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

Prédiction expérimentale de mutants résistants aux inhibiteurs chez la β-lactamase BlaC de *Mycobacterium tuberculosis*

Par

Hélène Carlettini

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Examinateur externe

Jonathan Perreault INRS-Institut Armand-Frappier

Patrick Lagüe Département de biochimie, microbiologie et de bio-informatique Université Laval

Directeur de recherche

Nicolas Doucet INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés Hélène Carlettini, 2014

RÉSUMÉ

La β-lactamase BlaC est l'enzyme responsable de la résistance intrinsèque de Mycobacterium tuberculosis (TB) aux traitements antibiotiques à noyau β-lactame. Un espoir de traitement de l'infection est survenu avec la combinaison ampicillineclavulanate (combinaison β-lactame-inhibiteur de β-lactamase), active contre les deux types de souches répertoriées de TB selon leur réponse aux traitements antibiotiques utilisés habituellement contre TB: multi-résistantes (MDR) et fortement-résistantes (XDR). D'après les données de la littérature et l'évolution moléculaire observée chez les autres β-lactamases de classe A, nous avons ciblé plusieurs résidus à muter afin de prédire l'apparition de résistance à cette combinaison, et plus spécifiquement au clavulanate chez TB (profil de résistance aux inhibiteurs, IR). Nos résultats montrent que BlaC aura fortement intérêt à acquérir des mutations évolutives, afin de conserver son activité protectrice pour son hôte, entrainant ainsi un échec clinique une fois cette combinaison introduite en milieu médical. Les mutations les plus avantageuses se trouvent à être S130G, R220S et K234R, toutes trois étant très présentes dans le chemin évolutif des homologues de BlaC de classe A. En complément à ces travaux, un autre profil évolutif, spécifiquement dirigé contre les β-lactames a été étudié et a aussi prononcé que pour le profil IR à muter en ce sens. Par conséquent, nos résultats sont les premiers à démontrer que le comportement évolutif envers le clavulanate de BlaC risque d'être similaire à celui de ses homologues dès que la combinaison ßlactame/inhibiteur sera utilisée en clinique.

Mots clés : *Mycobacterium tuberculosis*, β-lactamase, résistance aux antibiotiques, catalyse enzymatique, mutagenèse, évolution dirigée, analyse structure-fonction, structure des protéines, cinétique enzymatique

TABLE DES MATIÈRES

RÉS	SUMÉ	ii					
TA	BLE DES MATIÈRES	iii					
LIS	TE DES TABLEAUX	v					
LIS	TE DES FIGURES	vi					
LIS	TE DES ABRÉVIATIONS	111					
RE	MERCIEMENTS	x					
СН	APITRE 1 INTRODUCTION	2					
1.1	Problématique	2					
1.2	Revue de la littérature	6					
1 2	1 Mode d'action des antibiotiques à noveu & lastame	6					
1.2.	 Los mécanismos de résistance aux antibiotiques à noveu 6 losteme. 	.0 7					
1.2.	2 Les necanismes de resistance aux antibioliques à noyau p-lactame	./ g					
1.2.	4 les B-lactames inhibiteurs de B-lactamases	ە. ي					
1.2.	5 β-lactamases de classe A : étude de BlaC	.0 10					
	Structure	10					
	Catalyse	15					
	Une β-lactamase à large spectre de reconnaissance	18					
	Mutations conférant une résistance aux inhibiteurs chez les β-lactamases et choix des résidus à						
	muter pour l'étude	18					
1.3	Objectifs et présentation de la recherche 2	2					
СН	APITRE 2 COMBINATORIAL ACTIVE-SITE VARIANTS CONFER SUSTAINED CLAVULANATE						
RES	SISTANCE IN BLAC β -LACTAMASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS 2	:4					
2.1	Préface au chapitre 2 24						
2.2	2 Résumé 26						
2.3	2.3 Article						
СНА	APITRE 3 ÉTUDE DE LA POSSIBLE EXPANSION DU SPECTRE D'HYDROLYSE DE BIaC 5	6					
3.1	.1 Mise en contexte						

3.2	Facteurs expliquant le caractère ESBL natif de BlaC	56					
3.3	Mutations sélectionnées pour l'amélioration du profil ESBL de BlaC	58					
3.4	Résultats	i0					
3.4.1	I Cinétique enzymatique	50					
3.4.2	2 Dichroïsme circulaire	53					
3.5	Conclusion	3 5					
CHA	APITRE 4 SURVIE CELLULAIRE - RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	38					
СНА	APITRE 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	2					
RÉF	RÉFÉRENCES						
	IEXE I CONSERVATION DES ACIDES AMINÉS AU COURS DE L'ÉVOLUTION ENTRE BLAC ET	-					
SES	SES HOMOLOGUES						
	IEXE II BRÈVE INTRODUCTION SUR LES MÉTHODES EXPÉRIMENTALES 8	16					
II.a (Cinétique enzymatique	36					
ll.b H	II.b Hydrolyse des β-lactames						
II.c I	II.c Inhibition irréversible						
ll.d E	I.d Étude de stabilité par dichroïsme circulaire92						

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Table 2.1 : Thermal denaturation of WT and mutant BIaC β -lactamase variants monitored by	CD
spectroscopy	.48
Table 2.2 : β-lactam hydrolysis by WT BlaC and several single/double variants	49
Table 2.3 : Inhibition of WT BlaC and single/double variants by clavulanate	.50

CHAPITRE 3

Tableau 3.1 : Paramètres cinétiques des mutants ES	BL de BlaC contre BZ	, CF et FOX	62
Tableau 3.2 : Paramètres de la dénaturation thermique	e des mutants ESBL	de BlaC	64

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1 : Structures chimiques des classes de β-lactames d'intérêt4
Figure 1.2 : Comparaison structurale entre le noyau β-lactame de la benzylpénicilline et un motif
D-Ala-D-Ala6
Figure 1.3 : Stratégie d'action de la combinaison ampicilline-clavulanate9
Figure 1.4 : Alignement des séquences protéiques des β-lactamases de classe A BlaC, TEM-1 et
SHV-111
Figure 1.5 : Structure cristalline de la β-lactamase BlaC et de son site actif12
Figure 1.6 : Superposition structurale de BlaC et TEM-1 et présentation des motifs conservés au
sein de la famille des β-lactamases de classe A13
Figure 1.7 : Mécanisme catalytique détaillé de BlaC16
Figure 1.8 : Mécanisme proposé de l'inhibition de BlaC par le clavulanate17
Figure 1.9 : Fréquence de mutations observées en clinique conférant une résistance aux
inhibiteurs chez TEM-119
Figure 1.10 : Positions IR à l'intérieur et à proximité du site catalytique de la β-lactamase BlaC
ciblées dans la présente étude19

CHAPITRE 2

Figure 2.1 : Structures of β-lactam antibiotics used in this study	51
Figure 2.2 : Structural overlay of BlaC, TEM-1 and SHV-1 β -lactamases	52
Figure 2.3 : Circular dichroism spectra of WT BlaC and IRT variants	53

Figure 2.4 : Time-dependent enzyme inactivation of BlaC and IRT variants by clavulanate......54

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Fréquence de mutations observées en clinique conférant une résistance de type ESBL
envers les β-lactames chez TEM-158
Figure 3.2 : Positions cibles de l'étude, à l'intérieur et à proximité du site catalytique de la β -
lactamase BlaC
Figure 3.3 : Dichroïsme circulaire des mutants ESBL de BlaC63

CHAPITRE 4

ANNEXES

Figure	1.1	:	Conservation	des	acides	aminés	au	sein	des	β-lactamases	homologues	à
BlaC												85
Figure	II.2 :	Co	ourbe de Micha	aelis-N	lenten			•••••				87
Figure	II.3 :	In	hibition enzym	atique								89
Figure	II.4 :	: F	Principe de l'ét	ude de	l'inhibi	tion irrév	ersib	ole de	BlaC	par le clavulan	ate	91
Figure	11.5 :	Pr	incipe du dich	roïsmo	e circula	ire						93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMP	Ampicilline
AMX	Amoxicilline
AZ	Aztréoname
BZ	Benzylpénicilline
CF	Céphalothine
CLA	Clavulanate
CMI	Concentration minimal inhibitrice
CMT	Complex Mutant TEM
СР	Céfépime
CRO	Céftriaxone
D-Ala-D-Ala	D-alanyl-D-alanine
E. coli	Escherichia coli
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FOX	Céfoxitine
IRT	Inhibitor-resistant
MDR	Multi-drug resistant
MP	Méropénème

OMP	Outer membrane protein
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBP	Penicillin binding protein
SDN	Référence à la boucle conservée au sein des sites actifs des β-lactamase : Sérine (S) Asparate (D) et Asparagine (N)
SHV	β-lactamase SHV (classe A)
ТВ	Mycobacterium tuberculosis
TDR	Totally drug resistant
TEM-1	β-lactamase TEM-1 (classe A)
XDR	Extensively drug resistant
XXDR	Extra extensively drug resistant

REMERCIEMENTS

Tout étudiant à l'INRS-Institut Armand-Frappier se doit de remercier l'institution pour le cadre d'étude offert à ses étudiants : de l'espace, un lieu dédié à la recherche, un soutien financier et des professeurs qui redeviennent ce qu'ils doivent être, des chercheurs qui enseignent la recherche. Merci à Mme Anne Philippon, qui sait tout, nous connait tous, et à M. Charles Dozois dont le *bonjour* dans le couloir et sa disponibilité pour rencontrer des étudiants. Enfin, merci aux organismes subventionnaires pour leur support à nos recherches.

