

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DU POTENTIEL SYNERGIQUE DES MUTATIONS DE
RÉSISTANCE AUX INHIBITEURS DE LA β -LACTAMASE BLAC DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Par
Philippe Egesborg

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Peter Tijssen
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Alexis Vallée-Bélisle
Département de chimie
Université de Montréal

Directeur de recherche

Nicolas Doucet
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier Nicolas de m'avoir donné une chance comme stagiaire alors que j'étais au baccalauréat. Depuis, j'ai passé les années les plus intéressantes de mon cheminement d'apprentissage dans son labo, j'ai rencontré un groupe tissé serré et découvert la très belle communauté de l'INRS-Institut Armand-Frappier. La flexibilité qu'il laisse à ses étudiants et sa porte constamment ouverte sont très appréciés. Aussi, sans lui, je ne connaîtrais pas la vraie définition de ce qu'est une image HD.

Je voudrais également remercier les membres du laboratoire, autant les anciens que les nouveaux. Merci à Hélène, ma partenaire de lab et complice durant une bonne partie de mon temps à l'institut ; ton amitié est précieuse et le projet de BlaC n'aurait pas avancé si vite sans notre collaboration quasi-symbiotique. Merci à Donald, présent au labo du lever au coucher du soleil, qui s'en va bientôt ; le labo sera étrangement vide quand tu seras parti. Merci à David, qui a toujours raison (jusqu'à maintenant...). Merci à Guillaume, qui nous amène faire des sorties dont on se souvient longtemps. Merci à Chitra, Yossef, Georgios et Jacinthe : vous n'avez pas été présent au labo depuis longtemps mais vous faites déjà partie de la famille. Merci à Aïssa, Félix, Carol-Anne et Bruno, nos stagiaires de l'été 2013 et 2014 avec qui on a passé de supers étés.

Merci également aux professeurs de l'axe microbiologie et biotechnologie qui ont su créer une superbe communauté scientifique où les différents laboratoires collaborent ensemble facilement ; je sais aujourd'hui que nous sommes privilégiés. Je voudrais également remercier l'INRS-Institut Armand-Frappier pour leur soutien financier qui nous permet de nous concentrer sur notre recherche.

En dernier lieu, merci à mes parents de m'avoir soutenu dans les périodes plus difficiles. Une autre étape de franchise !

RÉSUMÉ

La résistance bactérienne aux antibiotiques de type β -lactame est un problème majeur menaçant le succès des traitements contre les maladies infectieuses à travers le monde. *Mycobacterium tuberculosis* a toujours été particulièrement résiliente contre les β -lactames en raison de sa β -lactamase BlaC, une hydrolase à spectre large encodée dans son chromosome pouvant inactiver la vaste majorité des β -lactames utilisés en clinique. Néanmoins, de récentes études ont montré que certaines combinaisons de β -lactames et d'inhibiteurs de β -lactamases peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des souches extrêmement résistantes aux médicaments (XDR) de *M. tuberculosis*, procurant avec succès de nouveaux outils à employer contre les souches résistantes. Dans la présente étude, nous avons effectué des substitutions combinatoires dans le site actif de BlaC pour démontrer que des mutations spécifiques aux positions 69, 130, 220 et/ou 234 peuvent agir de manière synergique pour générer des variantes possédant une résistance au clavulanate plusieurs milliers de fois supérieure *in vitro*. Alors que la plupart des mutants simples et doubles demeurent sensible au clavulanate, les variantes double R220S-K234R et S130G-K234R sont substantiellement moins affectées par l'inactivation par le clavulanate, montrant une activité hydrolytique résiduelle de 46% et 83% après 24 h d'incubation avec l'inhibiteur. Ces résultats démontrent que des altérations dans le site actif de BlaC peuvent générer des mutants résistants qui demeurent actifs et stables pour une durée de temps compatible avec la prolifération de *M. tuberculosis*. Ces résultats mettent en emphase le formidable potentiel d'adaptation des mutations de résistance aux inhibiteurs chez les β -lactamases, jetant potentiellement une ombre sur certaines combinaisons de β -lactames et d'inhibiteur de BlaC étant utilisées comme traitement contre *M. tuberculosis*.

Mots clés : β -lactamases de classe A ; β -lactames ; résistance aux antibiotiques ; *Mycobacterium tuberculosis* ; mutagénèse dirigée ; clavulanate ; mutagénèse combinatoire ; BlaC ; cinétique enzymatique ; cinétique d'inhibition.

ABSTRACT

*Bacterial resistance to β -lactam antibiotics is a global issue threatening the success of infectious disease treatments worldwide. *Mycobacterium tuberculosis* has been particularly resilient to β -lactam treatment, primarily due to the chromosomally encoded BlaC β -lactamase, a broadspectrum hydrolase that renders ineffective the vast majority of relevant β -lactam compounds currently in use. Recent laboratory and clinical studies have nevertheless shown that specific β -lactam–BlaC inhibitor combinations can be used to inhibit the growth of extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis*, effectively offering new tools for combined treatment regimens against resistant strains. In the present work, we performed combinatorial active-site replacements in BlaC to demonstrate that specific inhibitor-resistant substitutions at positions 69, 130, 220 and/or 234 can act synergistically to yield active-site variants with several thousand fold greater in vitro resistance to clavulanate, the most common clinical β -lactamase inhibitor. While most single and double variants remain sensitive to clavulanate, double mutants R220S-K234R and S130G-K234R are substantially less affected by time-dependent clavulanate inactivation, showing residual β -lactam hydrolytic activities of 46% and 83% after 24h incubation with the inhibitor. These results demonstrate that active site alterations in BlaC yield resistant variants that remain active and stable over prolonged bacterial generation times compatible with mycobacterial proliferation. These results emphasize the formidable adaptive potential of inhibitor-resistant substitutions in β -lactamases, potentially casting a shadow on specific β -lactam–BlaC inhibitor combination treatments against *M. tuberculosis*.*

*Keywords : Class A β -lactamases; β -lactam; antibiotic resistance; *Mycobacterium tuberculosis*; site-directed mutagenesis; clavulanate; combinatorial mutagenesis; BlaC; enzyme kinetics; inhibition kinetics.*

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | III |
| RÉSUMÉ..... | V |
| ABSTRACT..... | VII |
| TABLE DES MATIERES | IX |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XI |
| LISTE DES FIGURES..... | XIII |
| LISTE DES ÉQUATIONS | XV |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | XVII |
| CHAPITRE 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 LA TUBERCULOSE | 1 |
| 1.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 1 |
| 1.1.2 <i>Pathogénèse de la tuberculose</i> | 2 |
| 1.1.3 <i>Traitement de la tuberculose</i> | 3 |
| 1.2 LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES | 5 |
| 1.2.1 <i>Historique des antibiotiques</i> | 5 |
| 1.2.2 <i>La pression sélective</i> | 6 |
| 1.2.3 <i>Les mécanismes de résistance aux antibiotiques</i> | 7 |
| 1.3 LES β -LACTAMES ET LES β -LACTAMASES | 8 |
| 1.3.1 <i>Mécanisme d'action des β-lactames</i> | 9 |
| 1.3.2 <i>Les β-lactamases</i> | 9 |
| 1.3.3 <i>BlaC, la β-lactamase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></i> | 12 |
| 1.3.4 <i>Inhibition des β-lactamases par le clavulanate</i> | 15 |
| 1.4 PROJET DE RECHERCHE..... | 17 |
| 1.4.1 <i>Problématique</i> | 17 |
| 1.4.2 <i>Hypothèse et objectifs de recherche</i> | 18 |
| 1.5 METHODOLOGIE | 19 |
| 1.5.1 <i>Objectif 1 : Génération des mutants IRT de BlaC</i> | 19 |
| 1.5.2 <i>Objectif 2 : Expression et purification des variantes de BlaC</i> | 21 |
| 1.5.3 <i>Objectif 3 : Caractérisation cinétique des variantes de BlaC</i> | 21 |
| CHAPITRE 2. ARTICLE | 25 |
| 2.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS | 25 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| 2.2 | RESUME DE L'ARTICLE | 25 |
| CHAPITRE 3. | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 37 |
| | RÉFÉRENCES..... | 41 |
| | ANNEXE 1. ARTICLE SUPPORTING INFORMATION..... | 45 |
| | ANNEXE 2. SEQUENCE DU GENE <i>blaC</i> OPTIMISÉ POUR <i>E. COLI</i>..... | 51 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|------------|---|----|
| Article : | <i>Table I. Thermal denaturation of WT and mutant BlaC β-lactamase variants monitored by CD spectroscopy.....</i> | 30 |
| | <i>Table II. β-lactam hydrolysis by WT BlaC and several single/double variants.....</i> | 30 |
| | <i>Table III. Inhibition of WT BlaC and single/double variants by clavulanate.....</i> | 31 |
| Annexe 1 : | <i>Table S1. Percentage sequence identity between BlaC (<i>M. tuberculosis</i>), BlaA (<i>Y. enterocolitica</i>), TEM-1 (<i>E. coli</i>) and SHV-1 (<i>K. pneumoniae</i>) β-lactamases.</i> | 45 |
| | <i>Table S2. Substrate and inhibitor concentrations used in the present study.</i> | 45 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----------|
| Figure 1.1. Structure chimique des antibiotiques de première ligne employés pour traiter une infection par <i>M. tuberculosis</i> | 4 |
| Figure 1.2. Structure chimique de (A) l'ampicilline, un β -lactame, et du (B) clavulanate, un inhibiteur de β -lactamases. | 8 |
| Figure 1.3. Comparaison de la structure chimique du (A) D-alanyl-D-alanine et d'un (B) β -lactame de type pénème. | 9 |
| Figure 1.4. Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse d'un pénème par BlaC. | 11 |
| Figure 1.5. Structure de base des différents types d'antibiotiques β -lactames. | 12 |
| Figure 1.6. Superposition de la structure cristalline de BlaC (bleu), TEM-1 (cyan) et SHV-1 (vert), des homologues structuraux de la classe A des β -lactamases..... | 13 |
| Figure 1.7. Structure de la β -lactamase BlaC et de son site actif..... | 14 |
| Figure 1.8. Alignement de séquences des β -lactamases de classe A BlaC, TEM-1 et SHV-1. | 15 |
| Figure 1.9. Mécanisme réactionnel proposé de l'inactivation de BlaC par le clavulanate. | 16 |
| Figure 1.10. Superposition du site actif de BlaC (bleu), TEM-1 (cyan) et SHV-1 (vert). | 20 |
| Article : <i>Figure 1. Structures of β-lactam antibiotics used in this study.</i> | <i>27</i> |
| <i>Figure 2. Structural overlay of BlaC, TEM-1 and SHV-1 β-lactamases.....</i> | <i>29</i> |
| <i>Figure 3. Circular dichroism spectra of WT BlaC and IRT variants.</i> | <i>29</i> |
| <i>Figure 4. Time-dependent enzyme inactivation of BlaC and IRT variants by clavulanate.</i> | <i>32</i> |
| Annexe 1 : <i>Figure S1. Sequence alignment between SHV-1 (<i>K. pneumoniae</i>), TEM-1 (<i>E. coli</i>), BlaC (<i>M. tuberculosis</i>) and BlaA (<i>Y. enterocolitica</i>) β-lactamases.</i> | <i>48</i> |
| <i>Figure S2. Examples of inhibition data and fits to the Krippendorf equation.....</i> | <i>49</i> |
| <i>Figure S3. Examples of linear plots from the titration data.</i> | <i>50</i> |

LISTE DES ÉQUATIONS

| | |
|--|----|
| Équation 1. Loi de Beer-Lambert | 22 |
| Équation 2. Modèle cinétique de Michaelis-Menten..... | 22 |
| Équation 3. Modèle d'inhibition irréversible de Krippendorff <i>et al.</i> | 23 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

MDR : *multi-drug resistant*

XDR : *extensively drug resistant*

TDR : *totally drug resistant*

PBP : *penicillin binding protein*

ESBL : *extended spectrum beta-lactamase*

IRT : *inhibitor resistant TEM*

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 La tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* ayant longtemps été une cause de mortalité pour l'être humain.¹ Des écrits datant de la Grèce antique détaillaient déjà une maladie similaire à la tuberculose, pouvant emporter les membres les plus jeunes et talentueux de la société, contrairement à plusieurs autres maladies qui semblaient s'en prendre davantage aux individus âgés ou affaiblis.² Encore aujourd'hui, bien qu'elle soit beaucoup moins présente dans les pays industrialisés qu'elle ne l'ait été vers le milieu des années 1980, la tuberculose demeure un enjeu de santé majeur dans les pays du tiers-monde ainsi que dans plusieurs pays en voie de développement, étant responsable de près de 2 millions de morts par année.^{2,3} La présence de *M. tuberculosis* est pandémique, l'OMS estimant que le tiers de la population mondiale (principalement en Afrique, en Asie et en Europe de l'est) est infectée par la bactérie.³ La très grande majorité des individus demeurent asymptomatiques, leur système immunitaire étant en mesure de confiner la bactérie.^{2,3} Cependant, une personne possédant une infection latente par *M. tuberculosis* demeure vulnérable à une résurgence de la maladie s'il advient que son système immunitaire soit affaibli.^{2,3}

1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie aérophile découverte par Robert Koch en 1882.⁴ Comme les autres espèces du genre *Mycobacterium*, elle possède une épaisse paroi bactérienne composée de lipides, d'acide mycolique et de peptidoglycane ayant des propriétés uniques telle qu'une résistance accrue à plusieurs antibiotiques et antiseptiques.^{4,5} Cette paroi possède notamment la propriété de résister à la coloration de Gram (génère le résultat Gram négatif) malgré le fait que la physionomie de *M. tuberculosis* s'apparente davantage à celle d'une bactérie Gram positif.^{4,5}

Les principales caractéristiques de *M. tuberculosis* comprennent entre autres son rythme de division particulièrement lent lorsque comparé à celui d'autres espèces bactériennes. Une

cellule de *M. tuberculosis* met généralement 15 à 20 heures pour se diviser lorsque les conditions sont optimales alors qu'une cellule d'*Escherichia coli* en met 20 minutes.⁵ Aussi, *M. tuberculosis* requiert beaucoup d'oxygène pour sa croissance ce qui la rend hautement aérophile.² Cette caractéristique la rend très résistante aux espèces réactives de l'oxygène parfois utilisé comme armes de défense par le système immunitaire et influence grandement les organes pouvant être affectés par une infection par *M. tuberculosis*.² Le principal foyer d'infection est généralement situé dans le haut des poumons, plus riches en oxygène. Sa capacité à survivre la phagocytose lui offre également la possibilité d'infiltrer la circulation sanguine et d'infecter d'autres organes tels que les os, le système digestif ou le système nerveux. En revanche, il est très peu commun de retrouver *M. tuberculosis* dans le cœur ou les muscles squelettiques étant donné la très forte consommation d'oxygène dans ces organes.²

1.1.2 Pathogénèse de la tuberculose

La tuberculose débute par la transmission d'une charge bactérienne par un individu déjà infecté par la bactérie, généralement si celui-ci souffre d'une infection active alors que le nombre de cellules de *M. tuberculosis* présent chez l'hôte est élevé.² Dans cette situation, l'individu infecté est à risque de projeter des bactéries par la voie des airs sous la forme d'aérosols (principalement par la toux mais aussi par des éternuements ou encore la parole) qui peuvent ensuite être inhalés par des individus sains.^{2,3} La transmission de la bactérie s'effectue de manière efficace lorsque les aérosols atteignent les alvéoles pulmonaires, ce qui se produit généralement lorsque les aérosols sont d'une taille de 1 à 5 µm, les aérosols plus volumineux se logeant au niveau des voies respiratoires et étant expulsés facilement par le mouvement ciliaire des cellules épithéliales de la trachée et des bronches.²

Une fois à l'intérieur des alvéoles pulmonaires, *M. tuberculosis* est habituellement rapidement phagocytée par les macrophages alvéolaires chargés de l'immunité innée des poumons.² Ce processus est normalement efficace pour empêcher une infection bactérienne des poumons mais *M. tuberculosis* possède plusieurs mécanismes de résistance permettant d'éviter le processus de digestion du macrophage.^{2,6,7} Notamment, *M. tuberculosis* possède la protéine EEA1 sur sa paroi bactérienne qui interfère avec la fusion des lysosomes avec le phagosome, empêchant ainsi le macrophage d'exposer la bactérie à ses enzymes digestives.⁶ La bactérie possède également le gène *ureC*, qui interfère avec l'acidification du phagosome.⁷ Ce phénomène permet à *M. tuberculosis* de se reproduire à l'abri du système immunitaire ou même d'infecter d'autres organes riches en oxygène en infiltrant la circulation sanguine par

l'intermédiaire du macrophage.² La reproduction de *M. tuberculosis* à l'intérieur du macrophage cause éventuellement sa mort par nécrose (lyse du macrophage due à la surabondance de bactéries), ce qui déclenche une réponse inflammatoire emmenant de nouveaux macrophages aux lieux de l'infection, permettant à *M. tuberculosis* de recommencer le cycle.²

La réponse du système immunitaire à l'infection est grandement responsable de la progression de la maladie en phase active ou latente.² Une réponse efficace du système immunitaire implique l'intervention de lymphocytes T faisant partie de l'immunité acquise possédant la capacité d'éliminer par apoptose les cellules infectées, ainsi qu'une grande production d'IFN γ , importante pour la stimulation du système immunitaire. Suite à une intervention efficace, la population bactérienne chute pour ensuite entrer en phase latente en se cachant dans l'organisme. En contrepartie, une réponse inefficace échoue à empêcher la prolifération de *M. tuberculosis* et entraîne une inflammation croissante des poumons due à la nécrose des macrophages. L'intervention des granulocytes génère une accumulation de toxines qui se révèle être aussi dommageable pour la population bactérienne que celle des cellules pulmonaires. La destruction du parenchyme pulmonaire entraîne ainsi une inflammation chronique et la nécrose progressive des poumons, ce qui mène souvent à la mort de la personne infectée si celle-ci n'est pas prise en charge par du personnel médical.²

1.1.3 Traitement de la tuberculose

M. tuberculosis est une bactérie infectieuse notoirement difficile à éliminer par l'usage d'antibiotiques en raison de sa paroi bactérienne, plus épaisse, hydrophobe, cireuse et riche en acide mycolique, particulière au genre *Mycobacterium*.^{4,5} De plus, sa possession de nombreux gènes de résistances (dont une β -lactamase) et sa capacité à se reproduire à l'intérieur même de cellules humaines contribuent à sa capacité à déjouer les traitements par antibiotiques.^{2,8}

Depuis les années 1950, plusieurs antibiotiques possédant des propriétés antituberculeuses ont été découverts, ce qui a mené au traitement en quadruple thérapie comprenant l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol (Figure 1.1) pris quotidiennement pendant 2 mois, suivi de 4 mois de prise d'isoniazide et de rifampicine.³ Malheureusement, depuis le milieu des années 1980, le milieu médical a été témoin de l'apparition de souches résistantes à cette combinaison d'antibiotiques, nommées MDR (*multi-drug resistant*).^{9,10} En réponse à cette résistance au traitement classique, plusieurs autres antibiotiques ont été approuvés pour l'usage contre *M. tuberculosis*.^{3,9,10} La plupart de ces antibiotiques de deuxième et troisième

ligne possèdent des désavantages lorsque comparés à ceux de première ligne tels qu'une efficacité moindre, une toxicité accrue, un coût d'utilisation plus élevé ou encore une indisponibilité dans les pays plus démunis.^{3,9,10} Malgré les précautions du milieu médical pour prévenir l'apparition de résistance aux antibiotiques, de plus en plus de cas de tuberculose sont causés par des souches de *M. tuberculosis* résistants aux antibiotiques de second recours, nommées XDR (*extensively drug resistant*) lorsque la souche résiste à au moins un des antibiotiques de seconde ligne et TDR (*totally drug resistant*) pour les quelques cas découverts récemment pour lesquelles aucun traitement ne s'est révélé efficace.³

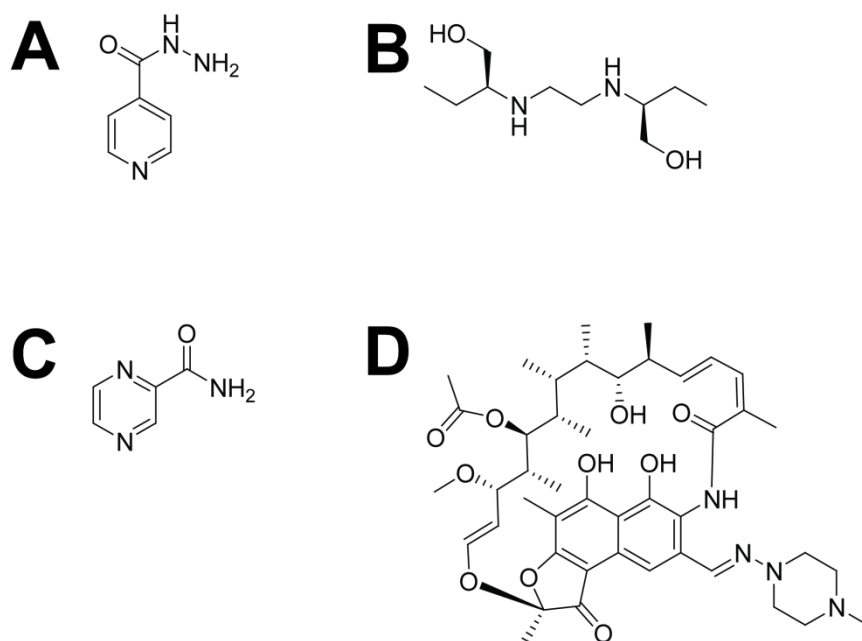


Figure 1.1. Structure chimique des antibiotiques de première ligne employés pour traiter une infection par *M. tuberculosis*. (A) L'isoniazide, un inhibiteur de la synthèse de l'acide mycolique présent dans la paroi mycobactérienne. (B) L'éthambutol, un inhibiteur de la synthèse de la paroi mycobactérienne. (C) Le pyrazinamide, un inhibiteur de la synthèse des acides gras. (D) La rifampicine, un inhibiteur de l'ARN polymérase de *M. tuberculosis*. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw (Cambridge, USA).

