaOXA-143 variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (5): 2704-8. doi:10.1128/AAC.02618-13.

Zhang, Zhe, Grietje Kuipers, Łukasz Niemiec, Thomas Baumgarten, Dirk Jan Slotboom, Jan Willem de Gier, et Anna Hjelm (2015) « High-level production of membrane proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG ». *Microbial Cell Factories* 14 (1). BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s12934-015-0328-z.



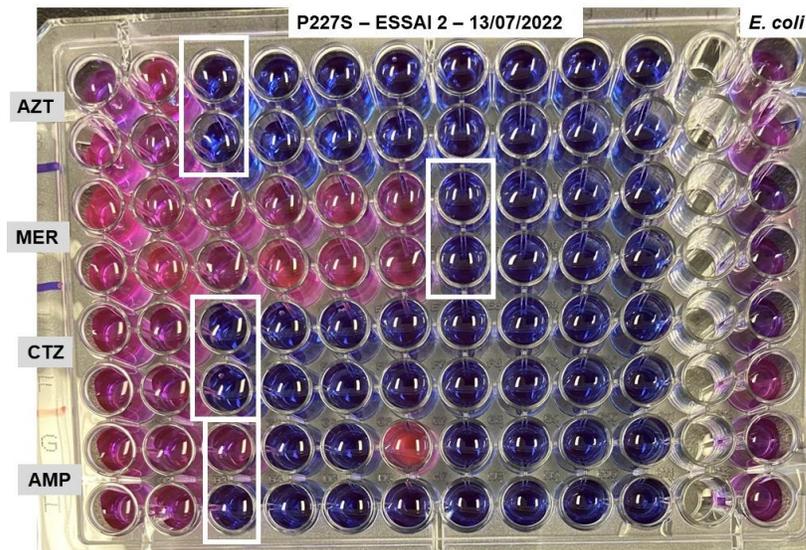


## 7 Annexe



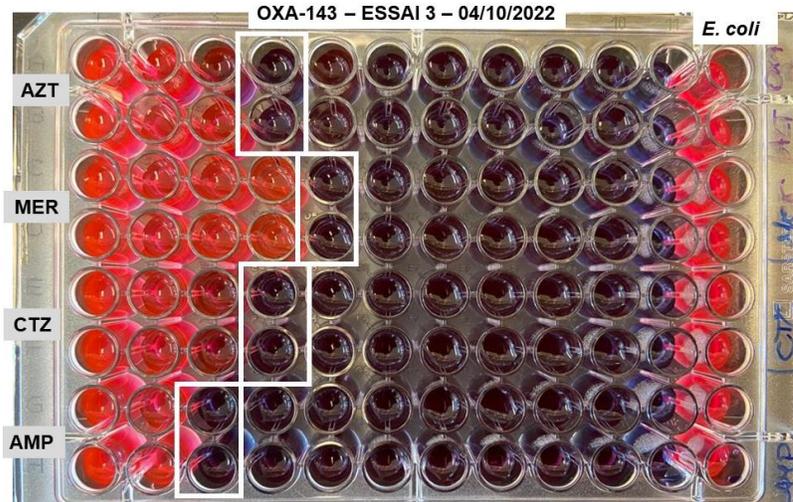
**Annexe I :** Plaques de CMI de l'essai 2 pour l'OXA-143.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. La colonne 12 démarque le contrôle positif de croissance (*E. coli*).



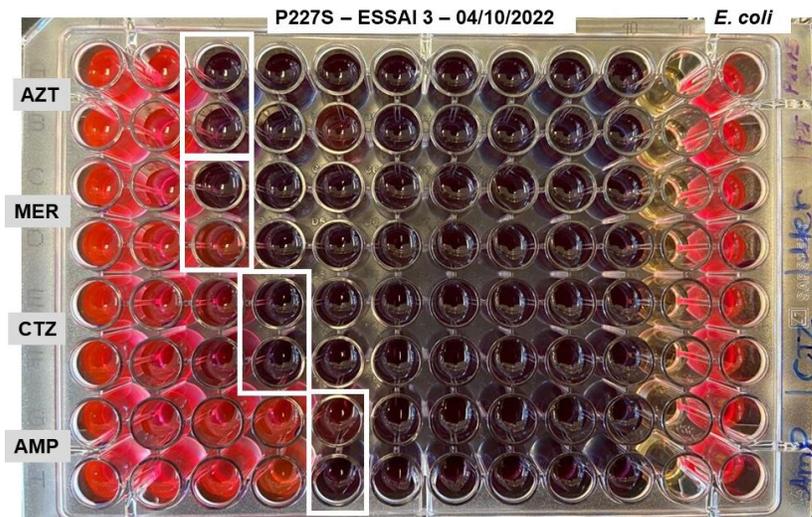
**Annexe II:** Plaques de CMI de l'essai 2 pour le mutant P227S.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. La colonne 12 démarque le contrôle positif de croissance (*E. coli*).