Merci à Nicolas pour être un exemple sur beaucoup de choses. Au-delà de nous avoir tous appris à jouer avec les scripts PyMOL, c'est un professeur que beaucoup d'étudiants auraient aimé rencontrer, par sa justesse, autant dans les bons que les mauvais moments et dont les qualités de chercheur sont évidentes (et complexent tous ses étudiants). Les responsabilités qu'il laisse à ses étudiants principalement pour la gestion du laboratoire et sa porte (toujours ouverte) ont été très appréciés. Même si deux ans de maîtrise canadienne, c'est beaucoup de science, j'ai plus appris sur moimême qu'en cinq ans de vie étudiante dans ma vieille Europe. J'espère avoir apporté un peu de cela au laboratoire.

Merci à « mon lab », pour être une équipe où même si parfois ce n'est pas facile, nos repas en commun et surprises (*mon roboooot*) ont toujours été agréables et importants pour notre cohésion. Merci à Philippe d'avoir croisé ma route, tu es un ami plus que précieux. Merci à Donald. Tu es le petit lutin du labo dont le travail de fond n'est pas parfois (re)connu, mais en dehors de ton *workalcoholism*, tu trouves toujours du temps pour résoudre les problèmes, remettre droites des spatules et nous montrer des films d'exception sur YouTube. Ton expérience de vie et ton professionnalisme sont aussi appréciés. J'espère ne pas t'avoir trop traumatisé des Français embêté et avoir assez nettoyé derrière moi ;-). Félicitations pour toutes tes bourses, tu le mérites. Merci à

X

Roger Dubuc, pour avoir aidé à mettre en place ce laboratoire. Merci à Laurie-Anne et Nhung, pour avoir apporté un peu d'œstrogènes dans le lab, vous avez été d'agréables compagnes de route. Merci à Guillaume, grâce à toi, je ne vois (ou sens) plus l'arôme de banane comme avant. Merci à Benjamin pour ses remarques pertinentes lors des corrections et autres répétitions de présentations (et pour les spéculoos que tu m'avais ramenés !). Merci à Bruno, pour avoir été un stagiaire agréable et courageux de travailler avec Donald ;-), tu as de l'avenir dans la recherche, même en mode *contaminator* avec tes expériences au BET, bonne chance.

Plus généralement, merci à ces gens de l'Institut qui m'ont rendu la vie facile : les gars du service informatique que j'ai embêté souvent pour mes affaires personnelles et estudiantines, l'AGEIAF (Ronan, Mathieu, les Carolinas...), le comité SST qui, avec ses réunions, a « enrichi » ma vision des choses ; un merci particulier à ma *dream team* du CAF2013, ce travail de titan a été une réussite, tout comme notre équipe. Je suis très fière de ce que nous avons accompli et cette expérience unique qui, je pensais, me servirait dans le futur, m'a permis de me réaliser selon ma personnalité et m'a permis de décrocher un travail à la sortie. Un merci particulier à Karine Trudeau pour être une amie depuis mon atterrissage à Dorval l'Institut et à Dominique J. Favreau pour être devenu mon ami et celui de mon compagnon de vie.

Merci enfin à ma famille. J'ai compris que le meilleur investissement dans la vie était l'éducation de nos enfants. Je remercie aussi ma belle-famille québécoise pour m'avoir considérée comme l'un des leurs très rapidement (même si je ressens encore parfois mon côté exotique en leur présence ;-)).

Et la cerise sur le gâteau sundae, Benjamin, que je remercie de m'avoir soutenue, supportée (dans les deux sens du terme) dans les moments difficiles et avoir surtout accepté de m'épouser. J'ai hâte au futur avec toi, le vrai travail commence =) !

xi

xii

Prédiction expérimentale de mutants résistants aux inhibiteurs chez la β-lactamase BlaC de *Mycobacterium tuberculosis*

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Problématique

La tuberculose est une maladie d'origine bactérienne atteignant le corps humain au niveau du squelette (colonne vertébrale, genou), du système respiratoire ou du système endocrinien (1,2). Cette maladie est causée par un agent pathogène appelé *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, TB), dont environ 10% des infections mènent à une forme active de la maladie (1,3). D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (4), un tiers de la population mondiale est infectée par TB et deux millions de personnes meurent de la tuberculose chaque année.

La principale stratégie de soins contre les maladies infectieuses est l'utilisation d'antibiotiques, dont le premier rapporté dans la littérature est la pénicilline, découverte par Alexander Fleming en 1928 pour son action contre des staphylocogues (5). Parmi les antibiotiques connus, ceux à noyau β-lactame (dont la pénicilline) n'ont jamais été utilisés dans le traitement de TB, car ils sont trop rapidement hydrolysés par la β-lactamase BlaC de TB (6). BlaC est en effet l'enzyme responsable de la résistance intrinsèque de TB aux β -lactames. Récemment, une grande avancée dans le traitement de la tuberculose a été réalisée avec une combinaison expérimentale β -lactame-inhibiteur de β -lactamase dirigée contre BlaC (7) (combinaison méropénème-clavulanate, puis ampicilline-clavulanate (8,9)). L'enjeu de cette découverte est que les β-lactames (auparavant inutilisés contre TB) (10) se trouvent à être efficaces contre les souches résistantes de TB (7) en présence d'autres β -lactames agissant à titre d'inhibiteurs de β-lactamases et ce, de manière prolongée. L'enzyme est alors liée à l'inhibiteur, laissant le βlactame agir contre la bactérie. Une combinaison β-lactame-inhibiteur (ampicilline-clavulanate) de β-lactamase réussit là où l'ampicilline et le clavulanate seuls ont échoué. Ces médicaments, tous les deux approuvés par la FDA, sont la bases de nouveaux espoirs de traitements dont plusieurs combinaisons sont actuellement testées en clinique (11-13). La découverte de cette combinaison efficace contre les souches XDR de TB est la première grande avancée dans la lutte contre la tuberculose depuis l'apparition du vaccin antituberculeux BCG en 1924 (14). Actuellement, l'efficacité d'une combinaison « carbapénème-inhibiteur » a été démontrée chez plusieurs systèmes in vivo et quelques patients en essais cliniques (12,15,16). La première

génération de β -lactames, apparue dans la première moitié du XX^{ème} siècle, fut utilisée abusivement et de façon non contrôlée. Ceci eut pour conséquence de créer une pression sélective sur les bactéries pathogènes, qui ont alors développé des résistances (17). Effectivement, après l'introduction en clinique de la pénicilline, la proportion d'isolats hospitaliers reconnus comme résistants n'a fait que croître. S'en est suivi alors l'arrivée d'une seconde famille d'antibiotiques β -lactames appelés céphalosporines (qui comptent quatre générations) et de nouvelles pénicillines, cette fois-ci plus efficaces et dont les structures sont représentées en Figure 1.1. Ces générations successives de β -lactames (créées par une variabilité des chaînes ramifiées aux noyaux β -lactames) sont la réponse de la communauté scientifique à la multiplication de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, où le dernier antibiotique à mécanisme d'action innovant contre TB fut la rifampicine en 1963 (18).