Depuis, la recherche sur la tuberculose s'intéresse à la possibilité de traiter l'infection par *M. tuberculosis* à l'aide de nouvelles méthodes. En 2009, Hugonnet *et al.* ont montré l'efficacité d'une combinaison de méropénème (un antibiotique de type β -lactame) et de clavulanate (un

inhibiteur de β -lactamases) à inhiber la croissance de plusieurs souches de *M. tuberculosis* correspondant à un profil XDR.¹¹ Le succès de cette combinaison réside dans la complémentarité des deux antibiotiques et de la susceptibilité de la β -lactamase BlaC de *M. tuberculosis* à l'action du clavulanate. Le mécanisme de cette combinaison est détaillé de manière plus complète au chapitre 1.3. Le succès d'une nouvelle méthode pour traiter les souches les plus résistantes de *M. tuberculosis* est une excellente nouvelle. Cependant, comme l'histoire l'a démontré depuis les années 1980, les bactéries ont une formidable capacité d'adaptation aux antibiotiques et il devient nécessaire de tenter de prédire la direction que prendra l'évolution et possiblement permettre une adaptation plus rapide des traitements médicaux à l'acquisition de résistances par les bactéries infectieuses.

1.2 La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques origine de la guerre biologique que se livrent les microorganismes.¹² Dans un contexte de compétition pour la colonisation d'un écosystème, plusieurs microorganismes ont développé au cours de leur évolution des antibiotiques pour interférer avec leurs rivaux naturels. De la même façon, les organismes soumis à ce type d'attaques ont obtenu par évolution des moyens de défense contre ces armes.¹²

1.2.1 Historique des antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques en médecine a débuté avec la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 et sa purification en 1942 par Ernst Chain et Howard Florey.^{13,14} Le succès thérapeutique de la pénicilline, combinant à la fois efficacité et innocuité, a propulsé la recherche dans le domaine des antibiotiques ainsi que leur utilisation massive en médecine.¹⁴ L'efficacité des premiers antibiotiques n'a cependant pas tardé à diminuer en raison de l'émergence de nouvelles souches de pathogènes résistants aux traitements. Depuis, de nombreuses générations d'antibiotiques ont vu le jour. Chacune a bénéficié d'une bonne efficacité pour un certain temps avant de rencontrer des difficultés dû à l'émergence de nouvelles résistances.¹⁵

1.2.2 La pression sélective

Le phénomène de l'apparition rapide de résistance aux antibiotiques provient du même concept de sélection naturelle qui fut décrit par Charles Darwin en 1859 dans l'ouvrage « *On the Origin of Species* ». ¹⁶ Les mutations génétiques apparaissent relativement rapidement dans une population bactérienne compte-tenu de leur vitesse de reproduction très élevée et une grande variété de caractères est créée par la même occasion. ¹⁷ Lorsque cette population est exposée à un danger – une pression sélective – de l'environnement, les individus mal adaptés à ce danger périssent alors que ceux possédant un trait ou une caractéristique les protégeant survivent. ¹⁶ Les survivants de cette pression sélective transmettent alors cette caractéristique à leur descendance, créant une nouvelle population qui, à présent, est entièrement adaptée à la pression de leur environnement grâce aux premiers survivants de la pression sélective. ¹⁶ Dans le cas des bactéries infectieuses, la pression sélective prend la forme du traitement par antibiotiques.

Les bactéries possèdent de nombreux moyens leur permettant d'acquérir des facteurs de résistances aux antibiotiques et d'ainsi survivre à la pression sélective. Le premier mécanisme est commun à l'ensemble des êtres vivants et consiste uniquement en des mutations ponctuelles du génome. Ces mutations se produisent lors de la réplication de l'ADN et peuvent introduire une modification à l'intérieur de gènes. ¹⁷ Ces modifications au code génétique peuvent être sans effet, néfaste ou bien bénéfique. Les mutations néfastes génèrent généralement des maladies génétiques et sont régulièrement létales. Ces mutations sont habituellement appelées à disparaître dans un contexte naturel étant donné le désavantage qu'ont les individus atteints par des maladies résultant de ces mutations. Les mutations bénéfiques, quant à elles, offrent aux individus les possédant un avantage de survie et ainsi une meilleure chance de transmission de leur bagage génétique à leur descendance. Dans le cas d'une pression sélective exercée par un antibiotique, ces mutations peuvent alors devenir l'unique moyen disponible pour survivre. ¹⁷

En plus des mutations ponctuelles spontanées, les bactéries possèdent également trois façons d'acquérir du matériel génétique par transfert horizontal (qui n'est pas acquis par hérédité génétique) susceptible de leur conférer un avantage évolutif : la transformation, la conjugaison et la transduction. ¹⁸ La transformation d'une bactérie se produit lorsque celle-ci assimile de l'ADN étranger laissé libre dans son environnement par la nécrose d'une autre cellule. ^{19,20,21} Dans le cas de la conjugaison, l'échange de matériel génétique s'effectue entre deux bactéries

vivantes.^{4,22} Les bactéries donneuses et receveuses génèrent des structures nommées *pili* à la surface de leur paroi bactérienne qui une fois liées, génère un pont permettant le transfert de matériel génétique.^{4,22} La conjugaison entre deux bactéries est un lien relativement instable, permettant uniquement le transfert de courts fragments d'ADN, tels que les plasmides et les transposons.^{4,22} La troisième méthode, la transduction, implique quant à elle le transfert de matériel génétique par l'intermédiaire de virus, les bactériophages.²³ L'encapsidation d'ADN bactérien peut survenir de différentes façons. En premier lieu, l'ADN bactérien peut être capturé sans ADN viral au cours de l'encapsidation du virus lorsque celui-ci entre en phase lytique.²³ Lors de l'assemblage des capsides, le matériel génétique répliqué est capturé pour former de nouveaux virus mais cette capture n'est pas toujours effectuée de manière spécifique, résultant parfois en l'encapsidation de gènes bactériens. Aussi, si le virus était entré en phase lysogénique (phase d'inactivité au sein de l'hôte infecté) en s'insérant dans le génome de son hôte, son excision lors de son entrée en phase lytique s'effectue parfois de manière imprécise, retirant possiblement un ou des gènes bactériens adjacents à son site d'insertion.²³ Dans ce cas, les gènes bactériens sont répliqués avec le reste du matériel génétique viral puis encapsidés. Peu importe le processus d'encapsidation, le matériel génétique bactérien peut alors être transmis à une bactérie étrangère lorsque celle-ci se trouve attaquée par les capsides virales. Dans tous les cas, une fois assimilé, le fragment d'ADN peut être introduit à l'intérieur d'un chromosome ou d'un plasmide ; si tous les éléments nécessaires pour l'expression du ou des gènes étrangers ont correctement été intégrés, la bactérie possède alors de nouveaux gènes qu'elle peut transmettre à sa descendance.

1.2.3 Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Il existe plusieurs stratégies par lesquelles les bactéries parviennent à résister et à échapper aux antibiotiques.²⁴ La plupart des mécanismes correspondent à l'une des stratégies suivantes :

- par l'altération de la cible de l'antibiotique, généralement possible par la mutation du ou des gènes affectés par l'action de l'antibiotique de manière à ce que ceux-ci ne puissent plus interagir ensemble (p. ex. : changement dans la topographie du site actif d'une enzyme, disparition d'un groupe actif important dans le mécanisme réactionnel de l'antibiotique, modification de la dynamique d'un site allostérique, *etc.*) ;
- par la modification ou l'adaptation d'une voie métabolique (p. ex. : utilisation d'un substrat alternatif, *etc.*) ;

- par la réduction de l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule, possible par une réduction de la perméabilité de la cellule (p. ex. : mutation d'un pore) ou encore l'acquisition d'une pompe à efflux propulsant l'antibiotique à l'extérieur de la cellule ;
- par l'altération ou la destruction de l'antibiotique lui-même, possible par l'acquisition d'une enzyme capable d'intercepter l'antibiotique avant qu'il n'atteigne sa cible et de l'inactiver de quelque manière.

L'enzyme faisant l'objet de ce mémoire, la β -lactamase BlaC de *M. tuberculosis*, fait d'ailleurs partie de la dernière catégorie de mécanisme de résistance, étant responsable de l'inactivation des antibiotiques de type β -lactame.

1.3 Les β -lactames et les β -lactamases

Comme mentionné précédemment, une nouvelle solution pour le traitement de la tuberculose réside dans l'emploi d'une combinaison d'un β -lactame et d'un inhibiteur de β -lactamase, plus précisément l'ampicilline (proposée comme alternative au méropénème qui doit être administré par intraveineuse) et le clavulanate (Figure 1.2).²⁵

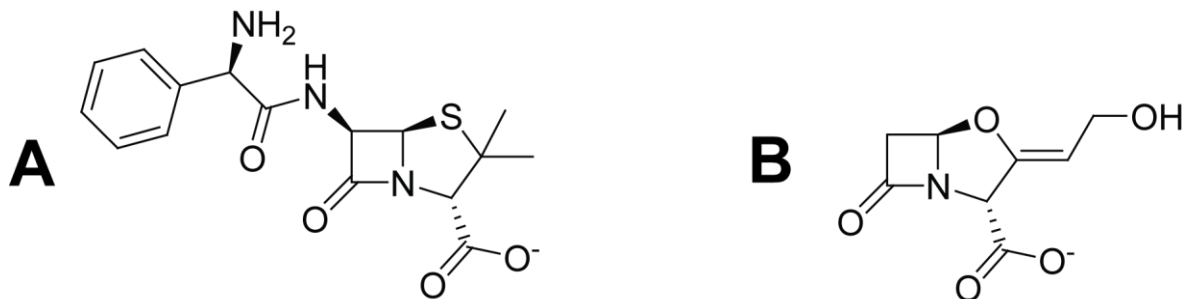


Figure 1.2. Structure chimique de (A) l'ampicilline, un β -lactame, et du (B) clavulanate, un inhibiteur de β -lactamases. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw (Cambridge, USA).

1.3.1 Mécanisme d'action des β -lactames

Les β -lactames, qui comprennent la pénicilline découverte par Alexander Flemming, ont été le premier type d'antibiotique utilisé massivement en clinique. Ces antibiotiques à action bactéricide agissent en inhibant la synthèse de la paroi de peptidoglycane, prévenant ainsi la croissance, la reproduction et l'intégrité structurelle de la bactérie.²⁶ Spécifiquement, les β -lactames agissent par mimétisme moléculaire (Figure 1.3) sur les DD-transpeptidases, mieux connues sous le nom de *penicillin-binding proteins* (PBP), responsables d'effectuer les dernières étapes de la synthèse de la paroi de peptidoglycane. La structure moléculaire des β -lactames s'apparente à celle du substrat naturel des PBPs, le D-alanyl-D-alanine, les acides aminés terminaux des peptides servant de liens entre les chaînes glycosidiques de NAG (*N*-acétylglucosamine) et de NAM (acide *N*-acétylmuramique). Les β -lactames agissent en se liant de façon covalente au site actif des PBPs en réagissant avec leur sérine catalytique. Dû à leur nature intrinsèque différente de celle des D-alanyl-D-alanine, l'enzyme PBP est incapable de retirer l'antibiotique de son site actif, laissant l'enzyme inhibée de façon permanente.²⁶

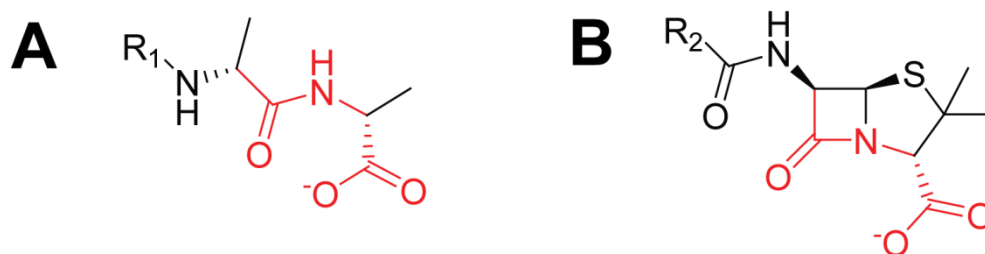


Figure 1.3. Comparaison de la structure chimique du (A) D-alanyl-D-alanine et d'un (B) β -lactame de type pénème. Les structures colorées en rouge mettent en évidence le mimétisme moléculaire des β -lactames. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw (Cambridge, USA).

1.3.2 Les β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes similaires aux PBPs réagissant avec les β -lactames. Elles sont exprimées au niveau de la membrane plasmique des bactéries de façon à protéger les

PBPs chargé de synthétiser la paroi de peptidoglycane. Les β -lactamases se divisent en quatre classes (A, B, C et D) selon leur homologie structurelle et fonctionnelle.²⁷ À l'exception des β -lactamases de classe B qui sont des métallo-enzymes, les β -lactamases possèdent une sérine catalytique dans leur site actif qui leur permet de réagir avec les β -lactames de la même façon que les PBPs. Cependant, contrairement aux PBPs, les β -lactamases possède la capacité de retirer le β -lactame ayant réagi de leur site actif, produisant ainsi une molécule inactive et sans danger pour la bactérie (Figure 1.4).²⁸

Parmi les quatre différentes classes, les β -lactamases de classe A sont les plus connues et les plus répandues, en particulier chez bactéries Gram négatif. Cette classe comprend les β -lactamases TEM, SHV et BlaC et se caractérise particulièrement par sa spécificité pour l'hydrolyse des β -lactames de type pénicilline (Figure 1.5A) tels que la pénicilline.²⁹ Initialement, une stratégie qui a été employée pour contrer l'action de ces β -lactamases a été de développer de nouveaux types de β -lactames tels que les céphèmes (Figure 1.5B). La stratégie s'est révélée efficace à ses débuts mais a rencontré des difficultés lorsqu'un certain nombre de mutations sont apparues dans l'environnement, générant des β -lactamases à spectre large connues sous le nom d'ESBL (*extended spectrum β -lactamases*) capables d'hydrolyser une grande variété de substrats avec efficacité.^{30,31} Par la suite, la découverte du clavulanate, un inhibiteur de β -lactamase particulièrement efficace contre les β -lactamases de classe A, a permis l'élaboration de nouvelles thérapies combinant l'utilisation d'un β -lactame et de clavulanate pour inhiber l'action protectrice des β -lactamases.³² Encore une fois, un succès initial a été interrompu par l'apparition de nouvelles mutations, créant cette fois-ci des enzymes connues sous le nom d'IRT (*inhibitor-resistant TEM*, en raison de la découverte initiale de ces mutants chez TEM) possédant la propriété de résister à l'inhibition par le clavulanate tout en conservant leur pouvoir d'hydrolyse contre les β -lactames.³³ Aujourd'hui, la principale solution contre ces enzymes de classe A repose sur l'utilisation des carbapénèmes ou des monobactames (Figure 1.5C-D), des β -lactames hydrolysés avec difficulté par la plupart des β -lactamases de cette classe.³⁴

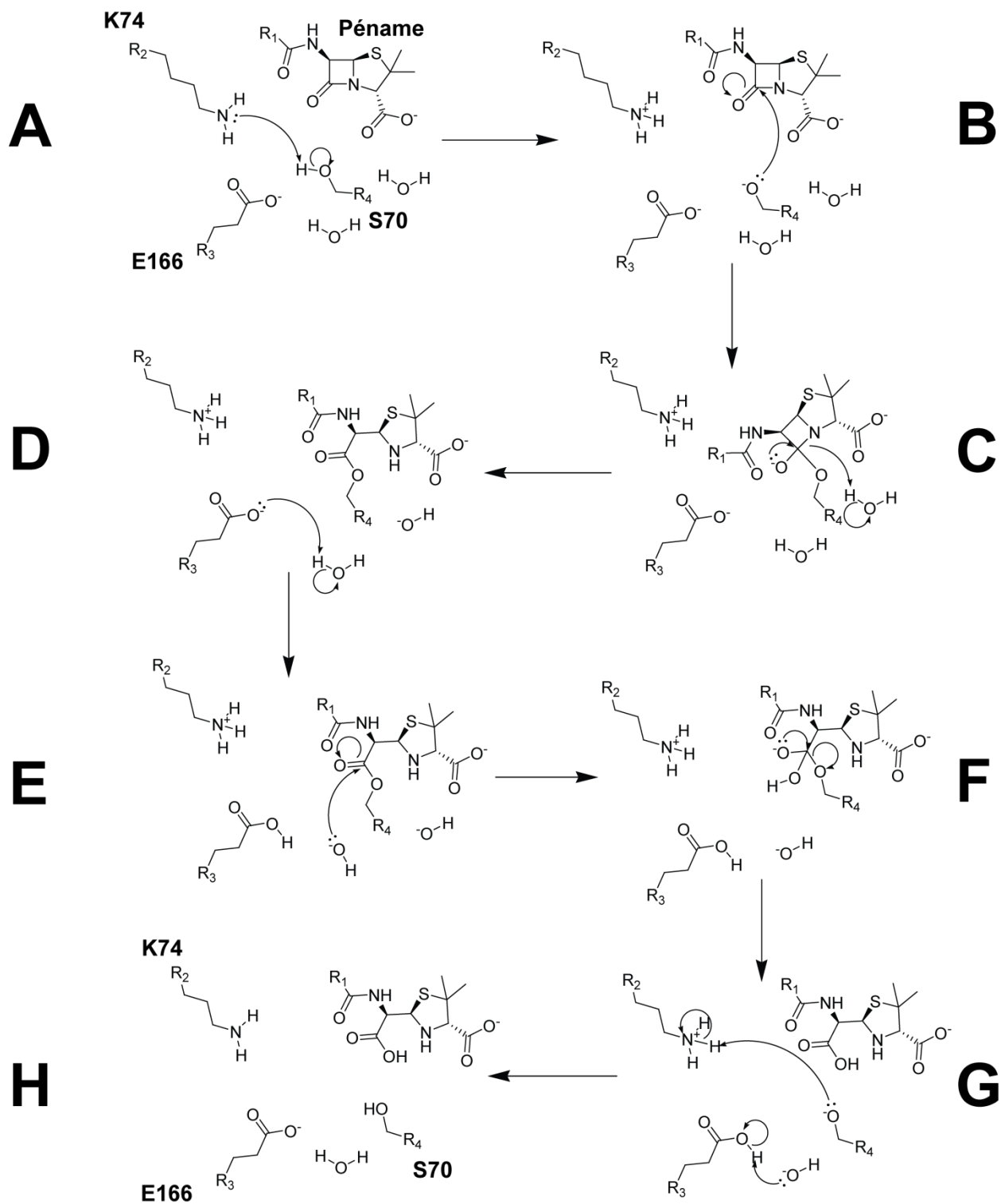


Figure 1.4. Mécanisme réactionnel de l'hydrolyse d'un péname par BlaC. (A) La lysine 74 active la sérine 70 pour lui permettre (B) d'effectuer une attaque nucléophile sur le β -lactame, ce qui a pour effet (C) d'ouvrir le β -lactame. (D-H) Le glutamate 166 permet la régénération de l'enzyme en délogant l'antibiotique maintenant inactif. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw (Cambridge, USA).