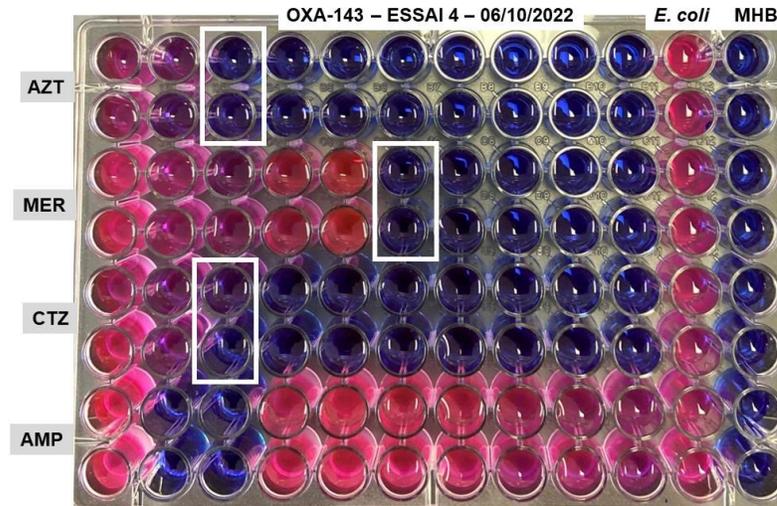
**Annexe III:** Plaques de CMI de l'essai 3 pour l'OXA-143.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. La colonne 12 démarque le contrôle positif de croissance (*E. coli*).



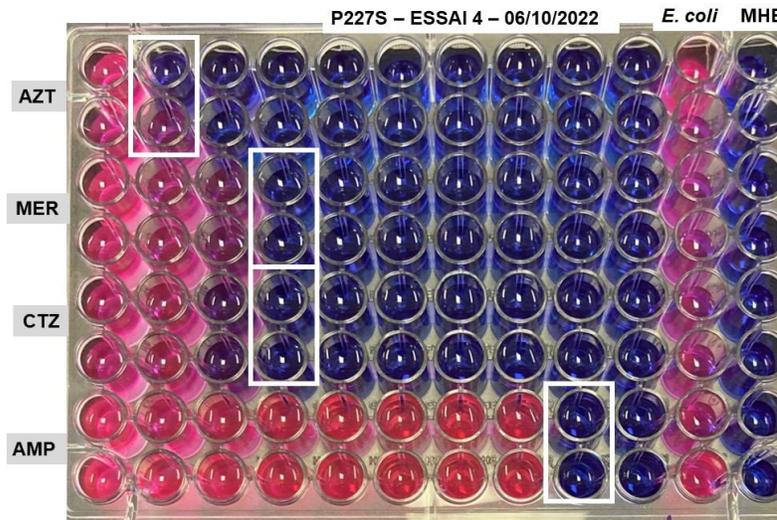
**Annexe IV :** Plaques de CMI de l'essai 3 pour le mutant P227S.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. La colonne 12 démarque le contrôle positif de croissance (*E. coli*).



**Annexe V :** Plaques de CMI de l'essai 4 pour l'OXA-143.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. La colonne 11 démarque le contrôle positif de croissance (*E. coli*) et négatif (MHB).



**Annexe VI :** Plaques de CMI de l'essai 4 pour le mutant P227S.

Les puits A-B correspondent à un duplicata de la croissance bactérienne observée en présence d'aztréonam, C-D méropénem, E-F ceftazidime et G-H ampicilline. Les carrés blancs démarquent les zones où les valeurs de CMI ont été observées. La colonne 11 démarque le contrôle positif de croissance (*E. coli*) et négatif (MHB).