Dans le cas de la tuberculose, les classes chimiques actuellement utilisées en traitements antibiotiques sont différentes : analogues de facteurs de croissance (isoniazide) ou rifamycines (rifampicine). Parmi les isolats bactériens cliniques de TB, deux types de résistances sont répertoriés selon la réponse des souches TB aux traitements : les souches multi-résistantes (MDR) et fortement-résistantes (XDR). Lorsque la maladie se trouve détectée chez un patient et que les premiers traitements (dits de « première ligne ») échouent, on lui administre alors des médicaments de seconde et troisième lignes (kanamycine, cyclosérine), car la souche portée par le patient est résistante. Les médicaments de dernière intention sont souvent administrés par voie intraveineuse, sont moins efficaces et/ou causent généralement des effets secondaires marqués. Malheureusement, de nombreuses souches MDR et XDR de TB ont été isolées partout dans le monde, rendant l'éradication de la tuberculose très complexe. De plus, depuis 2009 (19), des souches qualifiées de totalement résistantes aux traitements (TDR) ont elles aussi fait leur apparition, rendant la probabilité de guérison quasiment nulle. Ces souches ont été renommées comme extrêmement résistantes aux antibiotiques (XXDR) par l'OMS afin de renforcer la lutte et les tests de dépistages (20) contre ces souches. Le nombre réduit de nouveaux antibiotiques mis sur le marché obtenus par simples ramifications chimiques n'est en effet que le reflet de la croissance des résistances bactériennes. Les traitements classiques échouant de plus en plus, il devient alors urgent de réorienter la recherche sur TB. Les nouvelles combinaisons β-lactame-clavulanate s'avèrent alors être une piste incontournable pour traiter ces cas de résistances préoccupants (9,13).



Figure 1.1 : Structures chimiques des classes de β-lactames d'intérêt

La première génération de β -lactames (pénicillines) contient des dérivés de la pénicilline G (ou benzylpénicilline, BZ), dont la structure se complexifie avec l'arrivée des céphalosporines (CF, première génération; FOX, deuxième génération; CRO, troisième génération; CP, quatrième génération). Les carbapénèmes sont une famille de β lactames peu hydrolysés par les β -lactamases de classe A, comme les monobactames. Les inhibiteurs sont des β lactames inhibant l'activité catalytique des β -lactamases en formant des intermédiaires covalents stables au site actif. Le noyau β -lactame est en rouge, les structures communes aux pénicillines en bleu, les structures communes aux céphalosporines en vert, les structures communes aux carbapénèmes en violet et la structure commune aux inhibiteurs de β -lactamases en orange. Structures générées avec ChemDraw (Cambridge Software). Malheureusement, des résistances aux β -lactames sont apparues chez les protéines parentes à BlaC lors de l'introduction de ces antibiotiques en milieu clinique. Ces résistances sont causées par des mutations des gènes codant pour les β -lactamases en question. Le présent projet avait pour objectif de mieux comprendre comment la β -lactamase BlaC pourrait conférer une résistance (prévisible) aux β -lactames couplés aux inhibiteurs de β -lactamases lors du traitement clinique contre TB (12).

En se basant sur le principe d'évolution moléculaire, nous avons cherché à identifier les futures mutations que BlaC pourrait développer pour permettre à TB de résister aux traitements antibiotiques, et plus spécifiquement à une nouvelle combinaison (ampicilline-clavulanate).

Cette résistance ayant été étudiée de nombreuses fois chez TEM-1 par des études fonctionnelles et structurales (21,22), la caractérisation de l'évolution moléculaire de BlaC avant la découverte de mutants en milieu clinique permet d'aider à la conception d'inhibiteurs spécifiques. Ceci permettra de contrer les éventuelles mutations que BlaC sera le plus susceptible d'acquérir dès lors que la combinaison β-lactame/inhibiteur sera approuvée pour une utilisation en clinique. Il est nécessaire, pour combattre les souches MDR/XDR de TB et ainsi éradiquer la tuberculose, de comprendre tous les facteurs impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques par l'étude évolutive de cette enzyme et de devancer son comportement futur.

1.2 Revue de la littérature

1.2.1 Mode d'action des antibiotiques à noyau β-lactame

Les antibiotiques à noyau β -lactame (communément appelés β -lactames) sont l'une des classes d'antibiotiques les plus utilisées dans le monde (23) en raison d'un mécanisme d'action presque universel et d'une efficacité redoutable. Le pouvoir antibiotique des β -lactames repose sur leur structure chimique particulière, contenant un noyau β -lactame ressemblant très fortement à un motif di-peptidique D-Ala-D-Ala, substrat de leurs protéines cibles, les *penicillin-binding proteins* comme montré en Figure1.2 :



Figure 1.2 : Comparaison structurale entre le noyaux β-lactame de la benzylpénicilline et un motif D-Ala-D-ala.

Les éléments structuraux communs aux deux structures sont en rouges. Ces PBPs sont des D-Ala-D-Alatranspeptidases impliquées dans la dernière étape de la synthèse de la paroi de peptidoglycane (Figure 1.3). Leurs substrats sont les terminaisons D-Ala-D-Ala des chaînes N-acétylglucosamine. Or, les β-lactames ayant une structure proche de ces terminaisons, les PBPs se trouvent trompées et reconnaissent ces derniers comme étant leurs substrats. Les enzymes, se trouvant sous forme acylées avec ces pseudo-substrats, sont ensuite dans l'incapacité de poursuivre la synthèse de la paroi bactérienne, mettant ainsi fin à la multiplication de la cellule bactérienne et donc de l'infection (24). Structures générées avec ChemDraw (Cambridge Software).

1.2.2 Les mécanismes de résistance aux antibiotiques à noyau β-lactame

L'usage abusif et trop répandu d'antibiotiques à noyau β-lactame (ainsi que les autres antibiotiques en général) ayant exercé une pression sélective sur les bactéries, celles-ci ont développé quatre stratégies leur permettant de s'adapter afin d'y résister :

- Les pompes à efflux, qui sont un système permettant à la bactérie de rejeter l'antibiotique du périplasme vers l'environnement extérieur. Elles sont très répandues chez les bactéries Gram négatives et surexprimées par les bactéries (25).
- L'imperméabilité membranaire, où une faible expression des protéines de la membrane externe (OMPs) empêche les β-lactames d'atteindre les PBPs. Il peut aussi y avoir une mutation (ou insertion) dans ces OMPs, créant des protéines à faible activité et conférant une plus faible perméabilité aux β-lactames, ce qui est aussi souvent associé à l'expression d'une β-lactamase (22).
- Une mutation chez les cibles des β-lactames (26), les PBPs. Ces mutations peuvent parfois altérer la protéine au point qu'elle soit renommée *low* ou *high molecular-weight* PBP comme chez *Streptococcus pneumoniae*, où une résistance à la pénicilline et au céfotaxime (CTX, céphalosporine de 3^{ème} génération) est observée en clinique (27). Leur mutation est donc un moyen de tromper le β-lactame et de contourner son mécanisme d'action (le β-lactame étant spécifique d'un site de fixation).
- Organisation de la population bactérienne en structure de type biofilms. Dans ce type de structure, les bactéries forment une sorte de matrice constituée de protéines, d'exo polysaccharides et d'ADN. Ceci réorganise la vie microbienne, où selon la profondeur du biofilms et la position des bactéries, celles-ci se trouvent être plus tolérantes aux antibiotiques. Cliniquement, ceci peut mener à certaines infections chroniques (28).
- Développement d'enzymes hydrolysant les β-lactames. Stratégie la plus dangereuse et la plus répandue, car les bactéries sont en mesure de transférer cette résistance à leurs voisines par l'intermédiaire de plasmides ou transposons (29). Ces enzymes sont appelées β-lactamases.

7

1.2.3 Les β-lactamases

Les β-lactamases (EC 3.5.2.6) sont des enzymes catalysant l'hydrolyse du noyau β-lactame de cette classe d'antibiotiques utilisés pour traiter diverses maladies infectieuses. La première βlactamase fut caractérisée en 1940 chez Escherichia coli (E. coli) par sa capacité à inactiver la pénicilline (d'où l'appellation pénicillinase) (30) avant même l'usage de l'antibiotique en clinique. Les β-lactamases sont réparties dans diverses catégories selon leur similarité de séquence et catalytique. Les sérines β-lactamases sont classées selon la classification d'Ambler (31) dans des classes A, C et D, alors que les métallo-β-lactamases constituent la famille B. Les βlactamases de classe A (pénicillinases) sont les plus répandues en milieu clinique (32) et sont très actives contre les pénicillines. Plusieurs centaines de β-lactamases ont été décrites à ce jour, dont plus de deux cents variantes pour une même β-lactamase (TEM-1 (33,34)). Leur efficacité est telle que beaucoup sont dénommées « β-lactamases à large spectre » (extendedspectrum beta-lactamases, ESBLs), car elles se sont révélées capables d'hydrolyser aussi les plus récents antibiotiques synthétisés dans les années 1980 (céphalosporines de troisième génération (34)). À noter que la génération 4 est introduite et testée depuis peu chez plusieurs souches et contre les résistances (35-37). De plus, chez les homologues de BlaC, TEM-1 et SHV-1, des enzymes résistantes aux inhibiteurs (IR) sont apparues (38-41). Effectivement, depuis quelques années, des inhibiteurs de β-lactamases sont utilisés en combinaison avec des antibiotiques β-lactames (42). Cependant, on a vu apparaitre ces mutations IR en combinaison avec des mutations conférant un profil ESBL. Cette dernière génération de β-lactamases, très efficaces, est appelée « mutants complexes de TEM-1 » (CMT) (43).