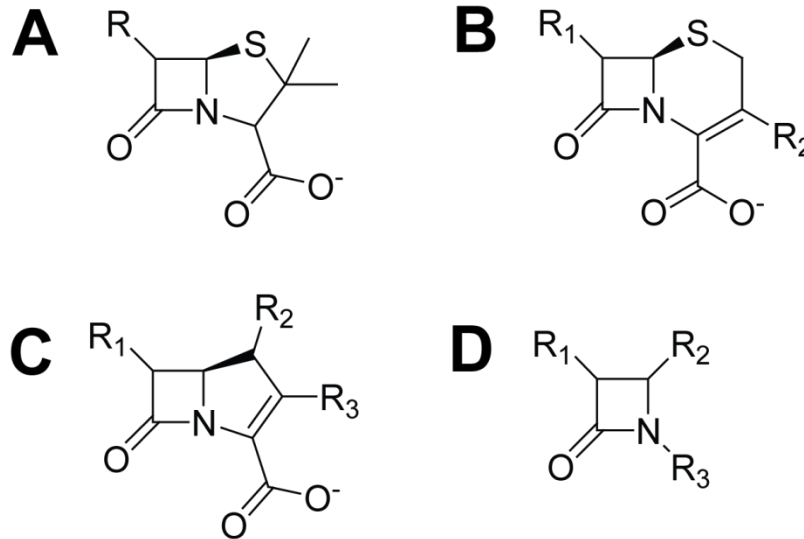


Figure 1.5. Structure de base des différents types d'antibiotiques β -lactames. (A) Les pénames, famille des pénicillines (p. ex. : benzylpénicilline, ampicilline, amoxicilline, etc.), (B) les céphèmes, famille des céphalosporines (p. ex. : céfalotine, céfoxitine, ceftriaxone, etc.), (C) les carbapénèmes (p. ex. : méropénème, imipénème, etc.) et (D) les monobactames (p. ex. : aztréoname, tigémoname, etc.). Noter le cycle β -lactame commun à tous les antibiotiques β -lactames. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw (Cambridge, USA).

1.3.3 BlaC, la β -lactamase de *Mycobacterium tuberculosis*

Comme mentionné précédemment, BlaC est une β -lactamase de classe A similaire à TEM-1 et SHV-1 (Figure 1.6), des β -lactamases largement répandues chez les bactéries Gram négatif.²⁹ Contrairement à TEM souvent retrouvée sur un plasmide, BlaC est une enzyme encodée sur le chromosome de *M. tuberculosis* et est un caractère intrinsèque à l'espèce *tuberculosis*.³⁵

Malgré ses similitudes avec le reste des β -lactamases de la classe A, BlaC (Figure 1.7) possède des caractéristiques qui lui sont particulières.⁸ La protéine BlaC possède 40% et 44% d'identité de séquence avec TEM-1 et SHV-1, respectivement (Figure 1.8). Contrairement à ces enzymes, BlaC possède un site actif particulièrement large qui lui permet d'accommoder une grande variété de β -lactames, allant des pénames, substrats classiques de la classe A, aux carbapénèmes, substrats rarement hydrolysés par ces mêmes enzymes.⁸ Cette caractéristique de BlaC fait d'elle une β -lactamase de type ESBL, ce qui est remarquable étant donné que *M. tuberculosis* n'a jamais été traité intensivement à l'aide de β -lactames et n'a donc pas été soumise à une pression sélective pour en arriver là.

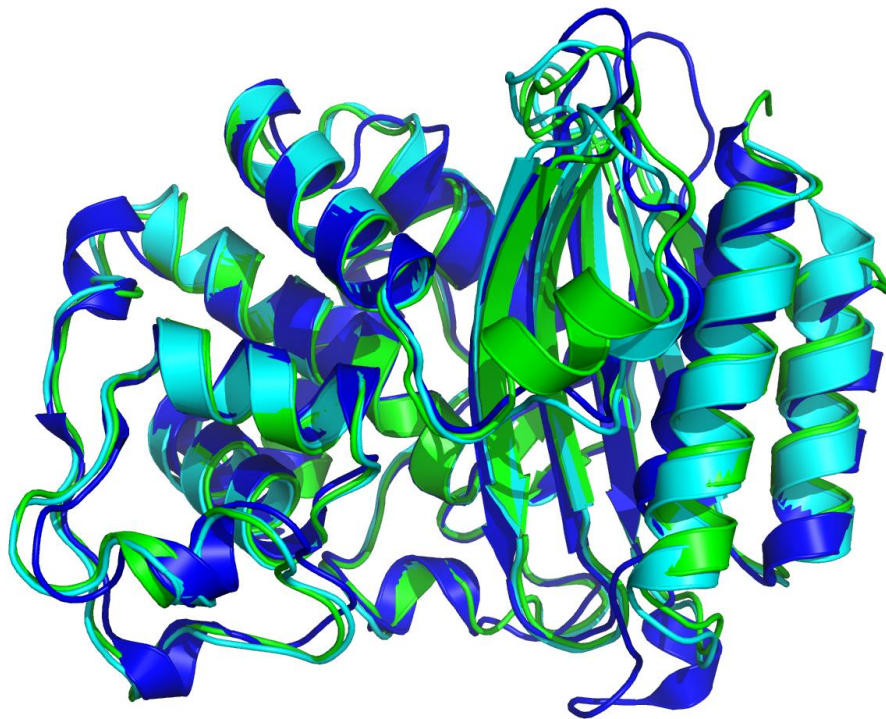


Figure 1.6. Superposition de la structure obtenue par cristallographie de BlaC (bleu), TEM-1 (cyan) et SHV-1 (vert), des homologues structuraux de la classe A des β -lactamases. PDB : BlaC (2GDN) ; TEM-1 (1BTL) ; SHV-1 (1SHV).

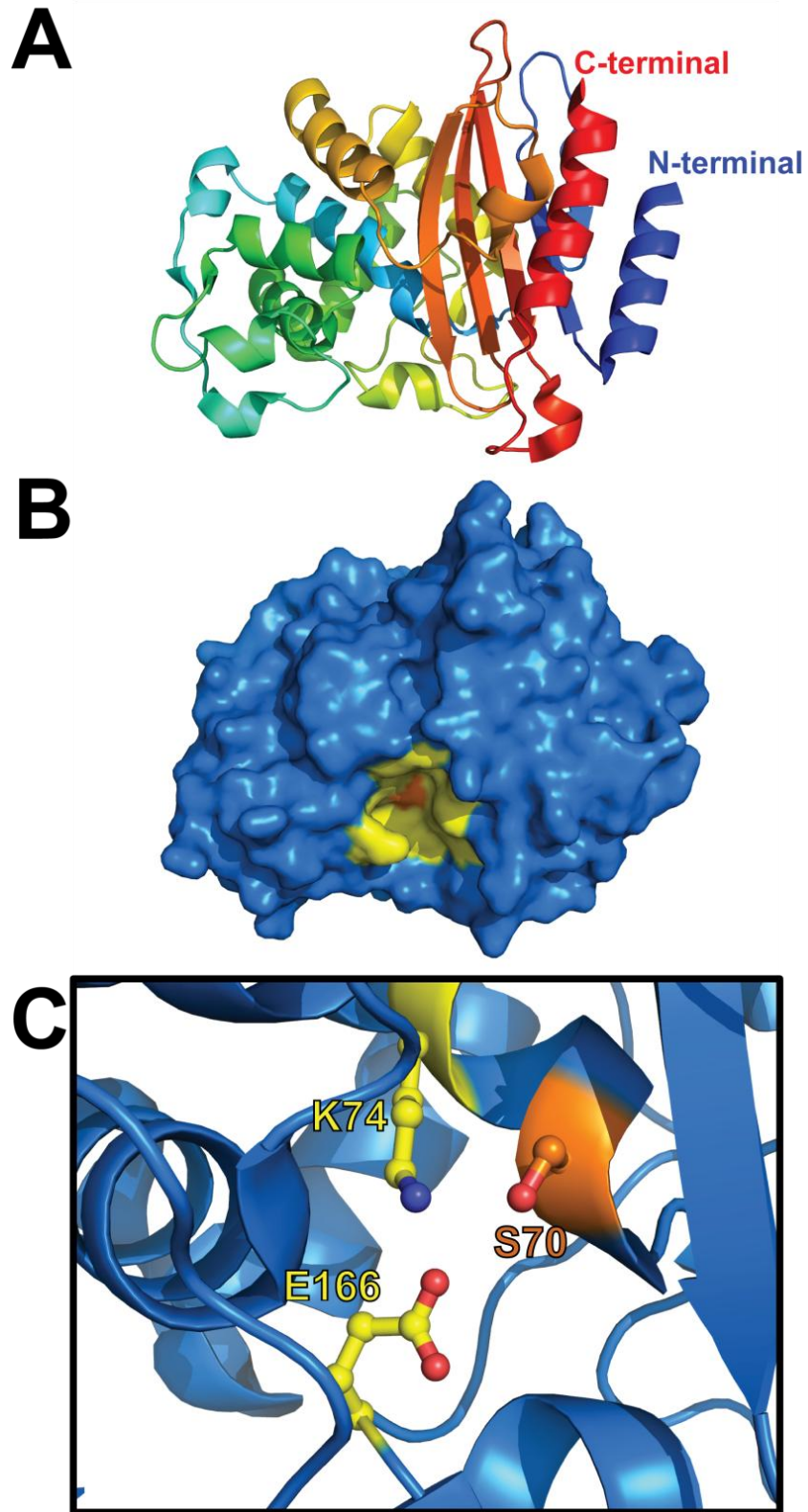


Figure 1.7. Structure de la β -lactamase BlaC et de son site actif. (A) L'enroulement de la protéine est suivi par le gradient de bleu à rouge. (B) Surface de l'enzyme ; la poche du site actif est colorée en jaune et la sérine catalytique en orange. (C) Résidus catalytiques de BlaC, communs aux β -lactamases de classe A. PDB : 2GDN.


```

SHV-1_K._pneumoniae      -----MRYIRLCIIISLLATLPLAVHASFPQPLEQIKLSESQLSGRVMIE 48
TEM-1_E._coli            ----MSIQHFRLVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIE 48
BlaC_M._tuberculosis     MAMLVSVTGCAR-HASGARPASTTLPAGADLADRFAELERRYDARLGVYV 49
                          : . . . . . : * . . . * :
                          :
SHV-1_K._pneumoniae     MDLASGRTLTAWRADERFPMMSTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHYP 98
TEM-1_E._coli           LDLNSGKILESFRPEERFPMMSTFKVVLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYS 98
BlaC_M._tuberculosis     PATGTT-AAIEYRADERFAFCSTFKKAPLVAAVLHQN--PLTHLDKLIYYT 98
                          . :* . : * . : * * * * * * . * * * * : * : * *
                          :
SHV-1_K._pneumoniae     QQDLVDYSPVSEKHLADGMTVGELCAAITMSDNSAANLLLATVGGP--- 145
TEM-1_E._coli           QNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTTIGGP--- 145
BlaC_M._tuberculosis     SDDIRISIPVAQQHVQTGMTIGQLCDAAIRYSDGTAANLLLADLGGPGGG 145C
                          . * : . : * : : : : : * * * : * * * * * : * *
                          :
SHV-1_K._pneumoniae     -AGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTPASMAATLRKLL 194
TEM-1_E._coli           -KELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPELNEAIPNDERDTTMPAAMATLRKLL 194
BlaC_M._tuberculosis     TAAFTGYLRSLGDTVSRLDAEEPELNRDPPGDERDTTPHAIALVLQQLV 194
                          . . : : : * * : * * * . : * * * * * * * : * * : : * :
                          :
SHV-1_K._pneumoniae     TSQRLSARSQRQLLQWVDDRVAGPLIRSVLPAGWFIADKTGAGERGARG 245
TEM-1_E._coli           TGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGSRG 245
BlaC_M._tuberculosis     LGNALPPDKRALLTDWMARNTTGAKRIRAGFPADWKVIDKTGTGDYGRAN 245
                          . : * . : * * : : . . : * : * . * : * * : * * : * .
                          :
SHV-1_K._pneumoniae     IVALLGPNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQQ--IAGIGAALIEHWQR 292
TEM-1_E._coli           IIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQ--IAEIGASLIKHW-- 290
BlaC_M._tuberculosis     DIAVVWSPTGVPYVAVMSDRAGGGYDAEPREALLAEATCVAGVLA- 293
                          : * : . . . : * : : : : : : : * : : : : :

```

Figure 1.8. Alignement de séquences des β-lactamases de classe A BlaC, TEM-1 et SHV-1. Les résidus catalytiques sont mis en évidence. Les étoiles (*) indiquent les résidus conservés, les deux-points (:) indiquent une conservation de fonction et les points (.) indiquent une similitude ; l'absence de caractère indique les résidus variables. L'alignement a été généré à l'aide de ClustalW2. La numérotation des résidus suit le système de numérotation standardisé des β-lactamases de classe A de Ambler.

Toutefois, comme démontré par Hugonnet *et al.* (2009),¹¹ BlaC demeure sensible à l'action inhibitrice du clavulanate et permet l'utilisation d'une combinaison β-lactame et inhibiteur de β-lactamase pour le traitement de l'infection par *M. tuberculosis*.

1.3.4 Inhibition des β-lactamases par le clavulanate

Le clavulanate est un β-lactame particulier produit par *Streptomyces clavuligerus* ayant la propriété d'inhiber de façon permanente les β-lactamases, celles de la classe A en particulier.³² Sa découverte vers la fin des années 1970 a permis un renouveau de l'utilisation des antibiotiques β-lactames en clinique étant donné sa forte synergie avec ceux-ci.

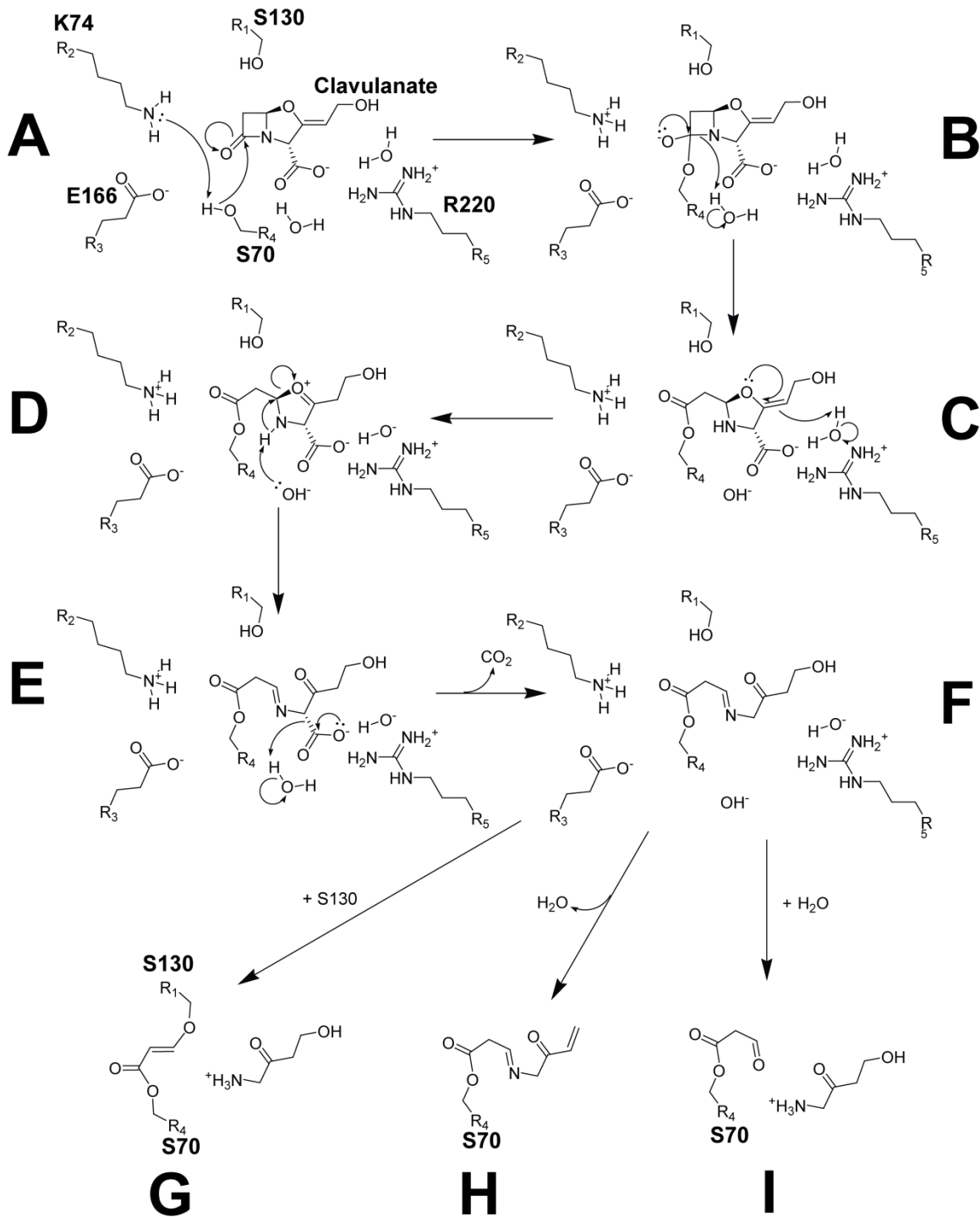


Figure 1.9. Mécanisme réactionnel proposé de l'inactivation de BlaC par le clavulanate. (A) L'inactivation débute par l'activation de la sérine 70 par la lysine 74 et (B) l'ouverture du cycle β -lactame comme lors d'une hydrolyse normale. (C-F) Une réorganisation de l'inhibiteur possible à cause d'une résonance et d'une molécule d'eau maintenue en place par l'arginine 220 mène à (G-I) trois adduits différents possibles, lesquels sont permanents. L'un d'eux (G) implique la participation de la sérine 130, les deux autres (H-I), une molécule d'eau. L'existence des adduits (F), (H) et (I) a été démontré par spectrométrie de masse et cristallographie.³⁶ L'existence de (G) est suspectée par homologie à TEM.³²

Par sa capacité à former un adduit permanent dans le site actif des β -lactamases, le clavulanate correspond exactement à ce que les β -lactames sont aux PBPs. Le clavulanate est un inhibiteur correspondant au modèle des substrats suicides étant donné qu'il interagit avec l'enzyme de la même manière que son substrat mais qu'une fois à l'intérieur du site actif, il effectue une série de modifications altérant le site actif de l'enzyme, la rendant non-fonctionnelle de manière permanente (Figure 1.9).^{32,36}

1.4 Projet de recherche

Tel qu'exposé maintes fois précédemment, l'emploi d'antibiotiques en clinique a toujours inévitablement mené à l'apparition de facteurs de résistance chez les microorganismes ciblés par les traitements. Connaissant ce problème, il convient maintenant de prévoir cette apparition de facteurs de résistance pour élaborer de nouveaux traitements avant même l'apparition de ces résistances en clinique pour éviter de se retrouver dans une impasse en terme de traitements.

1.4.1 Problématique

L'utilisation d'une combinaison de β -lactames et d'inhibiteur de β -lactamase n'est pas une stratégie nouvelle pour traiter les infections bactériennes. En effet, l'augmentine (combinaison amoxicilline/clavulanate) et la timentine (combinaison ticarcilline/clavulanate) sont disponibles sur le marché depuis près de 20 ans et ont été employés pour traiter de nombreux types d'infections par des bactéries telles qu'*Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*.³⁷ L'exposition à ces combinaisons a mené à la sélection de facteurs de résistance sous la forme de mutations dans les gènes de β -lactamases de classe A chez les bactéries ciblées par le clavulanate. Ces mutations ont engendré des β -lactamases IRT (résistantes aux inhibiteurs) toujours efficace dans l'hydrolyse des pénames employés en combinaison avec le clavulanate.³³ Ces mutations ont été documentées chez les β -lactamases TEM (*E. coli*) et SHV (*K. pneumoniae*) et il s'est révélé que les mutations procurant une résistance à l'inhibition étaient les mêmes dans la plupart des cas.³³ Considérant cette information, il est pertinent de se questionner sur la possibilité que BlaC puisse évoluer de façon similaire lorsqu'exposé à la pression sélective du clavulanate étant donné qu'elle partage une forte homologie de structure avec TEM et SHV.