1.2.4 Les β-lactames inhibiteurs de β-lactamases

Parmi les stratégies envisagées pour contrer ce moyen de résistance, l'utilisation d'inhibiteurs de β -lactamases est l'une des plus utilisées aujourd'hui. Toutefois, l'inhibiteur employé seul ne permet que l'inhibition de la β -lactamase et non la mort des bactéries cibles. Comme énoncé précédemment, combiner un inhibiteur de β -lactamase à un antibiotique β -lactame classique permet une stratégie en deux temps, où le β -lactame peut se fixer librement aux PBPs sans être affecté par la présence de β -lactamases actives (Figure1.3), ayant elles-mêmes leur site actif occupé par l'inhibiteur (22). L'efficacité est alors meilleure qu'une simple combinaison de β -lactames. L'inhibiteur de β -lactamase le plus connu est l'acide clavulanique (44) (clavulanate sous forme de sel), découvert *chez Streptococcus clavuligerus* en 1972. Cet inhibiteur est utilisé

depuis plusieurs années avec succès en combinaison avec l'amoxicilline. L'acide clavulanique inhibe la β -lactamase cible en formant un intermédiaire acyle-enzyme permettant soit une action réversible (l'enzyme retrouve son activité au bout d'un certain temps) ou irréversible (l'enzyme est incapable de recouvrer son activité à long terme). C'est cette dernière action qui est privilégiée dans le cas de BlaC. Ainsi, la sérine nucléophile se trouvant liée à l'inhibiteur est incapable d'attaquer le noyau β -lactame de l'autre β -lactame présent dans la combinaison (22). La souche bactérienne est alors de nouveau sensibilisée aux β -lactames.



Figure 1.3 : Stratégie d'action de la combinaison ampicilline-clavulanate.

En absence de β-lactames, les PBPs participent à la création de la couche de peptidoglycane de la membrane bactérienne, en phase finale, lors de la polymérisation des chaines sucrées. En présence de β-lactames, les PBPs sont trompées et les considèrent comme leur substrat. La polymérisation de la chaîne de peptidoglycane s'arrête et les bactéries meurent. Cette stratégie, mise à mal par la présence d'une β-lactamase, se retrouve à nouveau efficace en présence d'un inhibiteur de β-lactamase empêchant la dégradation prématurée de l'antibiotique. Structures chimiques générées par ChemDraw (Cambridge software) et structures protéiques générées par PyMOL (Schrödinger, USA).

1.2.5 β-lactamases de classe A : étude de BlaC

Structure

La résistance principale de TB aux antibiotiques à noyau β-lactame est attribuable à la βlactamase BlaC, présente dans le chromosome de l'organisme bactérien et caractérisée comme ESBL (45). Une souche délétère du gène blaC est clairement sensible aux pénicillines et aux derniers antibiotiques synthétisés (6), attestant l'origine de cette résistance. La caractérisation de BlaC a commencé il y a plus de 15 ans par Chambers et al. (46), des auteurs qui se sont entre autres penchés sur le profil IC50 (quantité d'antibiotique nécessaire pour inhiber 50% primaire de 307 acides aminés, incluant un peptide signal qui lui permet de se positionner dans le périplasme de l'organisme par ancrage sur lipides (47). De plus, l'enzyme possèderait un site de clivage de la peptidase II en position 28 afin d'éliminer ce site d'ancrage dans la protéine mature (47). La masse moléculaire de l'enzyme est de 31 kDa pour la forme tronquée en position N-terminale (acides aminés 41-307) supplémentée d'une étiquette histidine; c'est cette dernière qui a été utilisée dans le présent projet (47). Son point isoélectrique théorique se situe à un pH de 5 (48), proche de celui répertorié pour TEM-1, qui est de 5.4 (49,50). Enfin, BlaC fait partie de la classe A des β-lactamases, mais celle-ci possède seulement 40% d'identité de séquence avec les autres β -lactamases de classe A (47), tel que montré dans la Figure 1.4.

BlaC	GADLADRFAELERRYDARLGVYV	P - - AT GT TAALE	Y R A DE R F <mark>A F C</mark> S	T F <mark>K A P L V A</mark> A
TEM-1	HPETLVKVKDAEDQLGARVGYLEL	- DL NS GKL - L E S	F R <mark>P E</mark> E R F P M S	T F K V L L C G A
SHV-1	SPQPLEQIKLSESQLSGRVGMEL	VDL AS G <mark>RT</mark> - L T A	AWR A DE R F P M S	T F K V <mark>V</mark> L C G A
		104	*	130
BlaC	V L HQNP L T HL DK L I TYT S DDI F	RSTSPVAQQHVC	QT GNT I GQL CDAA	AL <mark>RY</mark> SDGTA
TEM-1	V L S R V DA GQE QL GRRI HY S QNDL V	/EYSPVTEKHLT	DGNT VRE L CSAA	ALTNSDNTA
SHV-1	V L AR V DA GDE QL E R KI HY R QQDL V	/DYSPVSEKHLA	DGNT VGE L C <mark>A</mark> A	ALTNSDN <mark>S</mark> A
		*	166	×
BlaC	ANLLLA <mark>DL</mark> GGP <mark>GGGTAAFTGYLR</mark>	SLGDTV <mark>S</mark> RLDAE	EPELNRDPPGDI	E R DT T T P <mark>H</mark> A
TEM-1	ANLLL <mark>T</mark> TLGGP <mark>KELTAFLHI</mark>	NMGDHVTRLDRV	AEPELNEALPNDI	E R DT T <mark>M</mark> P A A
SHV-1	ANLLLAT <mark>V</mark> GGP <mark>A</mark> GLTAFLR	QIGD <mark>N</mark> VTRLDRV	AETELNEALPGD	A R DT T T P A <mark>S</mark>
		22	20	234 238/240
BlaC	I AL VL QQL VL GNAL P P DKRAL LTI	DWM <mark>AR NT T GAK F</mark>	\IRAGEPADWKVI	DKTGTGDY
TEM-1	MATTL R K L L T GE L L T L AS R QQL I I	DWM <mark>E ADK</mark> V AGP L	LIRSALPAGWFI	ADKSGAGER
SHV-1	MA <mark>AT L R K L L T S QR L S AR S QR QL L G</mark>	DWM <mark>V DDR</mark> V AGP L	LIRS <mark>V</mark> LPAGWFI	ADKTGAGER
	244	7	F °	* **
BlaC	GRANDI AVVWSPT GVPYVVAVMSI	DRAGGGY DAE P F	}EALLAEAATCV/	AGVLA
TEM-1	GSRGIIA-ALGPDGKPSRIVVIYT	T GS QAT MDE R N	NRQIAEIGASLII	KHW
SHV-1	GARGIVA-LLGPNNKAERIVVIYL	R DT P AS MAE R N	NQQIAGIGAALII	EHWQR

70

Figure 1.4 : Alignement des séquences protéiques des β-lactamases de classe A BlaC, TEM-1 et SHV-1.

Chaque séquence est alignée selon la séquence de BlaC. La numérotation des résidus importants est faite selon la numérotation d'Ambler (31). Les résidus parfaitement conservés sont surlignés en noir et les résidus aux propriétés chimiques similaires en gris. La sénine nucléophile est en rouge, les acides aminés catalytiques sont en jaune (Lys73) et vert (Glu166), les résidus mutés (signalés par une étoile *) dans la présente étude sont en cyan (profil IR) et rose (profil ESBL). Alignement réalisé avec le programme T-Coffee (51).

Toutefois, cette variation de séquence est compensée par la forte similarité de structures entre les différentes β-lactamases de classe A et par une forte conservation de résidus importants pour la catalyse et/ou la fixation du substrat dans le site actif (Figure 1.5).