En 2013, Kurz *et al.* ont répondu à cette question en introduisant certaines des mutations causant les hausses les plus importantes de résistance à l'inhibition présentes dans les β -

lactamases de classe A chez BlaC.²⁵ Ils montrèrent que, *in vitro*, les variantes IRT de BlaC se comportent globalement de la même façon que les enzymes IRT de TEM et SHV, prédisant l'apparition de résistance au clavulanate par le même chemin évolutif. Cependant, lorsque ces variantes IRT furent intégrées au génome de *M. tuberculosis*, aucune augmentation de la résistance ne fut observée dans ce contexte *in vivo*. Pour tenter d'expliquer cette contradiction entre les expériences *in vitro* et *in vivo*, les auteurs ont montré que malgré la résistance accrue des mutants IRT de BlaC, ceux-ci étaient totalement inactivés *in vitro* au bout de quelques heures. Dans le contexte d'une bactérie telle qu'*E. coli*, se reproduisant tous les 20 minutes en conditions optimales, la résistance contre le clavulanate de l'enzyme de quelques heures est largement suffisante. Toutefois, dans une bactérie au rythme de reproduction très lent comme *M. tuberculosis* (15 à 20 heures), la résistance de quelques heures de BlaC est insuffisante pour assurer la survie de la cellule jusqu'à la fin de son cycle de reproduction. Ainsi, bien que normalement suffisantes, les mutations IRT semblent insuffisantes pour permettre l'apparition de résistance au clavulanate chez *M. tuberculosis*.

1.4.2 Hypothèse et objectifs de recherche

En partant de la prémisse que *M. tuberculosis* n'a jamais été soumise de façon intensive à des traitements combinant β -lactames et inhibiteurs de β -lactamases et que BlaC, la β -lactamase de *M. tuberculosis*, fait partie de la classe A et partage une forte homologie structurale avec TEM et SHV, nous avons émis l'hypothèse que BlaC évoluerait de la même façon que les autres β -lactamases de classe A lorsqu'elle serait exposée aux traitements intégrant le clavulanate. Kurz *et al.* ont infirmé la possibilité que l'introduction d'une seule mutation IRT soit suffisante pour permettre l'apparition d'un phénotype de résistance au clavulanate.²⁵ Cependant, comme il a été observé dans le cas des mutations ayant généré des β -lactamases ESBL chez la classe A, il a souvent été nécessaire pour la survie de la bactérie d'inclure plus d'une mutation pour développer complètement le potentiel ESBL de l'enzyme. Nous avons donc suggéré que BlaC pourrait acquérir une résistance supérieure à l'inhibition par le clavulanate si plus d'une mutation IRT était introduite à l'intérieur de son site actif.

Pour répondre à cette hypothèse, nous nous sommes donné les objectifs suivants :

1. générer les mutants IRT de BlaC ainsi que des mutants combinant les différentes mutations IRT par mutagenèse dirigée ;

2. exprimer et purifier les mutants simples et combinatoires de BlaC ainsi que l'enzyme sauvage ;
3. caractériser leur activité cinétique contre différents β -lactames ainsi que l'inhibition exercée par le clavulanate.

1.5 Méthodologie

1.5.1 Objectif 1 : Génération des mutants IRT de BlaC

Le choix des mutations s'est effectuée sur la base de ce qui avait été observé en clinique et en laboratoire chez les β -lactamases TEM et SHV. Quatre mutations ont été choisies : C69L, S130G, R220S et K234R (Figure 1.10).^{33,38} Chacune implique la modification d'un résidu du site actif mais ceux-ci ne sont pas tous impliqués dans le mécanisme de réaction avec le clavulanate.³³ C'est le cas de la cystéine (méthionine chez TEM et SHV) 69 qui est la voisine de la sérine 70. Il a été observé chez TEM que lorsque ce résidu est muté en leucine, isoleucine ou valine, une augmentation de la résistance au clavulanate en résulte.^{33,39} Il a été suggéré que l'effet hydrophobe des substitutions puisse avoir la capacité de repousser les petits β -lactames comme le clavulanate sans trop affecter l'affinité de l'enzyme mutante pour les autres β -lactames.⁴⁰ Il a également été observé que cette mutation engendre un changement de l'orientation de la sérine 70, affectant possiblement le mécanisme d'inhibition du clavulanate en rendant difficile l'attaque nucléophile de la sérine 130.⁴⁰ Cette sérine 130 est d'ailleurs une cible logique de mutation pour prévenir l'inhibition par le clavulanate étant donné son rôle crucial dans le mécanisme réactionnel.^{33,41} En l'absence de la sérine 130 comme dans le cas de la mutation S130G, une molécule d'eau prend la position de la chaîne latérale absente.⁴¹ Cette molécule d'eau permet au clavulanate d'effectuer tout de même son action inhibitrice, mais avec une efficacité très réduite.⁴¹ L'arginine 220 a la particularité d'être absente chez TEM-1 et SHV-1 et d'être remplacée par l'arginine 244.⁸ Malgré leur origine différente au sein du site actif, le groupement guanidinium de leur chaîne latérale respective terminent au même endroit dans le site actif.⁸ L'arginine 244 joue un rôle dans le mécanisme d'inhibition en coordonnant une molécule d'eau qui déstabilise la molécule de clavulanate.^{25,42-44} En l'absence de l'arginine 244, une molécule d'eau peut encore participer à la réaction, bien que de façon beaucoup moins efficace. Le dernier résidu, la lysine 234, est quant à lui impliqué dans la reconnaissance des

substrats et la stabilisation de l'état de transition.⁴⁵ Cette mutation a été observée seule dans un isolat clinique unique, identifié SHV-84.⁴⁶

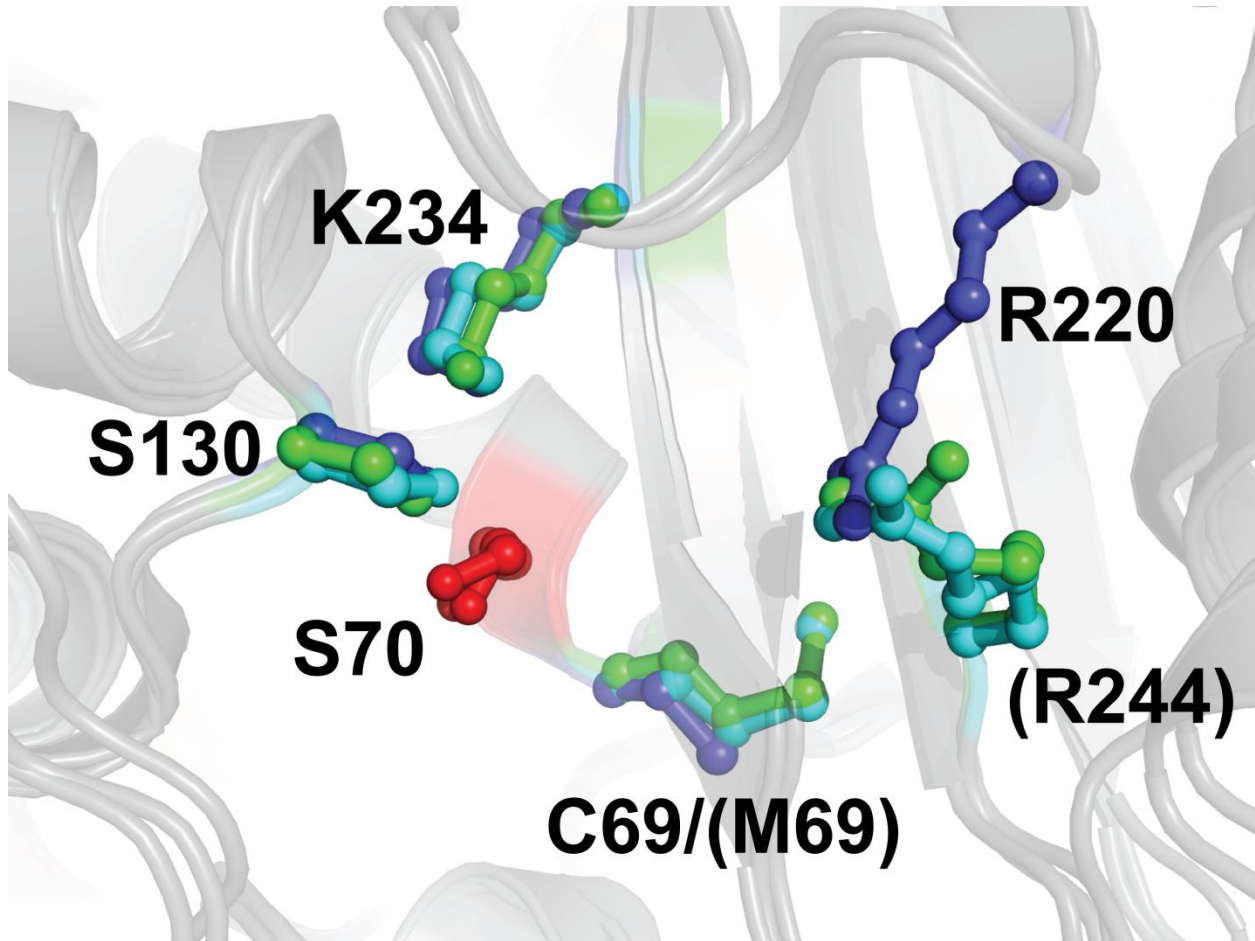


Figure 1.10. Superposition du site actif de BlaC (bleu), TEM-1 (cyan) et SHV-1 (vert). La sérine catalytique des trois β -lactamases est colorée en rouge. Les quatre positions sélectionnées pour une substitution IRT sont affichées autour de la sérine 70.

Pour introduire ces mutations à l'intérieur du gène *blaC*, nous avons procédé par mutagenèse dirigée en employant la technique de la PCR QuikChange. Cette technique implique l'utilisation d'amorces complémentaires qui superpose le codon à modifier. La séquence des amorces correspond à celle du gène à l'exception de celle du codon : les amorces contiennent la mutation à être insérée. Avec la PCR, le gène est répliqué en grand nombre à partir des

amorces employées, ce qui résulte en un grand nombre de copies du gène contenant la mutation désirée. Les quatre mutants sélectionnés ont été générés, puis des mutants combinatoires ont été générés à leur tour, à savoir : C69L-S130G, C69L-R220S, C69L-K234R, S130G-R220S, S130G-K234R et R220S-K234R.

1.5.2 Objectif 2 : Expression et purification des variantes de BlaC

Pour effectuer l'expression et la purification des variantes de BlaC, les différents gènes ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pET28a et ceux-ci transformés dans *E. coli* BL21 (DE3). L'inclusion des gènes dans pET28a permet le contrôle de l'expression du gène par l'intermédiaire d'un opéron *lac* modifié. L'ajout d'isopropyl β -D-1-thiogalactoside (IPTG), un analogue non-métabolisable du lactose, au milieu de culture induit l'expression sous le contrôle de l'opérateur *lac* en liant la protéine LacI qui empêche la transcription du gène. Ce contrôle permet le déclenchement de l'expression de la protéine recombinante à un moment opportun de la croissance, c'est-à-dire dans la phase exponentielle de croissance lorsque le métabolisme de la bactérie est à son maximum.

L'introduction des variantes de BlaC dans le vecteur pET28a permet aussi l'ajout d'une étiquette histidine, utilisée pour la purification de la protéine. La séquence d'acides aminés ajoutée, longue d'une dizaine de résidus, comporte six histidines consécutives qui possèdent une forte affinité pour les ions métalliques divalents. Son addition à la protéine à purifier permet l'utilisation d'une colonne de chromatographie d'affinité, composée d'une résine chargée d'atomes de nickel(II) avec lesquels l'étiquette histidine interagit suffisamment fort pour accrocher les protéines la possédant alors que les autres protéines sont évacuées hors de la colonne. Après plusieurs lavages successifs de la colonne afin d'éliminer toutes les protéines s'étant accrochées de manière non-spécifique, la protéine étiquetée est éluée à l'aide d'un gradient d'imidazole, une molécule fortement similaire aux histidines, qui prennent alors la place des protéines sur la colonne de nickel.

1.5.3 Objectif 3 : Caractérisation cinétique des variantes de BlaC

Pour évaluer l'activité enzymatique des variantes de BlaC, nous avons observé la dégradation des substrats β -lactames par les enzymes à l'aide de la spectrophotométrie. En effet, les β -lactames ont la propriété d'absorber la lumière dans l'ultra-violet, ce qui permet de déterminer leur concentration en solution. Lorsque ceux-ci sont hydrolysés par l'action d'une β -lactamase,

ils cessent d'absorber la lumière et un changement dans l'absorbance de solution peut être détecté. Comme expliqué par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon lc \quad (1)$$

où A représente l'absorbance d'une solution ;

ϵ représente le coefficient d'extinction molaire d'une molécule à une longueur d'onde donnée exprimée en $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$;

l représente la longueur parcourue par la lumière dans la solution exprimée en cm ;

c représente la concentration de la molécule absorbant la lumière exprimée en M.

Grâce à la loi de Beer-Lambert démontrant que l'absorbance de la solution est directement proportionnelle à sa concentration en molécule, il est possible de convertir la vitesse de la variation de l'absorbance en vitesse d'hydrolyse des β -lactames.

La cinétique de l'activité enzymatique des variantes de BlaC a été étudiée selon le modèle de Michaelis-Menten, qui met en relation la vitesse d'une réaction enzymatique à la concentration en enzyme et en substrat d'une solution :

$$v = \frac{k_{cat}[E][S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

où v représente la vitesse de la réaction enzymatique exprimée en $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$;

k_{cat} représente la constante catalytique de l'enzyme pour son substrat exprimée en s^{-1} ;

K_m représente la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat exprimée en M ;

$[E]$ représente la concentration d'enzyme dans le milieu réactionnel exprimée en M ;

$[S]$ représente la concentration initiale de substrat dans le milieu réactionnel exprimée en M.

Les constantes obtenues par l'équation de Michaelis-Menten permettent de comparer l'activité enzymatique des différentes enzymes. La constante catalytique (k_{cat}) exprime la vitesse à

laquelle l'enzyme convertit son substrat en produit, la constante d'affinité (K_m) exprime la qualité de l'affinité avec laquelle l'enzyme lie son substrat et le rapport k_{cat}/K_m donne une appréciation générale de l'efficacité enzymatique de l'enzyme.

En dernier lieu, l'inhibition des variantes de BlaC a été évaluée avec le modèle d'inhibition irréversible décrit par Krippendorff *et al.* mettant en relation la concentration d'inhibiteur lorsque l'activité enzymatique atteint 50% d'inhibition (IC_{50}) au temps d'incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur :⁴⁷

$$IC_{50}(t) = K_i \left(1 + \frac{S}{K_m}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta IC_{50} \cdot k_{inac} \cdot t}}{\eta IC_{50} \cdot k_{inac} \cdot t} - 1\right) \quad (3)$$

$$\eta IC_{50} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \left(1 + \frac{S}{K_m}\right) + IC_{50}(t)}$$

où $IC_{50}(t)$ représente la variation de l' IC_{50} en fonction du temps exprimée en M ;

t représente le temps d'incubation de l'enzyme avec son inhibiteur exprimé en s ;

k_{inac} représente la constante d'inactivation de l'enzyme par son inhibiteur exprimé en s^{-1} ;

K_i représente la constante d'affinité de l'enzyme pour son inhibiteur exprimée en M ;

K_m représente la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat exprimée en M ;

S représente la concentration initiale de substrat dans le milieu réactionnel exprimée en M.

Comme dans le cas des constantes cinétiques de l'équation de Michaelis-Menten, les constantes obtenues par le modèle d'inhibition de Krippendorff *et al.* permettent de comparer les variantes de BlaC en terme d'inhibition par le clavulanate. La constante d'inactivation (k_{inac}) exprime la vitesse à laquelle l'enzyme est inactivée par son inhibiteur, la constante d'affinité (K_i) exprime la qualité de l'affinité avec laquelle l'enzyme lie son inhibiteur et le rapport k_{inac}/K_i donne une appréciation générale de l'efficacité inhibitrice du clavulanate sur l'enzyme.

CHAPITRE 2.

ARTICLE

L'article suivant a été soumis le 30 septembre 2014 au Journal *Protein Science* et a été accepté le 3 décembre 2014.

2.1 Contribution des auteurs

Philippe Egesborg a effectué la cinétique enzymatique des mutants IRT de BlaC avec les différents substrats étudiés. Il a mis au point la cinétique d'inhibition irréversible de Krippendorf pour BlaC et ses mutants conjointement avec Hélène Carlettini puis a effectué les expériences d'inhibition sur les différents variants de BlaC. Il a aussi effectué la mutagenèse dirigée nécessaires pour l'obtention des mutants doubles IRT de BlaC. Il a également participé à l'écriture de l'article dans sa forme final.

Hélène Carlettini a mis au point la cinétique enzymatique de Michaelis-Menten pour l'enzyme BlaC puis a effectué sa cinétique avec les différents substrats étudiés. Elle a effectué la mutagenèse dirigée nécessaire pour l'obtention de plusieurs mutants simples IRT de BlaC (C69L, R220S, K234R). Elle a effectué la majeure partie de la revue de littérature entourant le sujet de BlaC et des β -lactamases et est la principale responsable de la rédaction de la première forme de l'article tel qu'il était en fin de l'année 2013.

Jordan P. Volpato a démarré le projet de BlaC. Il a mis au point la purification de BlaC et a effectué la mutagenèse dirigée pour l'obtention du mutant simple S130G.

Nicolas Doucet a dirigé l'ensemble du projet de BlaC. Il a été responsable du financement du projet. Il a participé à la rédaction de l'article de BlaC et a été le principal correcteur de celui-ci.

2.2 Résumé de l'article

Pour le résumé en français de l'article, voir la page v de la section liminaire du mémoire.

Combinatorial active-site variants confer sustained clavulanate resistance in BlaC β -lactamase from *Mycobacterium tuberculosis*

Philippe Egesborg,¹ Hélène Carlettini,¹ Jordan P. Volpato,¹
and Nicolas Doucet^{1,2,3*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

²PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, Université Laval, Québec, Québec, G1V 0A6, Canada

³GRASP, the Groupe de Recherche Ax e sur la Structure des Prot eines, 3649 Promenade Sir William Osler, McGill University, Montréal, Québec, H3G 0B1, Canada

Received 30 September 2014; Accepted 3 December 2014

DOI: 10.1002/pro.2617

Published online 00 Month 2014 proteinscience.org

Abstract: Bacterial resistance to β -lactam antibiotics is a global issue threatening the success of infectious disease treatments worldwide. *Mycobacterium tuberculosis* has been particularly resilient to β -lactam treatment, primarily due to the chromosomally encoded BlaC β -lactamase, a broad-spectrum hydrolase that renders ineffective the vast majority of relevant β -lactam compounds currently in use. Recent laboratory and clinical studies have nevertheless shown that specific β -lactam–BlaC inhibitor combinations can be used to inhibit the growth of extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis*, effectively offering new tools for combined treatment regimens against resistant strains. In the present work, we performed combinatorial active-site replacements in BlaC to demonstrate that specific inhibitor-resistant (IRT) substitutions at positions 69, 130, 220, and/or 234 can act synergistically to yield active-site variants with several thousand fold greater *in vitro* resistance to clavulanate, the most common clinical β -lactamase inhibitor. While most single and double variants remain sensitive to clavulanate, double mutants R220S-K234R and S130G-K234R are substantially less affected by time-dependent clavulanate inactivation, showing residual β -lactam hydrolytic activities of 46% and 83% after 24 h incubation with a clinically relevant inhibitor concentration (5 μ g/ml, 25 μ M). These results demonstrate that active-site alterations in BlaC yield resistant variants that remain active and stable over prolonged bacterial generation times compatible with mycobacterial proliferation. These results also emphasize the formidable adaptive potential of inhibitor-resistant substitutions in β -lactamases, potentially casting a shadow on specific β -lactam–BlaC inhibitor combination treatments against *M. tuberculosis*.