Dix ans plus tard, la structure 3D de l'enzyme (Figure 1.5) fut résolue par cristallographie en présence et en absence d'inhibiteur (47,52). Ainsi, il a été observé que plusieurs motifs structuraux conservés au sein de la classe A sont retrouvés chez BlaC (montrés en Figure 1.6 et Figure I.1)



Figure 1.5 : Structure cristalline de la β -lactamase BlaC et de son site actif.

(A) Structure moléculaire schématisée de BlaC. En bleu, hélices α du domaine tout α . En magenta, hélices α et brins β du domaine α/β . En rouge, résidu catalytique (Ser70). (B) Vue agrandie du site actif. Les principaux résidus catalytiques sont représentés : Ser70 (rouge), Lys73 (jaune) et Glu166 (vert). Code PDB 2GDN.



Figure 1.6 : Superposition structurale de BlaC et TEM-1 et présentation des motifs conservés au sein de la famille des β -lactamases de classe A.

BlaC (cyan) superposée à TEM-1 (gris). Le motif I est coloré en orange (résidus Arg61-(X_{aa})₂-Glu64-X_{aa}-Phe66-(X_{aa})₃-Ser70-(X_{aa})₂-Lys73), le motif II (boucle SDN/G, résidus Ser130-Asp131-Asn132) est en rouge, le motif III (résidus Asp233-Lys-Thr-Gly236.) est en jaune et le motif IV (boucle oméga, résidus Val159-Thr180) est en vert. Codes PDB 2GDN (BlaC) et 1BTL (TEM-1). Figure réalisée avec PyMOL (Schrödinger, USA)

Le motif I est une séquence consensus Arg61-(X_{aa})₂-Glu64- X_{aa} -Phe66-(X_{aa})₃-Ser70-(X_{aa})₂-Lys73 contenue entre le brin β 2 et l'hélice α 2. Une triade catalytique SDN (Ser130-Asp131-Asn132) fut identifiée comme appartenant au motif II. Cependant, BlaC possède une particularité au sein de cette région conservée par l'évolution et importante pour son activité, avec le remplacement d'une asparagine par une glycine dans la boucle catalytique, soit SDG (47,52). L'enzyme possède un domaine α , composé de six hélices, α 2, α 5, α 6, α 7, α 9 et α 10 qualifiées de longues et d'autres plus courtes, α 3, α 4 et α 8. Sa structure a également mis en évidence un domaine α/β composé des brins β 1- β 5 formant un feuillet β anti-parallèle, d'une hélice courte α 11 et d'hélices α 1 et α 12 composant les extrémités N- et C-terminales. Finalement, il a été conclu que BlaC est structurellement plus proche de la β -lactamase de *Proteus vulgaris* K1 (47,52).

Son site catalytique, représenté en Figure1.5, est situé entre les domaines α et α/β de l'enzyme. Il renferme les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse de l'antibiotique. Effectivement, les résidus importants dans la catalyse (Glu166, Ser70 et Lys73) sont strictement conservés chez tous les membres de la famille des β -lactamases de classe A. Ils sont situés dans les hélices α 2 et α 5 (47,52). L'influence de la nature (hydrophobicité, charge) des acides aminés impliqués dans la catalyse ou de l'environnement du site actif peut mener à une protéine mal repliée, non

stable thermodynamiquement et/ou non fonctionnelle. Ainsi, la présence de certaines molécules d'eau, comme la WAT65 (code PDB 2GDN,(47)), qui joue un rôle déterminant dans la catalyse (liaison hydrogène avec l'oxygène de la chaine latérale de Ser70), est fortement conservée chez les β -lactamases de classe A. Finalement, la taille du site actif de BlaC est largement supérieure à celle identifiée parmi ses homologues de la classe A. Selon Wang *et al.* (47,52), les raisons pouvant expliquer cette situation seraient les suivantes : la mutation de nombreux résidus clés, un réarrangement structural des résidus conservés (chaînes latérales) et une insertion dans le site actif de quatre nouveaux résidus (Gly145-Ala150).

Catalyse

Les enzymes sont en mesure d'augmenter la vitesse d'une réaction chimique d'un facteur de 10¹⁹ à 10²⁰ comparé aux réactions sans catalyseur (53). De plus, les enzymes sont plus spécifiques envers leur substrat, éliminant de ce fait la production de sous-produits inutiles (54). BlaC catalyse une réaction d'hydrolyse suivant le mécanisme catalytique présenté en Figure 1.7. Plusieurs études cristallographiques et biochimiques ont apporté des informations révélant les rôles spécifiques des acides aminés catalytiques impliqués dans la réaction. Cette réaction implique la formation d'une liaison covalente transitoire sous forme acyle-enzyme entre l'enzyme et le substrat (45,47,52,55). Lors de la première étape (ouverture du noyau β-lactame), un acide aminé, la Lys73, agit comme activateur de la Ser70 de BlaC en la déprotonant (52). Des études cristallographiques ont en effet montré que le mutant K73A était incapable de s'acyler au substrat utilisé dans la structure obtenue (52). La structure obtenue a donc été assimilée à un complexe Michaelien non-covalent pré-acylé. Ainsi, la Ser70 entreprend alors une attaque nucléophile sur le noyau β-lactame du substrat, permettant ainsi la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et le substrat (45,47). La Lys73 se trouve alors à agir comme une base dans ce mécanisme activant la Ser70. Ensuite, lors de l'étape de déacylation, une molécule d'eau activée par Glu166 attaque l'intermédiaire formé pour le libérer du produit par coupure de la liaison ester permettant la déprotonation de Lys73. Selon les substrats, l'une ou l'autre de ces étapes peut être limitante ou influencée par l'environnement physico-chimique des acides aminés, qui évolue tout au long du processus d'hydrolyse (55). De plus, le mécanisme de BlaC est largement influencé par le pH, mais est tout de même active à des pH très faibles (55).

Enfin, le groupe de Sacchettini (47) a montré le rôle stabilisateur et déterminant de plusieurs autres résidus comme Lys234, Thr235, Thr237, Ser130, Gly132 dans la reconnaissance, la discrimination et la stabilisation des substrats chez BlaC. L'ensemble de ces étapes mène donc à la dégradation des antibiotiques à noyau β-lactames par BlaC. À noter que sans β-lactamase, les composés β-lactames atteignent les PBPs, impliquées dans la synthèse des parois bactériennes, qui sont alors incapables d'entreprendre l'étape de désacylation susmentionnée. La réaction s'arrête alors et l'antibiotique rempli son rôle en inhibant les PBPs, empêchant ainsi la synthèse des parois de peptidoglycane bactériennes.

15



Figure 1.7 : Mécanisme catalytique détaillé de BlaC.

(A) Ser70 est activée par Lys73. Après l'attaque nucléophile (B), un intermédiaire acyle-enzyme est formé (C). Enfin, une molécule d'eau, activée par Glu166 (D), attaque la liaison ester (E) et libère l'enzyme du produit hydrolysé (F), qui se régénère comme à l'état initial (G). Inspiré de Chow *et al.* (2013)

À l'inverse, il est possible d'inhiber BlaC avant même qu'elle n'entre en contact avec le βlactame, principe sur lequel repose la combinaison méropénème-clavulanate, dont l'efficacité de l'inhibiteur a été prouvée chez TEM-1 en combinaison avec l'amoxicilline (22,42,56) (Figure 1.1). Des études de spectrométrie de masse ont montré que l'inhibition de BlaC par le clavulanate se ferait selon le mécanisme présenté en Figure 1.8.

Le mécanisme d'inhibition de BlaC par le clavulanate diffère légèrement de ce qui se passe chez TEM-1. Chez TEM-1, la Ser70 (principal acide aminé impliqué dans la catalyse) se trouve à former un lien covalent indirect avec la Ser130, par l'intermédiaire du clavulanate (57), rendant l'hydrolyse d'un β-lactame impossible. La cristallisation d'un état intermédiaire de BlaC avec l'inhibiteur ne montre pas ce lien covalent (code PDB 3CG5). Dans tous les cas, l'enzyme reconnait le noyau β-lactame du clavulanate puis l'hydrolyse (semblable au mécanisme catalytique présenté plus haut). Chez BlaC, le clavulanate génère alors un intermédiaire imine

du complexe enzyme-substrat. L'acyle-enzyme est ensuite décarboxylée, menant alors à la forme prédominante visible en spectrométrie de masse (Figure 1.8). Cette forme, la plus stable, est alors une forme protégée contre l'hydrolyse par l'intermédiaire de la Glu166 de BlaC. Ce mécanisme laisse donc place à plusieurs intermédiaires d'acyle-enzyme pouvant coexister, mais qui sont non-fonctionnels (45). Les études cristallographiques réalisées sur le complexe BlaC-clavulanate ont aussi montré le déplacement de deux molécules d'eau (Wat329 et Wat521, PDB 3CG5), qui déplacent par la même occasion la Ser70 (52).