Keywords: Class A β -lactamases; β -lactam; antibiotic resistance; *Mycobacterium tuberculosis*; site-directed mutagenesis; clavulanic acid; combinatorial mutagenesis

Abbreviations: BZ, benzylpenicillin; CD, circular dichroism; CF, cephalothin; CLA, clavulanate; CMT, complex mutant TEMs; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxim; ESBL, extended-spectrum β -lactamase; FOX, cefoxitin; IRT, inhibitor-resistant β -lactamase; MDR, multidrug resistant; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; PBPs, penicillin-binding proteins; TB, tuberculosis; TDR, totally drug resistant; XDR, extensively-drug resistant.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC); Grant number: RGPIN 402623-2011; Grant sponsor: "Fonds de Recherche Québec – Nature et Technologie" (FRQNT), Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS.

*Correspondence to: Nicolas Doucet, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. E-mail: nicolas.doucet@iaf.inrs.ca

Introduction

Tuberculosis (TB) remains one of the most virulent diseases to affect human beings, with a yearly mortality rate of nearly two million individuals worldwide.¹ *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is the source of this deadly infection normally eradicated through the Directly Observed Treatment Short-course (DOTS), a World Health Organization control strategy involving a 6- to 9-month continuous chemotherapy effective at treating drug-susceptible TB.² Numerous cases of Mtb infections are nevertheless seriously becoming difficult to overcome due to the growing number of resistant Mtb strains against a broad range of antibiotics. These multidrug resistant (MDR), extensively-drug resistant (XDR), and totally drug-resistant (TDR) Mtb strains lead to the failure of traditional drug treatments, making TB a newly revived global health concern after more than 80 years of successful antibiotic therapy.^{2,3}

The β -lactam antibiotics family, which primarily cover the classical penicillin, cephalosporin, and carbapenem compounds (Fig. 1), were never seriously considered for the treatment of TB due to intrinsic Mtb resistance to penicillins, an observation that was originally attributed to the allegedly impenetrable mycobacterial cell wall.⁴ While β -lactam resistance can arise from a number of molecular mechanisms, the most common factor contributing to Mtb resistance is the production of BlaC β -lactamase, an enzyme that can hydrolyze a broad range of β -lactam antibiotics before they exert their inhibiting effect on the penicillin-binding proteins (PBPs), periplasmic enzymes involved in proper cell wall synthesis and maintenance.⁵ The chromosomally encoded BlaC β -lactamase is an Ambler class A enzyme⁶ responsible for the inefficiency of β -lactams in TB treatment.⁷ While the discovery of BlaC dates back to the 1960s,⁸ it took nearly 50 years to fully elucidate its detailed molecular structure and mechanism.⁹ Although BlaC is a structural homolog of the prototypical TEM-1 and SHV-1 β -lactamases, these enzymes are nonetheless significantly distinct, both structurally and functionally. TEM-1 and SHV-1 are 65% identical and show narrow active-site clefts that prevent the recognition of extended-spectrum β -lactam antibiotics. In contrast, BlaC is only 40% and 44% identical to TEM-1 and SHV-1, respectively (Table SI, Fig. S1, Supporting Information). The active site of BlaC is also substantially wider and more open than that of its counterparts, allowing the enzyme to recognize and hydrolyze clinically relevant antibiotics. BlaC exhibits high k_{cat} values for both penicillins and cephalosporins, making it an extended-spectrum β -lactamase (ESBL) with broad substrate recognition and a capacity to hydrolyze the latest generations of β -lactam antibiotics, including carbapenems.¹⁰ As a unique ESBL β -lactamase, the BlaC mutational and

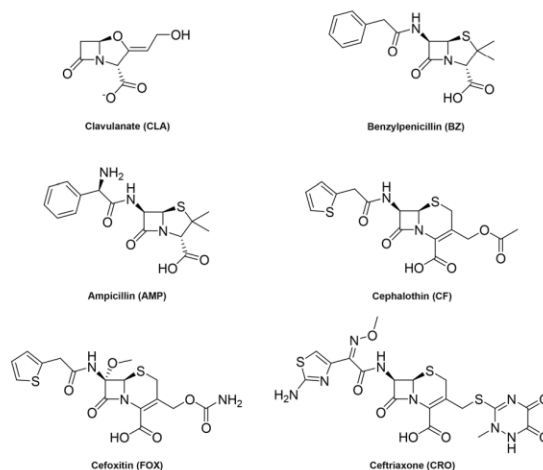


Figure 1. Structures of β -lactam antibiotics used in this study. BZ and AMP are classical penicillins; CF, FOX, and CRO are first-, second-, and third-generation cephalosporins, respectively. CLA is a class A β -lactamase inhibitor.

evolutionary behavior with respect to resistance acquisition may follow a distinct path from that of the TEM and SHV homologues. Further BlaC investigation is therefore warranted, especially in light of its suspected clinical importance in TB treatment.

The shared and renewed interest in the molecular function of BlaC stems from recent reports demonstrating that combinations of β -lactam antibiotics with β -lactamase inhibitors can efficiently inhibit the growth of MDR and XDR strains of *M. tuberculosis* *in vitro* and *in vivo*.^{1,11} To this day, the most efficient β -lactam combination is a mix between the broadly used carbapenem meropenem and the highly potent class A β -lactamase inhibitor clavulanate.¹ This cocktail was shown promising against XDR strains of *M. tuberculosis* *in vivo*, including a successful clinical case demonstrating its effectiveness as part of a multidrug regimen.¹² The meropenem-clavulanate combination—and potentially better adapted β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations that do not require intravenous deliveries—could very well become serious chemotherapeutic agents against XDR and MDR TB cases in the coming years.^{4,13} The strength of these drug combinations lies in the ability of the inhibitor to inactivate BlaC, thus preventing the hydrolysis of the β -lactam substrate, which can subsequently reach the PBP target in the periplasmic space of the bacterium. Through this process, the polymerization of peptidoglycan chains in the cell wall is halted, eventually leading to bacterial cell death and TB remission.

Unfortunately, clinical exposure to β -lactam drugs may see the appearance of broad-spectrum antibiotic resistance BlaC variants, as previously observed with homologous class A β -lactamases. In fact, previous directed evolution studies performed

on β -lactamases successfully predicted the future appearance of beneficial mutations leading to increased antibiotic resistance in a number of clinically relevant bacterial species.¹⁴ This resistance mechanism typically occurs through beneficial mutations introduced at key residue positions in the β -lactamase gene.¹⁰ As a result, numerous β -lactamase variants have been characterized as ESBL due to their broadened substrate recognition. Several mutational combinations were also clinically identified to confer increased resistance to inhibitors such as clavulanate or tazobactam, yielding the inhibitor-resistant β -lactamase phenotype (IRT).¹⁵ Originally discovered in TEM-1 from *Escherichia coli*—hence the inhibitor-resistant TEM abbreviation ‘IRT’—these mutational combinations are now widespread and have been described in numerous species.^{16,17} Although reports have shown that BlaC can be inhibited for short periods of time by clavulanate, a recent study focusing on single BlaC IRT variants revealed that the slow cell-wall turnover of the mycobacterial generation (close to 24 h) and the irreversible inhibition of IRT variants by clavulanate over a period of 24 h is likely to prevent resistance acquisition from structural alterations of BlaC.¹³

Previous directed evolution studies on TEM and SHV homologues provided clues on single and multiple replacements at key active-site positions that either reduce enzyme affinity for inhibitors or favor their breakdown by the enzyme.^{14,15} These studies have determined mutational hotspots that combinatorially enhance the individual kinetic properties of single replacements, correctly predicting clinically relevant variants, their order of mutational appearance and their structural effects on the enzyme.¹⁸ Despite the functional and structural similarity between BlaC and other class A β -lactamases, it was recently hypothesized that mutational variants are not likely to confer the same evolutionary advantage to BlaC upon exposure to clinical antibiotics, although no combinatorial variants were tested.¹³ To test this hypothesis, the present study describes individual and combinatorial residue replacements in the vicinity of the active site in BlaC, specifically focusing on positions that were shown to yield inhibitor-resistant phenotypes in homologous β -lactamases, i.e. positions 69, 130, 220 (or 244), and 234.¹⁵ To our knowledge, no study has ever systematically characterized the resistance effects of combining these individual active-site IRT mutations in class A β -lactamases.

Our results corroborate the fact that class A β -lactamase IRT positions also confer clavulanate resistance in BlaC, yielding active-site variants with several thousand fold greater *in vitro* resistance to clavulanate than WT BlaC. Most single and double IRT variants remain sensitive to clavulanate over periods of several hours, seriously hampering their

efficacy at averting clavulanate inhibition in slow-growing mycobacterial species such as Mtb. Nonetheless, we observe synergistic effects between the S130G and K234R replacements, producing a double variant that conserves more than 80% residual activity after 24 h incubation in presence of a clinically relevant clavulanate concentration. Although the time-dependent clavulanate inactivation of some BlaC variants suggests that single IRT substitutions are unlikely to appear in clinical isolates of Mtb subjected to β -lactam- β -lactamase inhibitor treatments, caution is advisable for specific active-site combinatorial substitutions that could emerge upon selective pressure.

Results

Thermal stability of single and double IRT mutants

Positions 69, 130, 220, and 234 were primarily targeted for single and double mutagenesis substitutions in BlaC (Fig. 2). Circular dichroism (CD) was used to assess the effect of mutational replacements on the overall fold and thermal stability of BlaC variants. The far-UV molar ellipticity spectra of all variants are very similar, showing the classical α -helical protein profiles corresponding to peaks around 208 and 222 nm (Fig. 3).¹⁹ None of the variants show signs of partial unfolding when compared to WT BlaC, confirming that the overall fold of all BlaC variants is very similar to that of the wild-type enzyme. Mutants were also thermally denatured, allowing the determination of T_m for WT BlaC and all mutants (Table I). Renaturation experiments were also attempted, but all thermal melting profiles were irreversible over the temperature range studied. Results show that most substitutions perturb the thermal stability of the enzyme by 2–4°C except for variant S130G, which is identical to WT. Interestingly, no significant effect on thermal stability is observed when combining two mutational substitutions. Except for S130G-K234R ($\Delta T_m = -4.1^\circ\text{C}$ relative to WT), double variants R220S-K234R and C69L-K234R are in the same thermal stability range as their respective single mutants. Despite the fact that S130G-K234R is the least thermostable variant tested, it remains the least affected variant with respect to time-dependent clavulanate inactivation (*vide infra*). In the current context, we conclude that thermal stability plays a minor role on long-term BlaC stability.

Enzyme kinetics of single IRT mutants

Kinetic parameters for two classical penicillins (BZ and AMP) and a first generation cephalosporin (CF) are listed in Table II. In line with a recent report focusing on ampicillin and nitrocefin resistance at positions R220 and S130,¹³ we found that K_m values

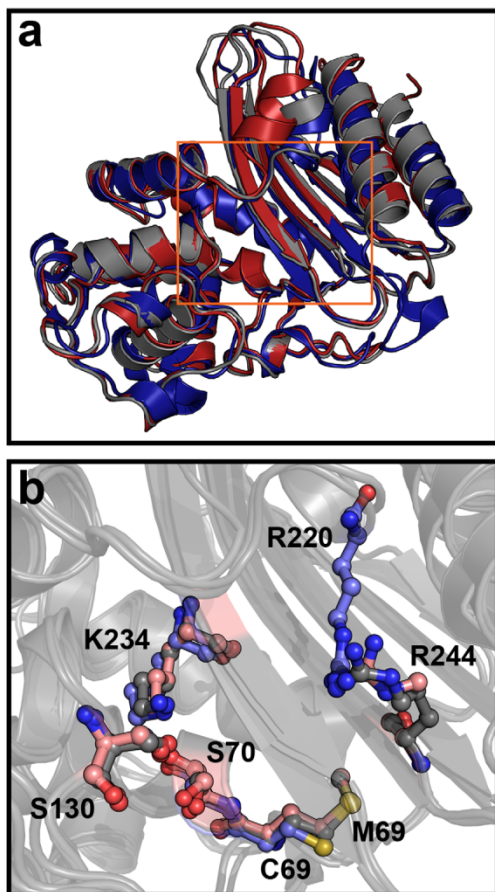


Figure 2. Structural overlay of BlaC, TEM-1, and SHV-1 β -lactamases. (A) Structures of the homologous BlaC (PDB entry 2GDN), TEM-1 (PDB entry 1BTL), and SHV-1 (PDB entry 1SHV) β -lactamases are shown in blue, gray, and red, respectively. Position of the active site is indicated by a square and zoomed in panel B. (B) Active-site representation of IRT residues targeted by single and combinatorial mutagenesis in BlaC (C69, S130, R220, and K234). The S70 nucleophile is also shown. A standard coloring scheme is used for atomic representation: red for oxygen, blue for nitrogen, and yellow for sulfur. Carbon atoms are colored slate for BlaC, gray for TEM-1 and pink for SHV-1.

increased for all BlaC single variants tested against BZ, ranging from 3-fold (C69L) to 85-fold (R220S) relative to WT. A similar portrait can be observed for AMP, whereby K_m values increased 2-fold (S130G) to 13-fold (R220S) relative to WT, with the exception of variant C69L, which displayed nearly 3-fold greater affinity than WT. Consistent with homologous enzymes, these results confirm that IRT replacements are generally tolerated at the expense of penicillin binding affinity in BlaC. On the contrary, catalytic rates (k_{cat}) vary considerably from BZ to AMP, showing turnover increases for all variants toward BZ and relatively few perturbations for AMP. Interestingly, variant K234R is 63-fold (BZ)

and 16-fold (AMP) faster at hydrolyzing penicillins than WT BlaC, confirming the mechanistic importance of this residue in the catalytic rate of BlaC. This increase in catalytic rate against penicillins is surprising, considering that the K234R yields the opposite effect in the homologous class A β -lactamase TEM-1.²⁰ However, the same study demonstrates that the K234R mutation does increase k_{cat} against carboxypenicillins in TEM-1, effectively tuning the enzyme toward hydrolysis of distinct substrates. These results illustrate the unique features of the BlaC active site relative to other well-known class A β -lactamases, further exemplifying the fact that all mutations do not carry similar effects in the context of otherwise structurally similar folds. Since affinity loss is generally compensated by an increase in turnover, catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) remain less than an order of magnitude lower than that of WT BlaC for all single variants tested against penicillins.

For the three cephalosporins tested (CF, FOX, and CRO), IRT replacements were generally found to be detrimental to the hydrolytic potential of BlaC, often preventing kinetic measurements. While k_{cat} values for C69L (3.5 s^{-1}) and K234R (2.1 s^{-1}) toward the first generation CF substrate are lower than that of BlaC (18 s^{-1}), their K_m values remain similar, leading to modest 4- to 8-fold decreases in catalytic efficiency (Table II). In contrast, kinetic parameters for all other mutants are considerably affected. While S130G loses more than two orders of magnitude in catalytic efficiency relative to WT, activity for R220S was barely measurable against CF. This behavior was also observed for the second-generation FOX and the third-generation CRO cephalosporin compounds. Neither K_m nor k_{cat} could be calculated for S130G or R220S against CRO and FOX, confirming that cephalosporins are very poor

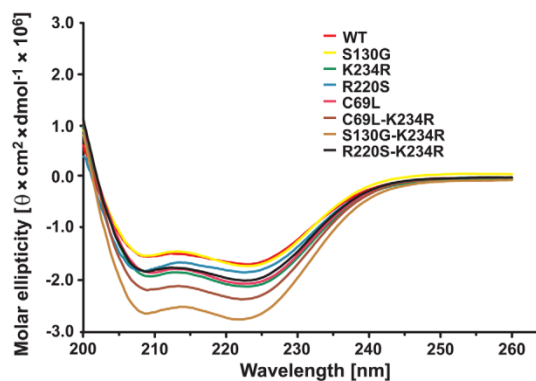


Figure 3. Circular dichroism spectra of WT BlaC and IRT variants. The far-UV spectra are shown for enzymes in 200 mM phosphate buffer (pH 7.0, 25°C). Thermal denaturation (T_m) values monitored by CD spectroscopy are given in Table I.

Table I. Thermal Denaturation of WT and Mutant BlaC β -lactamase Variants Monitored by CD Spectroscopy

| | T_m ($^{\circ}\text{C}$) | ΔT_m relative to WT ($^{\circ}\text{C}$) |
|-------------|------------------------------|--|
| WT BlaC | 49.9 \pm 0.6 | 0 |
| C69L | 46.2 \pm 0.4 | -3.7 |
| S130G | 50.1 \pm 0.2 | +0.2 |
| R220S | 47.6 \pm 0.3 | -2.4 |
| K234R | 47.3 \pm 0.3 | -2.6 |
| S130G-K234R | 45.8 \pm 0.2 | -4.1 |
| R220S-K234R | 47.9 \pm 0.4 | -2.0 |
| C69L-K234R | 46.9 \pm 0.3 | -3.0 |

Mean value \pm standard deviation.

substrates for the majority of BlaC IRT variants. In our single mutant analyses, the K234R replacement remained the least perturbed catalyst with respect to FOX, showing 6-fold lower k_{cat}/K_m relative to WT. Apart from K234R, only C69L displayed measurable activities against FOX and CRO hydrolysis, with 52-fold (FOX) and 35-fold (CRO) lower catalytic efficiencies relative to WT (not shown).

Enzyme kinetics of double IRT mutants

We synthesized a series of double IRT variants to investigate whether combining IRT mutations yielded additive or synergistic effects on enzyme catalysis and/or inhibitor resistance in BlaC. Because functional and structural information is already available for numerous members of this enzyme family, this semi-rational approach was shown more likely to generate positive results and synergistic mutations than single replacements or strictly random directed evolution strategies.²¹ In light of the fact that the K234R rate of hydrolysis is significantly higher against penicillin substrates, we also investigated whether mutational combinations in presence of the K234R replacement could generate an inhibitor-resistant variant that remains significantly active against penicillin substrates. Because of the higher catalytic rate of K234R, this mutation combined to other IRT replacements could potentially confer an evolutionary hydrolysis advantage to Mtb upon introduction of penicillin-inhibitor combination treatments in the clinic.

Focusing on the aforementioned point mutants, the following double mutants were synthesized: C69L-S130G, C69L-R220S, C69L-K234R, S130G-R220S, S130G-K234R, and R220S-K234R. Preliminary assessment of activity showed that variants C69L-S130G, C69L-R220S, and S130G-R220S all displayed very low activities against BZ (not shown), confirming that these mutational combinations would likely not confer any *in vivo* evolutionary advantage to Mtb in presence of a penicillin- β -lactamase inhibitor cocktail. These results are in line with recent survival assays performed with

Table II. β -lactam Hydrolysis by WT BlaC and Several Single/Double Variants

| | Benzylpenicillin (BZ) | | | Ampicillin (AMP) | | | Cephalothin (CF) | | |
|-------------|-------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------|--------------------------------------|---|
| | K_m (μM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) | K_m (μM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) | K_m (μM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) |
| WT | 33 \pm 3 | 6.3 \pm 1.8 | 0.19 \pm 0.07 | 470 \pm 90 | 7.5 \pm 0.7 | 0.016 \pm 0.007 | 210 \pm 30 | 18 \pm 2 | 0.086 \pm 0.002 |
| C69L | 110 \pm 10 | 22 \pm 1 | 0.20 \pm 0.01 | 170 \pm 40 | 3.1 \pm 0.3 | 0.018 \pm 0.006 | 320 \pm 80 | 3.5 \pm 0.1 | 0.011 \pm 0.003 |
| S130G | 390 \pm 30 | 22 \pm 7 | 0.056 \pm 0.020 | 1100 \pm 270 | 4.0 \pm 0.6 | 0.0036 \pm 0.0010 | 770 \pm 440 | 0.13 \pm 0.06 | 0.00016 \pm 0.00010 |
| R220S | 2800 \pm 200 | 99 \pm 20 | 0.035 \pm 0.010 | 6100 \pm 1700 | 11 \pm 4 | 0.0018 \pm 0.0010 | n/m | n/m | 0.0005 \pm 0.001 |
| K234R | 460 \pm 110 | 400 \pm 50 | 0.87 \pm 0.12 | 750 \pm 180 | 120 \pm 10 | 0.16 \pm 0.06 | 110 \pm 10 | 2.1 \pm 0.1 | 0.019 \pm 0.006 |
| S130G-K234R | 1800 \pm 400 | 4.2 \pm 0.8 | 0.0023 \pm 0.0010 | 2800 \pm 400 | 0.52 \pm 0.05 | 0.00019 \pm 0.00002 | n/m | n/m | n/m |
| R220S-K234R | 2200 \pm 500 | 16 \pm 3 | 0.0073 \pm 0.0040 | 14000 \pm 6000 | 4.0 \pm 1.5 | 0.00029 \pm 0.00003 | n/m | n/m | n/m |
| C69L-K234R | 400 \pm 100 | 410 \pm 4 | 1.0 \pm 0.4 | 1700 \pm 600 | 94 \pm 16 | 0.055 \pm 0.022 | 52 \pm 8 | 0.053 \pm 0.002 | 0.0010 \pm 0.0001 |

Mean value \pm standard deviation. n/m, not measurable.

Table III. Inhibition of WT BlaC and Single/Double Variants by Clavulanate

| | K_i (μM) | k_{inac} (s^{-1}) | k_{inac}/K_i ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) | k_{cat} (s^{-1}) | $k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$ | k_{inac}/K_i relative to WT | $k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$ relative to WT |
|-------------|-------------------------|---------------------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|--|---|
| WT | 0.43 ± 0.05 | 0.15 ± 0.04 | 0.35 ± 0.05 | 0.71 ± 0.18 | 4.7 ± 1.2 | 1 | 1 |
| C69L | 4.5 ± 0.3 | 0.19 ± 0.03 | 0.042 ± 0.010 | 2.2 ± 0.2 | 12 ± 1 | 0.12 | 3 |
| S130G | 260 ± 40 | 0.0090 ± 0.0020 | $3.5 \pm 1.3 \times 10^{-5}$ | 2.0 ± 0.2 | 220 ± 20 | 0.0001 | 47 |
| R220S | 260 ± 30 | 0.0050 ± 0.0010 | $1.9 \pm 0.2 \times 10^{-5}$ | 1.1 ± 0.1 | 210 ± 20 | 0.00005 | 45 |
| K234R | 29 ± 8 | 0.030 ± 0.020 | $1.0 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ | 1.2 ± 0.3 | 40 ± 11 | 0.003 | 8.5 |
| S130G-K234R | 130 ± 40 | n/a | n/a | n/a | 450 ± 10 | n/a | 96 |
| R220S-K234R | 620 ± 20 | 0.0017 ± 0.0001 | $2.7 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ | 2.1 ± 0.4 | 1200 ± 200 | 0.000008 | 255 |
| C69L-K234R | 79 ± 31 | 0.037 ± 0.011 | $4.7 \pm 0.7 \times 10^{-4}$ | 1.4 ± 0.2 | 39 ± 7 | 0.001 | 8.3 |

Mean value \pm standard deviation.

R220 and S130 replacements in BlaC.¹³ On the contrary, variants S130G-K234R, R220S-K234R, and C69L-K234R displayed measurable activities in presence of BZ (Table I). We found that all three active double variants showed additive or synergistic combinations with detrimental effects on K_m . Similarly, we also observed that the high k_{cat} of K234R against BZ could not overcome the deleterious effects caused by the partnering mutation in two double mutants, yielding 27-fold (R220S-K234R) and 95-fold (S130G-K234R) lower catalytic efficiencies relative to WT. In contrast, the C69L mutation had no negative impact on the improved K234R k_{cat} in the context of the C69L-K234R double variant. Indeed, C69L-K234R maintains the same improved k_{cat} as K234R, yielding 4- to 6-fold better catalytic efficiencies than WT for the two penicillin substrates tested. Much like with the single K234R variant, no significant catalytic advantage is observed for C69L-K234R against CF. Additionally, as expected from the poor activity of single variants toward cephalosporin substrates, no activity could be measured for any double variant against FOX and CRO.

Inhibition parameters of IRT variants in presence of clavulanate

The inactivation of WT BlaC by the Food and Drug Administration (FDA)-approved β -lactamase inhibitor, clavulanate (CLA), proceeds through an irreversible mechanism that forms an enzyme-bound acyclic imine, which is subsequently decarboxylated to generate a stable $\Delta m/z = +154$ adduct on the catalytic S70 residue.²² While this mechanism was kinetically and structurally investigated on the WT enzyme,^{22,23} no systematic combinatorial study on known IRT replacements has been performed to date. The effect of evolutionary pressure caused by clavulanate introduction in TB treatment is therefore unknown. On the basis of the irreversible mechanism model described by Hugonnet and Blanchard,²² we investigated the effect of single and double active-site replacements on clavulanate inhibition using the IC_{50} method described by Krippendorff *et al.*²⁴ under clearly defined conditions (Table SII, Supporting

Information). The inactivation rate at which the enzyme-inhibitor complex is formed (k_{inac}), the inhibitor binding affinity (K_i), the clavulanate hydrolysis rate (k_{cat}), and the partition ratio ($k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$) for BlaC and characterized variants are shown in Table III.

All single variants tested show resistance to clavulanate, confirming that the IRT phenotype observed in class A homologous provides a similar resistance advantage to BlaC. C69L is the least perturbed BlaC variant when compared to WT, displaying a K_i of $4.5 \mu\text{M}$ ($0.43 \mu\text{M}$ for WT) and a k_{inac} in the same range as BlaC. This yields a variant only three times more likely to hydrolyze clavulanate than WT ($k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$), which is mainly due to a 3-fold increase in the rate of clavulanate hydrolysis ($k_{\text{cat}} = 2.2 \text{ s}^{-1}$ relative to 0.71 s^{-1} for WT). In contrast, all other single variants show substantially perturbed clavulanate binding affinities, ranging from 67-fold (K234R) to 605-fold (S130G) higher K_i s, and lower inactivation rates (k_{inac}) ranging from 0.030 s^{-1} (K234R) to 0.0050 s^{-1} (R220S). This yields variants 8 to 47 times more likely than WT to breakdown clavulanate than being inactivated by it ($k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$). Double IRT variant R220S-K234R has a synergistically detrimental effect on clavulanate affinity when compared to its deconvoluting single mutants ($K_i = 620 \mu\text{M}$ for R220S-K234R, relative to 260 and 29 μM for R220S and K234R, respectively). The effect on k_{inac} is comparable and the presence of the K234R mutation exacerbates the R220S replacement. This yields a double variant with a k_{inac}/K_i ratio 127,000-fold lower than WT, demonstrating that clavulanate is terribly inefficient at inhibiting R220S-K234R. Furthermore, introducing both the R220S and K234R in combination also increases the partition ratio by three orders of magnitude relative to WT. This important increase in the likelihood of clavulanate breakdown by the R220S-K234R is due to a combination of a 3-fold decrease in k_{inac} and a 2-fold increase in k_{cat} when compared with R220S, the most resistant single variant related to this particular double variant. The C69L-K234R double variant features a similar partition ratio as that of

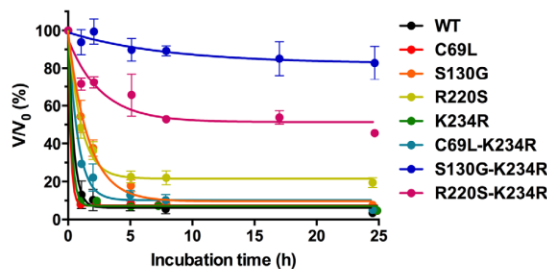


Figure 4. Time-dependent enzyme inactivation of BlaC and IRT variants by clavulanate. Enzymes were incubated for 24 h in presence of a clinically relevant clavulanate concentration (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 μM), as described.¹³ Residual activity was calculated with BZ as reporter substrate. Rapid enzyme deactivation is observed within minutes for all single replacements and for the C69L-K234R double variant, showing less than 30% residual activity after less than 5 h. However, double variants R220S-K234R and S130G-K234R are significantly more resistant to time-dependent clavulanate inactivation, showing residual activities of 46% and 83% after 24 h, respectively.

K234R, further increasing the resemblance between those variants. The S130G-K234R variant possesses a partition ratio 2-fold greater than its related single variant S130G, while being almost 3-fold lower than the partition ratio of the R220S-K234R double variant. Since this enzyme lacks a measurable k_{inac} , it is likely that this variant possesses a similarly low k_{cat} , possibly the lowest of all variants. Altogether, these results demonstrate synergistic effects resulting from combinatorial active-site replacements in BlaC, considerably increasing clavulanate resistance acquisition and providing improved inhibitor hydrolysis potential to this enzyme.

Susceptibility of IRT variants over 24 h

To investigate whether the single and combinatorial IRT replacements produced in the present study could potentially become a threat to future β -lactam treatment, we performed *in vitro* inactivation experiments on BlaC variants. To mimic inhibitor concentrations used for *in vivo* Mtb susceptibility tests, enzyme variants were incubated for 24 h in presence of a clinically relevant clavulanate concentration (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 μM), as recently described.¹³ Our results show rapid enzyme deactivation by clavulanate for most variants (Fig. 4). All single replacements and the C69L-K234R double variant show less than 30% residual activity after only 5 h incubation, in agreement with previous resistance patterns observed for single substitutions at positions S130, R220, and T237.¹³ However, double variants R220S-K234R and S130G-K234R are substantially less affected by time-dependent clavulanate inactivation, showing residual β -lactam hydrolytic activities of 46% and 83% after 24 h incubation, respectively.

Discussion

To predict and characterize clavulanate resistance in BlaC, we constructed a series of mutants at residue positions that were individually shown to be involved in IRT phenotype acquisition in class A β -lactamases.^{15,25} Positions 69, 130, 234, and 220/244 are the sites of most commonly observed IRT replacements found in clinical isolates of homologous β -lactamases.^{14,15} M69 (C69 in BlaC) is very close to the strictly conserved catalytic nucleophile S70 and is the most common residue replacement reported in TEM IRT variants [Fig. 2(b)].¹⁵ To this day, nearly 30 IRTs and/or CMTs—complex mutant TEMs, which combine IRT and ESBL mutations—show an incredible tolerance for substitutions at this position.¹⁷ Despite this fact, only three substitutions (M69I, M69L, and M69V) were observed in clinical isolates or selected from directed evolution studies on TEM and SHV.²⁶ These three variants lead to important decreases in inhibitor efficiency, which was mainly attributed to hydrophobic factors.²⁷ The second targeted position is the critical S130 found in the ‘SDN’ loop, an active-site motif normally involved in transition-state stabilization.¹⁵ Because the hydroxyl group of this serine is also involved in the irreversible crosslinking of mechanism-based inhibitors between S130 and the catalytic S70, its replacement for glycine confers resistance to all β -lactamase suicide inhibitors (clavulanate, sulbactam, and tazobactam).²⁸ R220 is the structural equivalent to R244 found in many class A β -lactamases.⁹ In fact, mutational studies have shown that the side chain of R220 can compensate for the side chain of R244, demonstrating that these residues are functionally interchangeable in TEM-1²⁹ and partially interchangeable in BlaC [Fig. 2(b)].¹³ Since the guanidinium side chains of both R244 and R220 point in the same direction and roughly occupy the same strategic orientation in the active site [Fig. 2(b)], a serine replacement causes the displacement of a conserved water molecule essential for the secondary ring opening of clavulanate, thereby conferring inhibitor resistance.^{13,30–32} Finally, the Lys to Arg replacement at position 234 was detected in four combinatorial IRT clinical isolates, with SHV-84 being the only clinical β -lactamase presenting this replacement as a single substitution.^{16,33} K234 is highly conserved among class A β -lactamases and PBPs,³⁴ forming the KTG (or KSG) motif involved in substrate recognition and transition-state stabilization.^{35,36} However, K234 is replaced by arginine in most known carbenicillinases.²⁰ Recently, positions S130 and R220 were individually demonstrated to increase *in vitro* inhibitor resistance in BlaC, with minimal perturbation on *in vivo* Mtb susceptibility.¹³ However, despite the fact that they were previously observed in clinical isolates,¹⁷ combinatorial effects of these substitutions in conjunction with other

common IRT variants had not yet been assessed prior to the present study.

While kinetic parameters described here clearly demonstrate clavulanate resistance acquisition in BlaC, the slow cell wall turnover of mycobacterial species might lead to deceptive conclusions regarding the effects caused by these mutations in the cell, especially when compared to similar IRT β -lactamases found in the fast-growing Enterobacteriaceae. Bonomo and collaborators recently illustrated the startling difference between *in vitro* kinetics data and mycobacterial susceptibility, showing that variants generating high levels of *in vitro* resistance to clavulanate still remained susceptible to the inhibitor in Mtb.¹³ The authors argued that the *in vivo* resistance phenotype is a combination of time-dependent inactivation of BlaC and the slow doubling time of Mtb (~24 h). They showed that single variants at positions S130, R220, and T237 are irreversibly inactivated by clavulanate after a period of several hours, effectively annihilating the short-term resistance effect conferred by IRT replacements in BlaC. For instance, R220A, R220S, and S130G only displayed about 30% residual activity after 24 h incubation with clavulanate, confirming that enzyme kinetics data derived from observations over minutes do not reflect the true impact of antibiotic-clavulanate combinations on Mtb growth.¹³ As a result, it is expected that only BlaC variants that remain stable and resistant to clavulanate over time frames overlapping the Mtb doubling time could potentially become serious threats to clinical β -lactam antibiotic treatment.

Our results show that BlaC-S130G-K234R—and to a lesser extent BlaC-R220S-K234R—could act as potential threats to Mtb β -lactam antibiotic treatments. Indeed, both variants remain relatively immune to long-term clavulanate inactivation, preserving 83% and 46% β -lactam residual hydrolysis activity after 24 h incubation with the inhibitor. This observation suggests that combinatorial active-site IRT variants could potentially remain active and immune to *in vivo* inhibition on generation times compatible with Mtb proliferation. Interestingly, while each individual replacement was inactivated within hours (or even minutes), the double variant combinations characterized here provided synergistic advantages to BlaC, allowing the enzyme to evade the effects of clavulanate for a sustained and prolonged period of time.

Although these results clearly emphasize the formidable adaptive potential of inhibitor-resistant substitutions in β -lactamases, we also demonstrate that cephalosporin compounds remain very poor substrates for the majority of BlaC IRT variants tested, contrary to the easily hydrolyzed penicillins. This is especially true for the double variants of interest, for which no cephalosporin hydrolysis could be meas-

ured. This result may represent an interesting alternative for β -lactam-BlaC inhibitor combinations used in drug regimens against TB, whereby the penicillin β -lactam could be replaced by simple and common clinical cephalosporins such as cephalexin, cefadroxil, or cefixime, which can be administered orally as opposed to the intravenously delivered meropenem. These alternative β -lactam-BlaC inhibitor combinations could thus retain better potency against the IRT variants described in the present study, which were previously shown to appear in homologous β -lactamases upon selective antibiotic pressure.

Materials and Methods

Chemicals

Chemicals and reagents were purchased from the following suppliers: benzylpenicillin (BZ) (Biobasic, ON, Canada); cephalothin (CF), cefotaxim (CTX), ceftriaxone (CRO), ceftiofime (FOX), clavulanate (CLA), (Molekula, UK); restriction enzymes (New England Bio Labs, MA) and Pfu DNA polymerase (Feldan, QC, Canada).

Bacterial strains and mutagenesis

E. coli BL21 (DE3) was used for all cloning and protein expression procedures. The *E. coli* codon-optimized *blaC* gene coding for the mature protein⁹ was provided in pUC57 by GenScript (Piscataway, NJ) and was subsequently subcloned in pET28a(+) (EMD Millipore, MA) for protein expression. The gene was flanked by the *Nde*I and *Hind*III restriction sites. Selection was performed on 60 μ g/mL kanamycin for cell transformation and 30 μ g/mL kanamycin for protein expression. All mutants were obtained by QuikChange site-directed mutagenesis (Agilent Technologies, ON, Canada) using standard procedures.

Enzyme expression and purification

WT BlaC and all mutants were produced as previously described,²² with minor modifications. Briefly, cultures were prepared in Luria-Bertani medium (LB) and grown at 37°C until at $A_{600} = 0.4$. Protein expression was induced by the addition of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and cells were further incubated at room temperature for 16 h. Bacterial suspensions were disrupted by sonication and centrifuged at 2200g (4°C, 30 min). The supernatant was applied to a Ni-NTA agarose column and the eluted fractions containing pure protein were dialyzed against the kinetic buffer (*vide infra*). Protein purity (on average 95%) was assessed by SDS-PAGE using the ImageJ software (National Institutes of Health, MD).

Enzyme kinetics assays

Enzyme kinetics assays were performed using the following wavelengths and molar extinction

coefficients^{37–39}: BZ, 232 nm, 1000 M⁻¹ cm⁻¹; CF, 264 nm, 7960 M⁻¹ cm⁻¹; CRO, 260 nm, 9400 M⁻¹ cm⁻¹; FOX, 260 nm, 7700 M⁻¹ cm⁻¹. All substrates used in the present study are presented in Figure 1. Hydrolysis of β -lactam compounds was monitored by spectrophotometry at room temperature in 0.1M MES buffer at pH 6.4 using a Cary UV 300 spectrophotometer (Agilent).²² The kinetic parameters k_{cat} and K_m were determined from the rates of hydrolysis calculated from the initial velocity as fitted to the Michaelis-Menten equation using GraphPad Prism (CA). When substrate concentrations prevented enzyme saturation, k_{cat} and K_m were estimated from the Michaelis-Menten equation in conditions where $V_o/[E][S] \approx k_{\text{cat}}/K_m$ and $[S] \ll K_m$, as described.⁴⁰ Standard deviations were obtained by three replicates from two independent experiments.

Clavulanate inhibition assays

Inhibition assays were performed using BZ as reporter substrate. The inhibition of β -lactam hydrolysis by clavulanate was monitored by spectrophotometry using the same reaction conditions as the enzyme kinetics assays (*vide supra*). Inhibition parameters k_{inac} , K_i , and k_{inac}/K_i were determined by the IC₅₀ method described by Krippendorff *et al.*²⁴ The data were fitted to the following equation using GraphPad Prism:

$$\text{IC}_{50}(t) = K_i \left(1 + \frac{S}{K_m} \right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta \text{IC}_{50} \cdot k_{\text{inac}} \cdot t}}{\eta \text{IC}_{50} \cdot k_{\text{inac}} \cdot t} - 1 \right);$$

$$\eta \text{IC}_{50} = \frac{\text{IC}_{50}(t)}{K_i \left(1 + \frac{S}{K_m} \right) + \text{IC}_{50}(t)}$$

where K_i represents the inhibition constant, k_{inac} the inactivation rate of the enzyme; t is the incubation time of the enzyme with clavulanate; S is the substrate concentration; K_m is the Michaelis constant, and $\text{IC}_{50}(t)$ is the inhibitor concentration at which the product concentration is 50% the concentration without inhibitor. Measurements were performed at different incubation times (t) based on the k_{inac} value of each mutant. Additionally, the partition ratio ($k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$), representing the tendency of the enzyme to lean toward the breakdown of clavulanate instead of being inactivated by it, was determined using the titration method.⁴¹ Enzymes were exposed to increasing $[I]_o/[E]_o$ ratios for 24 h at room temperature. The $[I]_o/[E]_o$ ratios were plotted against residual activity of the enzyme measured using 1 mM BZ at the end of the 24 h incubation time. A linear regression of the data was performed to determine the intercept of the regression with the Y-axis, which represents the partition ratio ($k_{\text{cat}}/k_{\text{inac}}$). Standard deviations were obtained by three

replicates from two independent experiments. When the inhibition parameter k_{inac} could not be determined using the Krippendorff method (as for variant S130G-K234R), K_i was determined using a Dixon plot based on a reversible competitive inhibition model. All approximations, incubation times, as well as enzyme and ligand concentrations are presented in Table SII, Supporting Information. Fits to the Krippendorff equation are presented in Figures S2 and S3.

Susceptibility of IRT variants over 24 h

Susceptibility of IRT variants over 24 h was performed by incubating enzymes in presence of a clinically relevant clavulanate concentration (5 $\mu\text{g/mL}$, 25 μM) for extended periods of time, as described.¹³ Enzyme concentration varied according to the catalytic efficiency of the mutant toward BZ hydrolysis. Residual activity was measured by observing BZ hydrolysis at a concentration of 1 mM.