Figure 1.8 : Mécanisme proposé de l'inhibition de BlaC par le clavulanate

Les trois premières étapes consistent en la formation de l'intermédiaire acyle-enzyme. Par l'intermédiaire de molécules d'eau, le clavulanate voit sa structure modifiée (D,E,F,G,H). Un état « intermédiaire final » imine (I) peut mener à deux états qui se substituent entre eux (J-1 et J-2) par hydratation et hydrolyse. Dans tous les cas, l'enzyme est liée de façon covalente à son inhibiteur. Inspiré de (45).

Une β -lactamase à large spectre de reconnaissance

La présence de BlaC chez TB empêche un traitement aisé de la tuberculose par les antibiotiques à noyau β -lactame. Parmi les composés les plus efficaces pour traiter les infections causées par des souches bactériennes, les carbapénèmes (dont l'imipénème) sont des dérivés de la thiénamycine et sont utilisés en clinique depuis leur approbation par la FDA en 1985. Il fut démontré que BlaC est une β -lactamase à large spectre de reconnaissance, car elle est en mesure d'hydrolyser l'imipénème et son proche parent le méropénème (45). Ce dernier s'est toutefois récemment montré efficace pour le traitement *in vitro* et *in vivo* de souches XDR de TB en combinaison avec le clavulanate (8). Le clavulanate (Figure 1.1) semble agir à titre d'inhibiteur covalent de BlaC de manière irréversible (ou permanente), c'est-à-dire que l'enzyme ne retrouve pas d'activité au bout de quelques minutes, contrairement à l'inhibition au sulbactame et au tazobactame (45). De plus, la faible activité catalytique de BlaC contre le méropénème (k_{cat} <0.1 min⁻¹) (8) rend encore plus efficace cette combinaison.

La perspective de combiner un β -lactame agissant à titre d'inhibiteur de BlaC et de rétablir une sensibilité aux β -lactames déjà utilisés en clinique pour soigner la tuberculose constitue une piste très intéressante et inédite à explorer afin de permettre à la médecine actuelle de traiter efficacement cette infection (8). Or, l'utilisation en milieu clinique de cette combinaison inhibiteur/carbapénème pour traiter la tuberculose risque de favoriser l'apparition de mutants résistants de BlaC. L'étude moléculaire détaillée des mécanismes d'acquisition de ces mutations s'avère donc une approche sérieuse visant à prédire et à élucider de nouvelles stratégies d'inhibition de la β -lactamase BlaC.

Mutations conférant une résistance aux inhibiteurs chez les β -lactamases et choix des résidus à muter pour l'étude

Dans le présent projet, nous avons étudié l'impact chez BlaC des mutations les plus couramment observées chez d'autres β-lactamases de classe A conférant une résistance aux inhibiteurs, afin de prédire des mutations futures chez cette enzyme pour contrer la combinaison ampicilline-clavulanate une fois son utilisation en clinique approuvée. L'ensemble de ces mutations est répertorié dans la Figure 1.9 et illustré dans la Figure 10.Les mutations choisies pour cette étude sont pour certaines directement justifiées par le mécanisme réactionnel d'inhibition de TEM-1 par le clavulanate.



Figure 1.9 : Fréquence de mutations observées en clinique conférant une résistance aux inhibiteurs chez TEM-1.

Les acides aminés marqués d'un astérisque sont les mutations visées dans cette étude. Chaque couleur correspond à une position précise. La mutation K234R n'étant pas répertoriée chez TEM-1, celle-ci est absente de ce graphique. Créé à partir de (21).



Figure 1.10 : Positions IR à l'intérieur et à proximité du site catalytique de la β-lactamase BlaC ciblées dans la présente étude.

Les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse du substrat sont en rouge (Ser70), en jaune (Lys73) et en vert (Glu166). Les acides aminés ciblés pour des études mutationnelles sont en bleu.

Parmi les nombreuses mutations retrouvées dans la littérature et/ou en clinique, certaines comme la M182T n'ont pas été appliquées à BlaC. Effectivement, cette thréonine se trouve déjà au sein de l'enzyme (Voir ici-bas dans la partie 3.2). Notre choix s'est porté en premier lieu sur la Met69. La Met69 se trouve être le résidu le plus muté chez les β-lactamases de classe A

résistantes à leurs inhibiteurs, parfois en combinaison avec d'autres mutations (22). Ce résidu n'est que partiellement conservé parmi les enzymes de la classe A et l'homologue TEM-1 de BlaC peut tolérer plusieurs mutations permettant notamment de conférer une résistance au clavulanate (M69I, V ou L) malgré la proximité de la Ser70 (43,58). Il paraissait intéressant de muter ce résidu qui, en plus des raisons citées plus haut est remplacé par une cystéine chez BlaC. Ceci suggèere, dès le départ, l'importance de la chaîne latérale d'un acide aminé chez une protéine plutôt que l'acide aminé lui-même, la chaine latérale de ces deux acides aminés portant un atome de soufre. Notre étude s'est faite avec le résidu leucine, dont l'expression et la purification en laboratoire étaient optimales. Chez TEM-1, il a été démontré aussi que cette mutation ne perturbait pas la structure tridimensionnelle de la protéine (59). Chez la β-lactamase SHV (Klebsiella pneumoniae), une concentration minimale inhibitrice (CMI) et une concentration d'inhibition 50 (IC₅₀) plus grandes sont observées avec le clavulanate suite à la mutation de ce résidu, ainsi qu'une meilleure hydrolyse de la ceftazidine par rapport à l'enzyme native (60). Cette résistance serait principalement attribuable au fait que la chaîne latérale de la cystéine polarise le noyau β-lactame afin de faciliter l'attaque nucléophile de la Ser70 pour le briser. Chez TEM-1, des études cristallographiques ont montré qu'une géographie différente du site actif complique la reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme en présence d'une mutation au résidu 69 (58,61), sans toutefois perturber son spectre d'hydrolyse (important aussi pour le choix des résidus à muter).

L'étude s'est poursuivie avec le résidu Ser130, proche du site actif, qui permet l'acquisition d'une résistance au clavulanate chez TEM-1 lorsqu'il est substitué par une glycine (S130G). Ce résidu participe à la stabilisation du β-lactame et facilite les transferts de protons menant à l'ouverture du noyau β-lactame par l'enzyme. De plus, ce résidu se trouve lié à la Ser70 de manière covalente par l'intermédiaire du clavulanate lors de l'inhibition. La disparition de sa chaîne latérale brise ce lien et mène donc à une résistance à l'inhibiteur. La particularité de cette mutation est qu'aucun autre résidu qu'une glycine n'est substitué à la sérine. De plus, ce mutant se trouve toujours actif chez TEM-1, la perte de sa chaîne latérale étant compensée par une molécule d'eau (57).

Enfin, une mutation de la Lys234 en arginine augmente l'activité de l'enzyme contre les carboxypénicillines et contre les inhibiteurs pour deux mutants de SHV-1 (22). Cependant, une sensibilité accrue au clavulanate a été montrée chez TEM-1 avec la mutation K234R, contrairement à de nombreux autres mutants dits IR (62). Cette résistance conférée par Lys234 mutée en en arginine chez SHV-1 serait, d'après des études de dynamique moléculaire, due au

20

fait que l'arginine induirait un éloignement de la Ser130 par rapport à la Ser70. Cette liaison croisée entre les deux acides aminés est en effet créée lors d'une inhibition par le clavulanate chez TEM-1 (57). Enfin, comme chez PER-1 et de manière équivalente au résidu 244 chez TEM-1, l'arginine en position 220 augmente l'affinité pour le substrat lorsqu'elle est remplacée par une leucine, alors qu'un remplacement par une sérine augmente la résistance au clavulanate chez TEM-1 (63) et SHV-1 (64). Il est à noter que cette mutation possède un intérêt particulier car celle-ci n'est jamais retrouvée en clinique chez TEM-1. Il paraissait intéressant de savoir si BlaC pouvait se comporter différemment de son homologue chez *E. coli*.

Parallèlement, plusieurs études de modélisation et de dynamiques sont effectuées sur les βlactamases afin de comprendre ou d'expliquer comment une mutation peut modifier un profil catalytique et l'hydrolyse d'un substrat en plus des expérimentations classiques de laboratoire (59,65-68).

1.3 Objectifs et présentation de la recherche

Afin de mieux comprendre le fonctionnement catalytique de BlaC, son évolution moléculaire au cours des prochaines années et donc *in fine*, la résistance aux antibiotiques, BlaC a été soumise à une étude fonctionnelle et biophysique de plusieurs mutants d'intérêt. Cette étude de mutants, localisés au sein du site actif, a été initiée à la vue de la situation en clinique de ses homologues. Cette recherche étant basée sur l'introduction imminente en clinique d'une nouvelle combinaison de β -lactame-inhibiteur de β -lactamase, deux profils évolutifs ont été caractérisés.

En premier lieu, nos efforts se sont concentrés sur plusieurs substitutions connues chez les homologues de BlaC pour conférer une résistance clinique au clavulanate. Ces mutants (C69L, S130G, R220S et K234R) (Figure 3.1) ont été obtenus par mutagénèse dirigée et sont supportés par les données de la littérature. Ainsi, il est possible par cette démarche de déterminer précisément le rôle d'un acide aminé dans un mécanisme réactionnel et de l'expliquer fonctionnellement et structuralement. Cette recherche a ensuite été poursuivie plus en profondeur avec des doubles mutants (S130G-K234R, R220S-K234R et C69L-K234R), dont la pertinence est justifiée par la littérature récente (55). En second lieu, d'autres substitutions connues chez les ESBL pour étendre le spectre d'hydrolyse des β -lactamases ont été considérées : S104K, G238S et D240K (Figure 3.1). Cette étude était pertinente à mener étant donné la capacité native de BlaC à hydrolyser la plupart des β -lactames (contrairement à ses homologues) et les recherches continuelles pour l'arrivée de nouveaux antibiotiques à noyau β -lactame sur le marché.

L'activité des mutants contre différents β-lactames nous a permis d'obtenir plusieurs paramètres cinétiques caractéristiques de ces enzymes différant de BlaC par une substitution (ANNEXE II) et donc, de mesurer au mieux l'influence de ces mutations sur l'affinité et l'hydrolyse de ses substrats. Ensuite, l'apparition de résistance au clavulanate chez ces mutants a été étudiée à l'aide de tests d'inhibition spécifiques au type d'inhibition exercée par le clavulanate sur BlaC (irréversible). Cette démarche permet de quantifier la résistance et de déterminer l'influence individuelle de chaque mutation sur la sensibilité de BlaC au clavulanate. Enfin, chacune des enzymes créées dans le cadre de cette étude a été soumise à des tests de dichroïsme circulaire afin d'évaluer la stabilité des mutants produits. L'ensemble des résultats de recherche est divisé en deux parties, dont le corps principal a été soumis pour publication sous forme d'article.

Prédiction expérimentale de mutants résistants aux inhibiteurs chez la β-lactamase BlaC de *Mycobacterium tuberculosis*

COMBINATORIAL ACTIVE-SITE VARIANTS CONFER SUSTAINED CLAVULANATE RESISTANCE IN BLAC β-LACTAMASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

CHAPITRE 2

COMBINATORIAL ACTIVE-SITE VARIANTS CONFER SUSTAINED CLAVULANATE RESISTANCE IN BLAC β-LACTAMASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

2.1 Préface au chapitre 2

D'après l'évolution moléculaire subie chez les homologues structuraux de BlaC afin de conférer des résistances aux inhibiteurs, nous avons entrepris de vérifier si BlaC gagnerait à subir des mutations semblables au sein de son gène afin de contourner la combinaison méropénèmeclavulanate en clinique. L'étude s'est concentrée sur les mutations les plus fréquemment observées au site actif des β-lactamases de classe A menant à un profil de résistance au clavulanate. Après confirmation de la sensibilité de l'enzyme native à l'inhibiteur, différents profils de résistances ont été observés. Le mutant C69L démontre une légère résistance au clavulanate et celle-ci est supplémentée d'une activité semblable à l'enzyme native pour l'hydrolyse de plusieurs substrats. Les mutants S130G, R220S et K234R présentent une forte résistance au clavulanate, démontrant leur importance originelle dans le mécanisme d'inhibition par le clavulanate de BlaC. Cependant, l'influence de chacune de ces mutations sur l'affinité et/ou la catalyse de l'enzyme pour ses substrats montre là encore l'importance d'une organisation adéquate du site actif. Ensuite, des effets additifs sont observés dans le cas des doubles mutants, avec une conservation de la résistance au-delà de plusieurs heures. Parallèlement, les études de dichroïsme circulaire ont confirmé que des variations dans les structures secondaires de l'enzyme apparaissent sans toutefois générer une perte de la structure globale de l'enzyme.

L'ensemble de ces résultats ont été soumis au périodique Biochemistry. Ce travail a été effectué sous la direction du Pr. Nicolas Doucet. La présence de M. Jordan Volpato à titre d'auteur se justifie par sa participation à la mutagénèse et par une aide technique aux prémices de ces études. La présence de M. Philippe Egesborg est à souligner pour sa participation aux essais sur les simples mutants au cours de son stage ainsi que sa participation aux aspects annexes de l'article ou des expériences présentées (corrections, discussions, figures). Il est à noter enfin que son seul travail sur les mutants doubles, effectué dans le cadre de sa maîtrise, ont permis d'étoffer cette étude basée sur des mutants simples de la β-lactamase BlaC. Ma contribution à

24
l'article est présente à presque tous les niveaux de sa conception : revue et mise à jour de la littérature ; mise en place du protocole pour les études cinétiques (de la procédure au traitement des données récoltées, interprétation) ; création de mutants (génétique et purification) ; mise en place des protocoles de dichroïsme circulaire (de la procédure au traitement des données récoltées, interprétation) ; mise en place du protocole pour l'inhibition (choix du modèle le plus adapté, traitement des données récoltées, interprétation) ; mise en place du protocole pour l'inhibition (choix du modèle le plus adapté, traitement des données récoltées, interprétation) ; exécution d'expériences de cinétiques (hors mutants doubles – analyse des données seulement dans ce cas-ci) et de biologie structurale puis écriture de l'article (dont création et mise en page des figures) et analyse des résultats soumis (d'après la littérature et les données).

2.2 Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques lors du traitement de maladies infectieuses est devenue un problème récurrent à travers le monde. Mycobacterium tuberculosis se trouve être fortement résistante aux traitements par antibiotiques à noyau β-lactame, résistance conférée par la présence d'une β-lactamase (BlaC), encodée dans son génome. BlaC se trouve être une hydrolase et ce, à large spectre d'action, capable d'hydrolyser la plupart des β-lactames utilisés en clinique. Récemment, il a été démontré qu'un β-lactame associé à un inhibiteur de BlaC pouvait être utilisé pour inhiber la croissance de souches résistantes de Mycobacterium tuberculosis aux antibiotiques. Cette découverte relance donc les recherches pour un traitement à nouveau efficace contre la tuberculose. Dans l'étude présentée ci-bas, des substitutions sur des résidus se trouvant au sein du site actif de BlaC ont été realisées pour démontrer que des substitutions sur les résidus 69, 130, 220 et/ou 234 peuvent agir synergiquement pour mener à une forte résistance au clavulanate. Or, le clavulanate est l'inhibiteur le plus utilisé en clinique. Même si la plupart des mutants restent sensibles à ce composé, deux doubles mutants R220S-K234R et S130G-K234R se montrent clairement moins affectés par le clavulanate, en conservant jusqu'à respectivement 46% et 83% d'activité hydrolase résiduelle après 24 heures d'inhibition en présence de l'inhibiteur. Ces résultats démontrent donc que des substitutions au sein du site actif de BlaC méneront dans le futur, comme il a été observé chez ses homologues, à des dérivés de l'enzyme native résistants au clavulanate, sur le long terme. Ce dernier point est important, compte tenu des particularités connues de la croissance de Mycobacterium tuberculosis (près de 24 heures pour une division et environ 7 jours pour arriver à saturation). Enfin, ces résultats illustrent la grande capacité d'adaptation des β-lactamases et le potentiel qui en résulte pour l'apparition de résistance aux inhibiteurs, qui sont malgré cela redevenus un espoir pour traiter la tuberculose.