Circular dichroism spectroscopy

CD was used to assess the effect of mutational replacements on the secondary structure of the enzyme, in addition to measuring temperature denaturation of BlaC variants. CD profiles were recorded on a Jasco 815 spectropolarimeter with a Peltier-effect temperature controller (Jasco, MD). Measures were performed on 15 μM protein in 200 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 25°C.⁴² Spectra were acquired in 1 mm path length quartz cuvettes at a scan rate of 50 nm/min (175–350 nm). Thermal denaturation was carried out in the same buffer conditions by monitoring the CD signal at 208 and 222 nm. Temperature was raised in 0.1°C increments at a ramp rate of 2°C/min from 25 to 70°C. T_m values were calculated using the Jasco Spectra Manager software and the fraction folded α_i was evaluated as previously described.⁴³

Acknowledgments

N.D. holds a “Fonds de Recherche Québec-Santé” (FRQS) Research Scholar Junior 1 Career Award. The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Hugonnet JE, Tremblay LW, Boshoff HI, Barry CE, Blanchard JS (2009) Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 323:1215–1218.
- Nguyen L (2012) Targeting antibiotic resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*: recharging the old magic bullets. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:963–965.
- Beach H, Cole R, Gill ML, Loria JP (2005) Conservation of mus-ms enzyme motions in the apo- and substrate-mimicked state. *J Am Chem Soc* 127:9167–9176.

4. Kurz S, Bonomo R (2012) Reappraising the use of β -lactams to treat tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:999–1006.
5. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T (2008) Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32:361–385.
6. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG (1991) A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J* 276:269–270.
7. Flores AR, Parsons LM, Pavelka MS, Jr (2005) Genetic analysis of the β -lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to β -lactam antibiotics. *Microbiology* 151:521–532.
8. Kasik JE (1965) The nature of mycobacterial penicillinase. *Am Rev Respir Dis* 91:117–119.
9. Wang F, Cassidy C, Sacchettini JC (2006) Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase reveal its critical role in resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2762–2771.
10. Bradford PA (2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933–951.
11. Dincer I, Ergin A, Kocagoz T (2004) The vitro efficacy of β -lactam and β -lactamase inhibitors against multi-drug resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 23:408–411.
12. Dauby N, Muylle I, Mouchet F, Sergysels R, Payen M-C (2011) Meropenem/clavulanate and linezolid treatment for extensively drug-resistant tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 30:812–813.
13. Kurz SG, Wolff KA, Hazra S, Bethel CR, Hujer AM, Smith KM, Xu Y, Tremblay LW, Blanchard JS, Nguyen L, Bonomo RA (2013) Can inhibitor resistant substitutions in the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase BlaC lead to clavulanate resistance? A biochemical rationale for the use of β -lactam β -lactamase inhibitor combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 57:6085–6096.
14. Salverda MLM, De Visser JAGM, Barlow M (2010) Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev* 34:1015–1036.
15. Drawz SM, Bonomo RA (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23:160–201.
16. Mendonça N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Caniça M, Bonnet R (2008) The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1806–1811.
17. Thai QK, Bos F, Pleiss J (2009) The lactamase engineering database: a critical survey of TEM sequences in public databases. *BMC genomics* 10:390.
18. Orenica MC, Yoon JS, Ness JE, Stemmer WP, Stevens RC (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat Struct Biol* 8:238–242.
19. Kelly SM, Jess TJ, Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751:119–139.
20. Lenfant F, Labia R, Masson JM (1991) Replacement of lysine 234 affects transition state stabilization in the active site of β -lactamase TEM-1. *J Biol Chem* 266:17187–17194.
21. Chica RA, Doucet N, Pelletier JN (2005) Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr Opin Biotechnol* 16:378–384.
22. Hugonnet J-E, Blanchard JS (2007) Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase by clavulanate. *Biochemistry* 46:11998–12004.
23. Tremblay LW, Hugonnet JE, Blanchard JS (2008) Structure of the covalent adduct formed between *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase and clavulanate. *Biochemistry* 47:5312–5316.
24. Krippendorff B-F, Neuhaus R, Lienau P, Reichel A, Huisinga W (2009) Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. *J Biomol Screen* 14:913–929.
25. Guthrie VB, Allen J, Camps M, Karchin R (2011) Network models of TEM β -lactamase mutations coevolving under antibiotic selection show modular structure and anticipate evolutionary trajectories. *PLoS Comput Biol* 7:e1002184.
26. Helfand MS, Hujer AM, Sonnichsen FD, Bonomo RA (2002) Unexpected advanced generation cephalosporinase activity of the Met69Phe variant of SHV β -lactamase. *J Biol Chem* 277:47719–47723.
27. Chaibi EB, Péduzzi J, Farzaneh S, Barthélémy M, Sirot D, Labia R (1998) Clinical inhibitor-resistant mutants of the β -lactamase TEM-1 at amino-acid position 69: kinetic analysis and molecular modelling. *Biochim Biophys Acta* 1382:38–46.
28. Thomas VL, Golemi-Kotra D, Kim C, Vakulenko SB, Mobashery S, Shoichet BK (2005) Structural consequences of the inhibitor-resistant Ser130Gly substitution in TEM β -lactamase. *Biochemistry* 44:9330–9338.
29. Marciano DC, Brown NG, Palzkill T (2009) Analysis of the plasticity of location of the Arg244 positive charge within the active site of the TEM-1 β -lactamase. *Protein Sci* 18:2080–2089.
30. Delaire M, Labia R, Samama JP, Masson JM (1992) Site-directed mutagenesis at the active site of *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *J Biol Chem* 267:20600–20606.
31. Imtiaz U, Billings E, Knox JR, Manavathu EK, Lerner SA, Mobashery S (1993) Inactivation of class A β -lactamases by clavulanic acid: the role of arginine-244 in a proposed nonconcerted sequence of events. *J Am Chem Soc* 115:4435–4442.
32. Giakkoupi P, Tzelepi E, Legakis NJ, Tzouveleki LS (1998) Substitution of Arg-244 by Cys or Ser in SHV-1 and SHV-5 β -lactamases confers resistance to mechanism-based inhibitors and reduces catalytic efficiency of the enzymes. *FEMS Microbiol Lett* 160:49–54.
33. Manageiro V, Ferreira E, Albuquerque L, Bonnet R, Caniça M (2010) Biochemical study of a new inhibitor-resistant β -lactamase, SHV-84, produced by a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2271–2272.
34. Healey WJ, Labgold MR, Richards JH (1989) Substrate specificities in class A β -lactamases: preference for penams vs. cepams. The role of residues 237. *Proteins* 6:275–283.
35. Sakurai Y, Tsukamoto K, Sawai T (1991) Nucleotide sequence and characterization of a carbenicillin-hydrolyzing penicillinase gene from *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* 173:7038–7041.
36. Lenfant F, Petit A, Labia R, Maveyraud L, Samama JP, Masson JM (1993) Site-directed mutagenesis of β -lactamase TEM-1. Investigating the potential role of specific residues on the activity of *Pseudomonas*-specific enzymes. *Eur J Biochem* 217:939–946.

37. Bouthors AT, Dagonneau-Blanchard N, Naas T, Nordmann P, Jarlier V, Sougakoff W (1998) Role of residues 104, 164, 166, 238 and 240 in the substrate profile of PER-1 β -lactamase hydrolysing third-generation cephalosporins. *Biochem J* 330:1443–1449.
38. Tribuddharat C, Moore RA, Baker P, Woods DE (2003) *Burkholderia pseudomallei* class A β -lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2082–2087.
39. De Wals PY, Doucet N, Pelletier JN (2009) High tolerance to simultaneous active-site mutations in TEM-1 β -lactamase: distinct mutational paths provide more generalized β -lactam recognition. *Protein Sci* 18:147–160.
40. Fersht A. 1984. *Enzyme structure and mechanism*. New York: W.H. Freeman.
41. Silverman RB. 1988. *Mechanism-based enzyme inactivation: chemistry and enzymology*. Boca Raton, FL: CRC Press.
42. Wang X, Minasov G, Shoichet BK (2002) Noncovalent interaction energies in covalent complexes: TEM-1 β -lactamase and β -lactams. *Proteins* 47:86–96.
43. Greenfield NJ (2006) Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. *Nat Protoc* 1:2891–2899.

CHAPITRE 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les maladies infectieuses ont depuis toujours été une source importante de mortalité dans les populations humaines, particulièrement lorsque celles-ci ont adopté un mode de vie sédentaire et que leur nombre s'est mis à croître de façon exponentielle. Depuis, les progrès de la médecine moderne et des conditions sanitaires ont permis de limiter la propagation de ces maladies et d'améliorer grandement les chances de survie des individus atteints. Cependant, de nombreux nouveaux défis à relever par la communauté scientifique demeurent présents.

Les résistances aux antibiotiques ont toujours existé à côté des antibiotiques eux-mêmes, mais leur présence s'est répandue dans l'ensemble du microbiome à une vitesse grandement accélérée depuis le début de l'utilisation des antibiotiques vers 1950. De nombreuses générations d'antibiotiques ont vu le jour depuis, ciblant une grande variété de processus essentiels aux bactéries infectieuses, et toutes ont éventuellement rencontré une augmentation importante de la résistance chez les pathogènes ciblés à l'intérieur de quelques décennies d'utilisation. Le problème grandissant de la résistance aux antibiotiques a éventuellement forcé l'OMS à émettre des recommandations sur une utilisation plus responsable des antibiotiques, encourageant les professionnels de la santé à prescrire des antibiotiques de façon vigilante ainsi qu'à instruire leurs patients sur l'importance de respecter la posologie de leur traitement. Ces mesures ont pour but de ralentir la propagation des facteurs de résistance dans la population bactérienne mais ne constituent pas une solution à long terme, la pression sélective ne pouvant être contrée de cette simple façon.

Étant donné que le phénomène de pression sélective ne peut être évité, il convient de tenter de prévoir sa direction et d'adopter une attitude proactive plutôt que réactive. Dans le cas des β -lactamases telles que BlaC, l'histoire nous a montré leur grande stabilité structurelle qui leur permet de supporter une grande variété de mutations. La grande majorité de ces mutations affecte directement la topologie du site actif, permettant l'accommodation des volumineux céphèmes et carbapénèmes dans le cas des β -lactamases ESBL, ou encore l'élimination d'éléments clés aux mécanismes d'inhibitions dans le cas des β -lactamases IRT. En raison de leur forte homologie structurelle et de plusieurs résidus conservés à travers la famille des β -lactamases de classe A, il devient possible de prédire les modifications génétiques qui seront privilégiées par les microorganismes ciblés par les traitements actuels et prévoir des traitements

qui vaincraient ces mêmes modifications, accélérant ainsi nos connaissances de plusieurs années.

BlaC est une β -lactamase ESBL à l'état sauvage malgré le fait que *M. tuberculosis* n'ait jamais été traitée de façon intensive à l'aide de β -lactames. Néanmoins, comme les autres β -lactamases de classe A, elle est sensible à l'inhibition irréversible par le clavulanate. Suite à leur exposition aux combinaisons β -lactame et inhibiteur de β -lactamases, de nombreuses espèces bactériennes ont développé de nouvelles β -lactamases de classe A (TEM, SHV) pouvant résister à l'action du clavulanate. Les positions mutées, nommées IRT, se sont révélées être des résidus conservés chez les β -lactamases de classe A. Conséquemment, nous avons émis l'hypothèse que BlaC pourrait acquérir un phénotype de résistance au clavulanate par les mêmes mutations à l'intérieur de sa structure. Comme l'ont montré nos résultats et ceux de Kurz *et al.*, les essais cinétiques *in vitro* montrent une acquisition marquée de résistance à l'action du clavulanate chez plusieurs mutants IRT de BlaC, notamment S130G, R220S et K234R. Cependant, il a été montré que, contrairement à ce qui est observé chez des espèces telles que *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces mutants IRT sont insuffisants pour permettre à *M. tuberculosis* d'acquiescer une résistance à la combinaison ampicilline/clavulanate en raison de son métabolisme inhabituellement lent.

Bien que cela n'ait jamais été observé chez des β -lactamases de classe A, nous avons alors émis l'hypothèse qu'une combinaison de mutations IRT pourrait conférer à BlaC une résistance accrue au clavulanate. Nous avons montré dans cette étude que les combinaisons S130G-K234R et R220S-K234R conféraient non-seulement une résistance supérieure au clavulanate que leurs mutants simples respectifs, mais également une activité significative au-delà du temps de reproduction de *M. tuberculosis* avoisinant 24 heures. Ceci montre qu'il est possible d'obtenir une β -lactamase possédant un temps d'inactivation par le clavulanate compatible avec le lent métabolisme de *M. tuberculosis* et pouvant possiblement procurer une résistance réelle *in vivo*. Cette acquisition de résistance par BlaC se fait cependant au coût d'une activité hydrolytique réduite, et plus particulièrement au coût de son large spectre d'action. En effet, en se spécialisant dans la résistance au clavulanate, les variantes IRT doubles ont perdu la capacité d'hydrolyser les céphèmes tel que la céphalotine, une céphalosporine aisément hydrolysée par la forme sauvage de BlaC.

L'obtention d'une bactérie qui posséderait la double mutation S130G-K234R ou R220S-K234R serait un événement extrêmement rare si ces deux mutations devaient survenir au même moment. Toutefois, celle-ci devient davantage possible si ces mutations peuvent apparaître de

façon séquentielle. En effet, si une mutation ne s'effectue pas au détriment du fonctionnement de l'enzyme, celle-ci peut se répandre au sein de la population bactérienne. Comme montré dans l'étude de Kurz *et al.*²⁵ et par nos résultats *in vitro*, l'acquisition d'une mutation simple IRT ne se fait pas au détriment de la survie de *M. tuberculosis* en présence de β -lactames et de l'efficacité cinétique de BlaC. Ainsi, la possibilité d'observer ces mutants doubles IRT capable de résistance soutenue face au clavulanate est relativement plausible, d'autant plus qu'il existe possiblement d'autres combinaisons de mutations générant de tels effets. Aussi, si l'on considère simplement la grande quantité de cellules de *M. tuberculosis* à travers le monde (plusieurs dizaines de milliers ou plus de bactéries par personne affectée multiplié par le tiers de la population mondiale), on en vient à l'évidence qu'une bactérie possédant les caractères requis pour résister au clavulanate va apparaître éventuellement, considérant qu'environ une cellule de *M. tuberculosis* sur mille va faire une erreur dans son génome en se divisant en conditions normales.

En conclusion, la combinaison suggérée d'ampicilline/clavulanate pourrait être modifiée par une combinaison céphalosporine/clavulanate, qui pourrait contrer une évolution vers les mutants de BlaC décrits dans cette étude. Cette étude montre aussi la pertinence des études de mutagenèse dirigée et semi-aléatoire, permettant de prévoir les chemins évolutifs qui risqueront d'être favorisé par la pression sélective des traitements par antibiotiques contre les infections bactériennes.

RÉFÉRENCES

1. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüsche-Gerdes S, Loch C, Brisse S, Meyer A, Supply P & Niemann S (2008) Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Achtman M (Édit.) *PLoS Pathog.* 4(9): e1000160.
2. Mason RJ, Broaddus VC, Martin TR, King TE, Jr., Schraufnagel DE, Murray JF & Nadel JA (2010) Murray & Nadel's textbook of respiratory medicine. 5th ed. Volume 1. Saunders Elsevier, Philadelphia, Chapter 34: Tuberculosis, p.754-92.
3. World Health Organisation (2014) Tuberculosis: fact sheet #104. World Health Organisation, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (consulté le 1er décembre 2014)
4. Ryan KJ & Ray CG (2003) Sherris medical microbiology. 4th ed. McGraw Hill Professional, s.l. 992 p.
5. Murray P, Rosenthal K & Pfaller M (2012) Medical microbiology. 7th ed. Saunders Elsevier, s.l. 888 p.
6. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ & Kornfeld H (1997) Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 65(1): 298-304.
7. Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Eddine AN, Mann P, Goosmann C, Bandermann S, Smith D, Bancroft GJ, Reyrat JM, van Soolingen D, Raupach B & Kaufmann SHE (2005) *J Clin Invest.* 115(9): 2472-9.
8. Wang F, Cassidy C & Sacchettini JC (2006) Crystal structure and activity studies of the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase reveal its critical role in resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(8): 2762-71.
9. Farmer P (2001) The major infectious diseases in the world – to treat or not to treat?. *N Engl J Med.* 345(3): 208-10.
10. Wood AJJ & Iseman MD (1993) Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med.* 329(11): 784-91.

11. Hugonnet J-E, Tremblay LW, Boshoff HI, Barry 3rd CE & Blanchard JS (2009) Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 323(5918): 1215-8.
12. Wright GD (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Curr Opin Microbiol*. 13(5): 589-94.
13. Sykes R (2001) Penicillin: from discovery to product. *Bull World Health Organ*. 79(8): 778-9.
14. Florey HW (1945) Use of micro-organisms for therapeutic purposes. *Br Med J*. 2(4427): 635-42.
15. Davies J & Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74(3): 417-33.
16. Darwin C (1859) On the origin of species. s.n. United Kingdom, 502 p.
17. Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crécy-Lagard V, Craig WA & Romesberg FE (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol*. 3(6): e176.
18. Gyles C & Boerlin P (2014) Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol*. 51(2): 328-40.
19. Chen I & Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*. 2(3): 241-9.
20. Johnsberg O, Eldholm V & Håvarstein LS (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*. 158(10): 767-78.
21. Solomon JM & Grossman AD (1996) Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet*. 12(4): 150-5.
22. Baron S (édit) (1996) Medical microbiology. 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, 1273 p.
23. Hartl DL & Jones EW (1998) Genetics: principles and analysis. Jones and Barlett Publishers, s.l. 840 p.
24. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R & Pavilionis A (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 47(3): 137-46.
25. Kurz SG, Wolff KA, Hazra S, Bethel CR, Hujer AM, Smith KM, Xu Y, Tremblay LW, Blanchard JS, Nguyen L & Bonomo RA (2013) Can inhibitor-resistant substitutions in the

- Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase BlaC lead to clavulanate resistance?: a biochemical rationale for the use of β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(12): 6085-96.
26. Zapun A, Contreras-Martel C & Vernet T (2008) Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance, *FEMS Microbiol Rev.* 32: 361-85.
 27. Ambler RP (1980) The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc London [Biol].* 289(1036): 321-31.
 28. Page MI (1992) The chemistry of β -lactams. Blackie Academic & Professional, s.l. 351 p.
 29. Yang Y, Rasmussen BA & Shlaes DM (1999) Class A beta-lactamases -- enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacol Ther.* 83(2): 141-51.
 30. Bradford PA (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14(4): 933-51.
 31. Jacoby GA & Munoz-Price LS (2005) The new beta-lactamase. *N Engl J Med.* 352(4): 380-91.
 32. Finlay J, Miller L & Poupard JA (2003) A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J antimicrob Chemother.* 52: 18-23.
 33. Drawz SM & Bonomo RA (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 23: 160-201.
 34. Livermore DM & Woodford N (2000) Carbapenemase: a problem in waiting?. *Curr Opin Microbiol.* 3(5): 489-95.
 35. Flores AR, Parsons LM & Pavelka MS, Jr. (2005) Genetic analysis of the β -lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to β -lactam antibiotics, *Microbiology.* 151: 521-32.
 36. Hugonnet J-E & Blanchard JS (2007) Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* β -lactamase by clavulanate. *Biochemistry* 46: 11998-2004.
 37. Joint Formulary Committee (2014) British National Formulary. Pharmaceutical Press, London, United Kingdom, 1144 p.

38. Salverda MLM, De Visser JAGM & Barlow M (2010) Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev.* 34: 1015-36.
39. Helfand MS, Hujer AM, Sonnichsen FD & Bonomo RA (2002) Unexpected advanced generation cephalosporinase activity of the Met69Phe variant of SHV β -lactamase. *J Biol Chem.* 277: 47719-23.
40. Chaibi EB, Péduzzi J, Farzaneh S, Barthélémy M, Sirot D & Labia R (1998) Clinical inhibitor-resistant mutants of the β -lactamase TEM-1 at amino-acid position 69 kinetic analysis and molecular modelling. *Biochim Biophys Acta.* 1382: 38-46.
41. Thomas VL, Golemi-Kotra D, Kim C, Vakulenko SB, Mobashery S & Shoichet BK (2005) Structural consequences of the inhibitor-resistant Ser130Gly substitution in TEM β -lactamase. *Biochemistry* 44: 9330-8.
42. Giakkoupi P, Tzelepi E, Legakis NJ & Tzouvelekis LS (1998) Substitution of Arg-244 by Cys or Ser in SHV-1 and SHV-5 β -lactamases confers resistance to mechanism-based inhibitors and reduces catalytic efficiency of the enzymes. *FEMS Microbiol Lett.* 160: 49-54.
43. Imitiaz U, Billings E, Knox JR, Manavathu EK, Lemer SA & Mobashery S (1993) Inactivation of class A β -lactamases by clavulanic acid: the role of arginine-244 in a proposed nonconcerted sequence of events. *J Am Chem Soc.* 115: 4435-42.
44. Delaire M, Labia R, Samama JP & Masson JM (1992) Site-directed mutagenesis at the site of *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase. Suicide inhibitor resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *J Biol Chem* 267, 20600-6.
45. Lenfant F, Petit A, Labia R, Maveyraud L, Samama JP & Masson JM (1993) Site-directed mutagenesis of β -lactamase TEM-1. Investigating the potential role of specific residues on the activity of *Pseudomonas*-specific enzymes. *Eur J Biochem* 217: 939-46.
46. Manageiro V, Ferreira E, Albuquerque L, Bonnet R & Caniça M (2010) Biochemical study of a new inhibitor-resistant β -lactamase, SHV-84, produced by a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 2271-2.
47. Krippendorf B-F, Neuhaus R, Lienau P, Reichel A & Huisinga W (2009) Mechanism-based inhibition: deriving $K(I)$ and $k(inact)$ directly from time-dependant $IC(50)$ values. *J Biomol Screen* 14: 913-929.

ANNEXE 1.

ARTICLE SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Percentage sequence identity between BlaC (*M. tuberculosis*), BlaA (*Y. enterocolitica*), TEM-1 (*E. coli*) and SHV-1 (*K. pneumoniae*) β -lactamases.

| | Identity (%) | | | |
|-------|--------------|-------|-------|------|
| | BlaC | TEM-1 | SHV-1 | BlaA |
| BlaC | 100 | 40 | 44 | 47 |
| TEM-1 | | 100 | 65 | 39 |
| SHV-1 | | | 100 | 41 |
| BlaA | | | | 100 |

Table S2. Substrate and inhibitor concentrations used in the present study. See Materials and Methods for details.

BlaC WT kinetics studies

| | | |
|------|------------|---------------------------|
| BZ: | [E] = 5nM | [BZ] = 85 - 850 μ M |
| AMP: | [E] = 60nM | [AMP] = 75 - 1500 μ M |
| CF: | [E] = 35nM | [CF] = 150 - 500 μ M |
| FOX: | [E] = 50nM | [FOX] = 50 - 300 μ M |
| CRO: | [E] = 70nM | [CRO] = 90 - 260 μ M |

BlaC WT Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|------------|---------------------|------------------------|--------------|
| Krippendorff: | [E] = 15nM | [BZ] = 750 μ M | [CLA] = 0 - 12 μ M | t = 0 - 5min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 25nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC C69L kinetics studies

| | | |
|------|--------------|---------------------------|
| BZ: | [E] = 15nM | [BZ] = 50 - 1000 μ M |
| AMP: | [E] = 60nM | [AMP] = 75 - 1500 μ M |
| CF: | [E] = 35nM | [CF] = 150 - 500 μ M |
| FOX: | [E] = 750nM | [FOX] = 40 - 250 μ M |
| CRO: | [E] = 1000nM | [CRO] = 40 - 290 μ M |

BlaC C69L Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|-------------|---------------------|------------------------|--------------|
| Krippendorff: | [E] = 15nM | [BZ] = 700 μ M | [CLA] = 0 - 21 μ M | t = 0 - 5min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 100nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC S130G kinetics studies

| | | |
|------|--------------|----------------------------|
| BZ: | [E] = 20nM | [BZ] = 175 - 3600 μ M |
| AMP: | [E] = 160nM | [AMP] = 370 - 4700 μ M |
| CF: | [E] = 1000nM | [CF] = 50 - 500 μ M |
| FOX: | [E] = n/m | [FOX] = n/m |
| CRO: | [E] = n/m | [CRO] = n/m |

BlaC S130G Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|------------|---------------------|-------------------------|---------------|
| Krippendorff: | [E] = 20nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 0 - 500 μ M | t = 0 - 60min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 40nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC R220S kinetics studies

| | | |
|------|--------------|----------------------------|
| BZ: | [E] = 15nM | [BZ] = 400 - 6000 μ M |
| AMP: | [E] = 150nM | [AMP] = 500 - 4000 μ M |
| CF: | [E] = 2000nM | [CF] = 150 - 500 μ M |
| FOX: | [E] = n/m | [FOX] = n/m |
| CRO: | [E] = n/m | [CRO] = n/m |

BlaC R220S Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|------------|---------------------|-------------------------|---------------|
| Krippendorff: | [E] = 15nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 0 - 500 μ M | t = 0 - 40min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 25nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC K234R kinetics studies

| | | |
|------|-------------|----------------------------|
| BZ: | [E] = 5nM | [BZ] = 350 - 3500 μ M |
| AMP: | [E] = 5nM | [AMP] = 200 - 4000 μ M |
| CF: | [E] = 50nM | [CF] = 50 - 500 μ M |
| FOX: | [E] = 220nM | [FOX] = 70 - 400 μ M |
| CRO: | [E] = n/m | [CRO] = n/m |

BlaC K234R Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|------------|---------------------|-------------------------|---------------|
| Krippendorff: | [E] = 5nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 0 - 120 μ M | t = 0 - 10min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 10nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC C69L+K234R kinetics studies

| | | |
|------|--------------|----------------------------|
| BZ: | [E] = 5nM | [BZ] = 500 - 4000 μ M |
| AMP: | [E] = 10nM | [AMP] = 400 - 4000 μ M |
| CF: | [E] = 1800nM | [CF] = 40 - 400 μ M |
| FOX: | [E] = 2400nM | [FOX] = 50 - 400 μ M |
| CRO: | [E] = n/m | [CRO] = n/m |

BlaC C69L+K234R Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|-----------|---------------------|-------------------------|---------------|
| Krippendorff: | [E] = 5nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 0 - 140 μ M | t = 0 - 20min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 5nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC S130G+K234R kinetics studies

| | | |
|------|--------------|----------------------------|
| BZ: | [E] = 500nM | [BZ] = 450 - 4000 μ M |
| AMP: | [E] = 3000nM | [AMP] = 500 - 4500 μ M |
| CF: | [E] = n/m | [CF] = n/m |
| FOX: | [E] = n/m | [FOX] = n/m |
| CRO: | [E] = n/m | [CRO] = n/m |

BlaC S130G+K234R Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|-------------|---------------------|-------------------------|----------------|
| Krippendorff: | [E] = 500nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 0 - 600 μ M | t = 0 - 300min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 130nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

BlaC R220S+K234R kinetics studies

| | | |
|------|-------------|----------------------------|
| BZ: | [E] = 100nM | [BZ] = 400 - 4000 μ M |
| AMP: | [E] = 650nM | [AMP] = 500 - 4000 μ M |
| CF: | [E] = n/m | [CF] = n/m |
| FOX: | [E] = n/m | [FOX] = n/m |
| CRO: | [E] = n/m | [CRO] = n/m |

BlaC R220S+K234R Inhibition studies

| | | | | |
|----------------------|-------------|---------------------|--------------------------|---------------|
| Krippendorff: | [E] = 100nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 0 - 1000 μ M | t = 0 - 60min |
| Inhibition over 24h: | [E] = 100nM | [BZ] = 1000 μ M | [CLA] = 25 μ M | |

```

SHV-1_K._pneumoniae      -----MRYIRLCIIISLLATLPLAVHASPQPLEQIKLSESQLSGRVGMIE 48
TEM-1_E._coli            ----MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIE 48
BlaC_M._tuberculosis     MAMLVSVTGCAR-HASGARPASTTLPAGADLADRFAELERRYDARLGVYV 49
BlaA_Y._enterocolitica   LRRSLLLAGITLPLVSPALPAWANALP-ASVDKQLAELERNANGRLGVAM 49
                          :       .       .       .   ..   :.   *   .   .:*:*

SHV-1_K._pneumoniae      MDLASGRTLTAWRADERFPMMSYTFKVVLCGAVLARVDAGDEQLERKIHYR 98
TEM-1_E._coli            LDLNSGKILESFRPEERFPMMSYTFKVLVLCGAVLSRVVDAQQEQLGRRIHYS 98
BlaC_M._tuberculosis     PATGTT-AAIEYRADERFAFCSTFKAPLVAAVLHQN--PLTHLDKLITYT 98
BlaA_Y._enterocolitica   INTGNG-TKILYRAAQRFPFCYSTFKFMLAAAVLDQSQSQPNLLNKHINYH 98
                          .       :*.:**.: **** * .*** :       * : * *

SHV-1_K._pneumoniae      QQDLVDYSPVSEKHLADGMTVVELCAAAITMSDNAAANLLLATVGGP--- 145
TEM-1_E._coli            QNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNAAANLLLTIGGP--- 145
BlaC_M._tuberculosis     SDDIRSISFVAQQHVQTGMTIGQLCDAAIRYSDGTAANLLADLGGPGGG 145C
BlaA_Y._enterocolitica   ESDLLSYAPITRKNLAHGMTVSELCAATIQYSDNAAANLLIKELGG--- 144
                          ..*: . :*::: : : ** : ** *.* **.:*****: :**

SHV-1_K._pneumoniae      -AGLTAFLRQIGDNVTRLDRWETELNEALPGDARDTTTPASMAATLRKLL 194
TEM-1_E._coli            -KELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPENEAIPNDERDTTMPAAMATLRKLL 194
BlaC_M._tuberculosis     TAAFTGYLRSLGDTVSRLEDAEPELNRDPPGDERDTTPHAIALVLQQLV 194
BlaA_Y._enterocolitica   LAAVNQFARSIGDQMFRLDRWEPDLNTPARNDPRDTTPAAMAASMNKLV 194
                          .. : :::** : ** *.:** *.* **** * :.* :.:*

SHV-1_K._pneumoniae      TSQRLSARSQRQLLQWVDDRVRVAGPLIRSVLPAGWFIADKTGAGERGARG 245
TEM-1_E._coli            TGELLTLASRQQLIDWMEADKVGPLLRVLPAGWFIADKSGAGERGSRG 245
BlaC_M._tuberculosis     LGNALPPDKRALLTDWMARNTTGAKRIRAGFPADWKVIDKTGTGDYGRAN 245
BlaA_Y._enterocolitica   LGDALRPAQRSQLAVWLKGNNTGDATIRAGAPTDWIVGDKTGSVDYGTN 245
                          .: * .: * *: : .. :*: *.* : **:*:*: * .

SHV-1_K._pneumoniae      IVALLGPNKAERIVVIYLRDTPASMAERNQ--IAGIGAALIEHWQR 292
TEM-1_E._coli            IIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQ--IAEIGASLIKHW-- 290
BlaC_M._tuberculosis     DIAVVWSPTGVPYVAVMSDRAGGGYDAEPREALLAEATCVAGVLA- 293
BlaA_Y._enterocolitica   DIAVLWPTKGAPIVLVYFTQREK--DAKPRRDVLASVTKIILSQIS- 291

```

Figure S1. Sequence alignment between SHV-1 (*K. pneumoniae*), TEM-1 (*E. coli*), BlaC (*M. tuberculosis*) and BlaA (*Y. enterocolitica*) β -lactamases. The catalytic serine nucleophile (S70) is colored yellow and the mutated IRT positions 69, 130, 220, and 234 are colored cyan. Alignment was performed with ClustalW2. Residues are numbered according to the standardized class A β -lactamases numbering system proposed by Ambler *et al.*

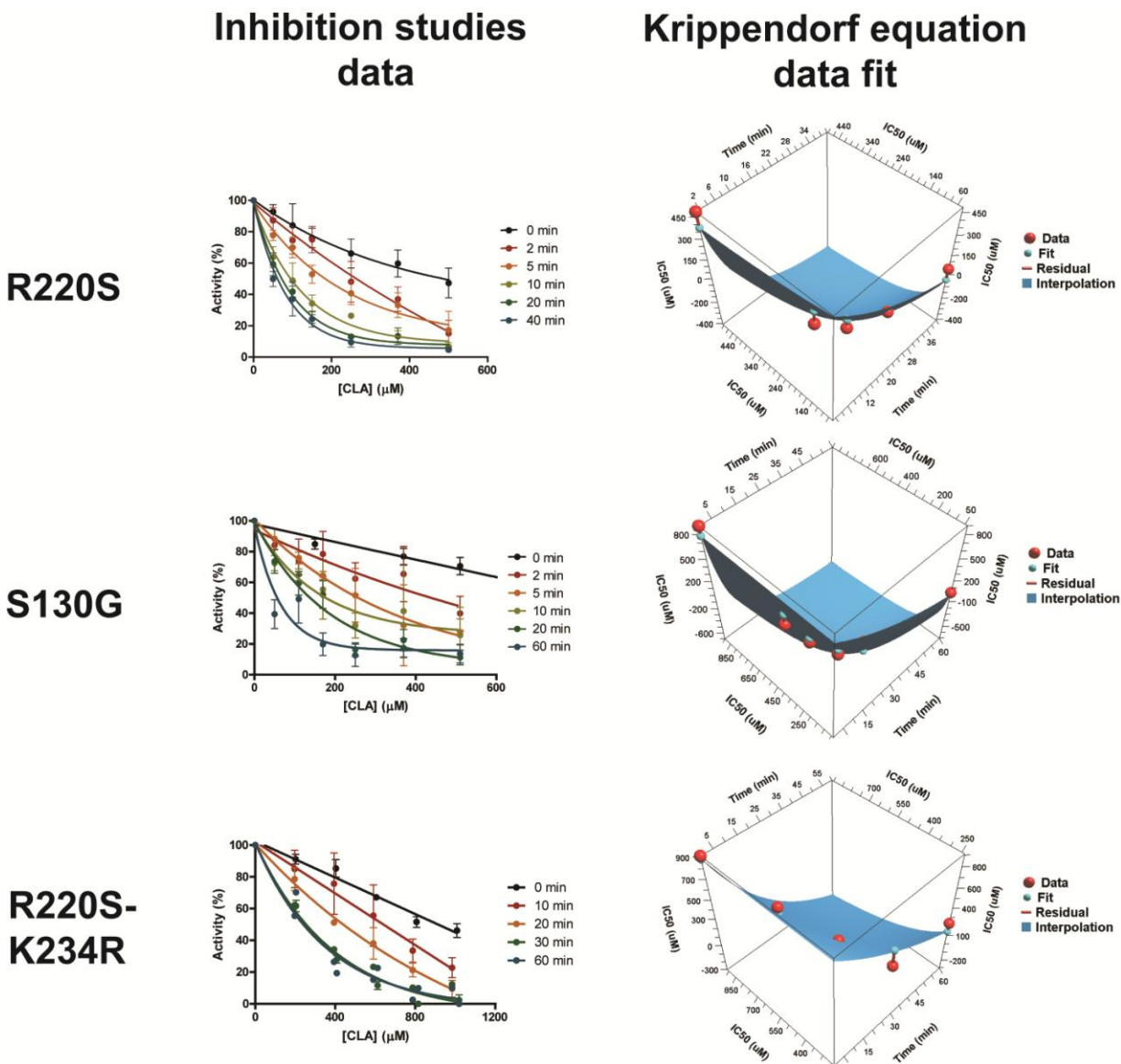


Figure S2. Examples of inhibition data and fits to the Krippendorff equation. The left column shows the decreasing activity of the enzymes when exposed to an increasing concentration of CLA. The data also show the inactivation effect of CLA when the enzymes are incubated with the inhibitor for an increasing amount of time. The concentrations of CLA when the enzyme reaches 50% activity (IC_{50}) are then plotted against time in the 3D fit of the Krippendorff equation, allowing the calculation of K_i and k_{inac} by extrapolation.

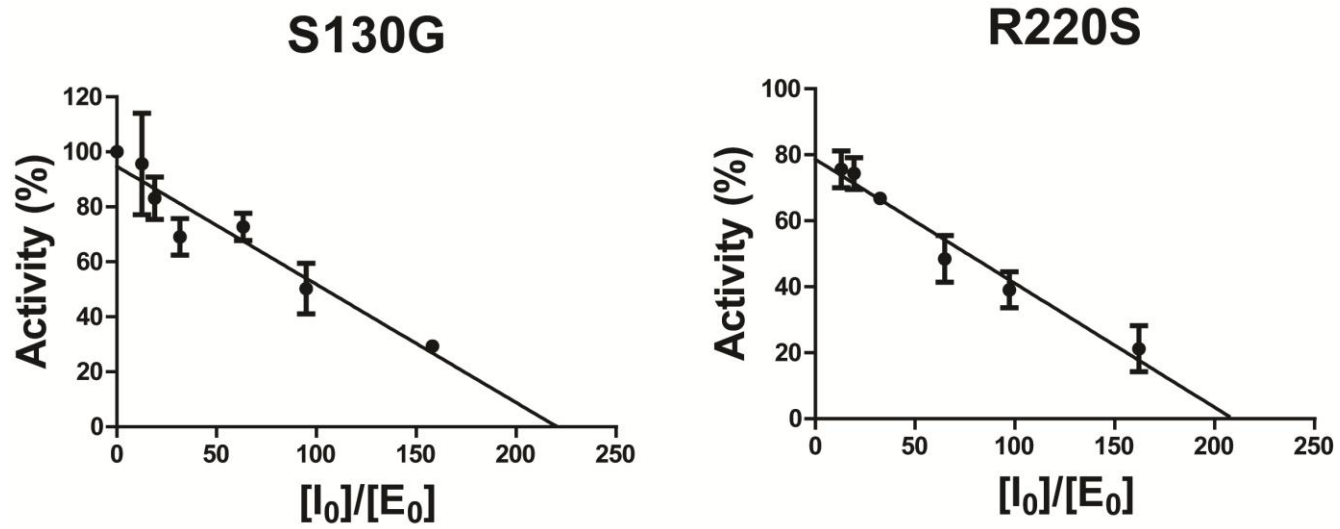


Figure S3. Examples of linear plots from the titration data. The value of $[I_0]/[E_0]$ at the X-axis intercept is equal to the partition ratio k_{cat}/k_{inac} of the enzyme *versus* CLA, the inhibitor studied in the present work.

ANNEXE 2. SÉQUENCE DU GÈNE *blaC* OPTIMISÉ POUR *E. COLI*

blaC (sans peptide signal) avec étiquette histidine (his-tag).

```

                                HIS-TAG
ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG
                                Ndel
CGC GGC AGC CAT ATG GAC CTG GCA GAT CGC TTC GCA GAA CTG GAA CGC
CGT TAC GAC GCA CGC CTG GGT GTC TAT GTT CCG GCA ACG GGC ACG ACC
GCA GCA ATT GAA TAT CGT GCA GAT GAA CGC TTT GCT TTC TGC AGC ACG
TTT AAA GCA CCG CTG GTT GCG GCA GTC CTG CAT CAG AAC CCG CTG ACC
CAC CTG GAT AAA CTG ATC ACG TAC ACC TCT GAT GAC ATT CGT AGC ATC
TCT CCG GTG GCG CAG CAA CAT GTT CAG ACG GGC ATG ACC ATT GGT CAA
CTG TGT GAT GCA GCT ATC CGC TAT TCC GAC GGT ACG GCA GCA AAC CTG
CTG CTG GCA GAT CTG GGC GGT CCG GGC GGT GGC ACG GCA GCT TTT ACC
GGT TAC CTG CGT AGT CTG GGT GAT ACC GTG TCC CGT CTG GAC GCA GAA
GAA CCG GAA CTG AAT CGT GAT CCG CCG GGT GAT GAA CGT GAC ACC ACG
ACC CCG CAC GCA ATT GCA CTG GTC CTG CAG CAA CTG GTG CTG GGT AAC
GCG CTG CCG CCG GAT AAA CGT GCA CTG CTG ACC GAC TGG ATG GCA CGT
AAT ACG ACC GGC GCC AAA CGT ATT CGC GCA GGT TTC CCG GCT GAT TGG
AAA GTT ATC GAC AAA ACG GGC ACC GGT GAT TAT GGC CGT GCG AAT GAC
ATC GCC GTG GTT TGG TCA CCG ACC GGT GTT CCG TAT GTC GTG GCA GTC
ATG TCG GAT CGT GCG GGT GGC GGC TAC GAC GCA GAA CCG CGT GAA GCT
CTG CTG GCT GAA GCG GCG ACC TGC GTT GCT GGT GTG CTG GCA TAA
```