Combinatorial Active-Site Variants Confer Sustained Clavulanate Resistance in BlaC β-Lactamase from Mycobacterium tuberculosis

Philippe Egesborg^{1,†}, Hélène Carlettini^{1,†}, Jordan P. Volpato¹, Nicolas Doucet^{1,2,3*}

¹From INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

²From PROTEO, the Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, 1045 Avenue de la Médecine, Université Laval, Québec, QC, G1V 0A6, Canada

³From GRASP, the Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines, 3649 Promenade Sir William Osler, McGill University, Montréal, QC, H3G 0B1, Canada.

Running Title: Sustained Clavulanate Resistance in BlaC β -Lactamase.

*To whom correspondence should be addressed: INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada, Tel: (450) 687-5010, ext. 4212; Fax: (450) 686-5501; E-mail: nicolas.doucet@iaf.inrs.ca; [†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: β -lactamase; β -lactam; antibiotic resistance; *Mycobacterium tuberculosis*; sitedirected mutagenesis; clavulanic acid. **Background:** Bacterial antibiotic resistance is threatening infectious disease treatments worldwide.

Results: Mutational variants of the M. tuberculosis BlaC β -lactamase allow this bacterium to evade the action of the clavulanate inhibitor.

Conclusion: Specific BlaC variants remain sufficiently stable and active to be transferred from one generation to the next.

Significance: Particular β -lactam antibiotic regimens against *M. tuberculosis* could become ineffective.

SUMMARY

Bacterial resistance to **B-lactam** antibiotics is a global issue threatening the success of infectious disease treatments worldwide. Mycobacterium tuberculosis has been particularly resilient to β -lactam primarily the treatment, due to chromosomally encoded BlaC Blactamase, 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

growth of extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis*, effectively offering new tools for combined treatment regimens against resistant strains. In the performed present work, we combinatorial active-site replacements in BlaC demonstrate to 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 generation times prolonged bacterial compatible with mycobacterial proliferation. These results emphasize the

β-lactam-BlaC

combinations can be used to inhibit the

inhibitor

specific

formidable adaptive potential of inhibitorresistant substitutions in β -lactamases, potentially casting a shadow on certain specific β -lactam-BlaC inhibitor combination treatments against *M. tuberculosis.*

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, which is 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 drugsusceptible 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 multi-drug resistant (MDR), extensivelydrug resistant (XDR), and totally drugresistant (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 comprise the classical penicillin, cephalosporin and carbapenem compounds, 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 βlactamase, an enzyme that can hydrolyze a broad range of β-lactam antibiotics before they exert their inhibiting effect on the penicillin-binding (PBPs), proteins periplasmic enzymes involved in proper cell wall synthesis and maintenance (5). The chromosomally encoded BlaC β -lactamase is an Ambler class A enzyme (6) responsible for the inefficiency of β -lactams in TB treatment (7). Although 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). BlaC is an extended-spectrum B-lactamase (ESBL) with broad substrate recognition and a capacity to hydrolyze the latest generations of antibiotics. including **B**-lactam cephalosporins and carbapenems (10).

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 Α **B**-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-βlactamase inhibitor combinations that do not require intravenous deliveries—could very serious well become 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 broadspectrum antibiotic resistance BlaC variants, as previously observed with homologous class A B-lactamases. In fact, previous directed evolution studies performed on βlactamases 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 extended spectrum β -lactamases (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 24h) and the irreversible inhibition of IRT variants by clavulanate over a period of 24h 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 order of variants, their mutational appearance and their structural effects on the enzyme (18). Because of the functional and structural similarity between BlaC and other class A *β*-lactamases, it was hypothesized that the same evolutionary path may yield similar BlaC IRT combinatorial variants. Based on previous evolutionary patterns and structural analyses, 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 inhibitorresistant phenotypes in homologous βlactamases, *i.e.* residues 69, 130, 220 (or 244), and 234 (15).

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. However, most single and double IRT variants remain sensitive to clavulanate over periods of several hours. seriously hampering their efficacy at averting clavulanate inhibition in slowgrowing mycobacterial species such as Mtb. Nonetheless, we observe synergistic effects between the S130G K234R and replacements, producing a double variant that conserves more than 80% residual activity after 24h incubation in presence of a clinically relevant clavulanate concentration. Although the time-dependent clavulanate inactivation of most BlaC variants suggests that single IRT substitutions are unlikely to appear in clinical isolates of Mtb subjected β -lactam- β -lactamase inhibitor to treatments, caution is advisable for specific active-site substitutions that were previously shown to appear upon selective pressure.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals-Chemicals and reagents were purchased from the following suppliers: benzylpenicillin (BZ) (Biobasic, ON. cefotaxim Canada); cephalothin (CF), (CTX). ceftriaxone (CRO), cefoxitine (FOX), clavulanate (CLA), (Molekula, UK); restriction enzymes (New England Bio Labs, MA, USA) and Pfu DNA polymerase (Feldan, OC, 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 protein (9) was provided in pUC57 by GenScript (Piscataway, NJ, USA) and was subsequently subcloned in pET28a(+) (EMD Millipore, MA, USA) for protein expression. The gene was flanked by the NdeI and HindIII restriction sites. Selection was performed on 60 µg/ml kanamycin for cell transformation and 30 µg/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 (19), 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 16h. **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, USA).

Enzyme kinetics assays-Enzyme kinetics assays were performed using the following wavelengths and molar extinction coefficients (20-22): 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 cm¹. All substrates used in the present study are presented in Figure 2.1. Hydrolysis of βlactam compounds was monitored by spectrophotometry at room temperature in 0.1M MES buffer at pH 6.4 using a Cary UV 300 spectrophotometer (Agilent) (19). 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, USA). When substrate concentrations prevented enzyme saturation, k_{cat} and K_m were estimated from the Michaelis-Menten equation in conditions where $V_0/[E][S] \approx k_{cat}/K_m$ and $[S] << K_m$, as described (23). Standard deviations (SD) 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_{inact} , K_i and k_{inact}/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:

$$IC_{50}(t) = K_{i} \left(1 + \frac{S}{K_{m}}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta IC_{50}.k_{\text{inact}}.t}}{\eta IC_{50}.k_{\text{inact}}.t} - 1\right);$$

$$\eta IC_{50} = \frac{IC_{50}(t)}{K_{I} \left(1 + \frac{S}{K_{m}}\right) + IC_{50}(t)};$$

where K_i represents the inhibition constant, k_{inact} the inactivation rate of the enzyme; t the incubation time of the enzyme with

clavulanate; S the substrate concentration; K_m the Michaelis constant, and IC₅₀(t) 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_{inact} value of each mutant. Additionally, the partition ratio (k_{cat}/k_{inact}) , 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 (25). The ratio $[I]_0/[E]_0$ was plotted against residual activity of the enzyme with no 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_{cat}/k_{inact}) . Standard deviations (SD) were obtained by three replicates from two independent experiments. When the inhibition parameter k_{inact} 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.

Susceptibility of IRT variants over 24h— Susceptibility of IRT variants over 24h was performed by incubating enzymes in presence of a clinically relevant clavulanate concentration (5 µg/ml) 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—Circular dichroism (CD) analyses were used to assess the effect of mutational replacements on the secondary structure of the enzyme, in addition measuring to temperature denaturation of BlaC variants. CD profiles were recorded on Jasco 815 a spectropolarimeter with a Peltier-effect temperature controller (Jasco Inc., MD, USA). Measures were performed on 15 µM protein in 200 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and 25°C (26). 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 nm and 222 nm. Temperature was raised in 0.1°C increments at a ramp rate of 2°C/min from 25°C to 70°C. $T_{\rm m}$ values were calculated using the Jasco Spectra Manager software and the fraction folded α_i was evaluated as previously described (27).

RESULTS

Thermal stability of single and double IRT mutants-Based on structural and functional information available from homologous class A β-lactamases, positions 69, 130, 220 and 234 were primarily targeted for single and double mutagenesis substitutions in BlaC (Figure 2.2). Circular dichroism 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 (Figure 2.3) (28). 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 wildtype enzyme. Mutants were also thermally denatured, allowing the determination of $T_{\rm m}$ for WT BlaC and all mutants (Table 2.1). 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.

Indeed, except for S130G-K234R ($\Delta T_m = -4.1$ °C relative to WT), double variants R220S-K234R and C69L-K234R are in the same thermal stability range as their respective single mutants. Interestingly, 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 2.2. In line with a recent report focusing on ampicillin and nitrocefin resistance at positions R220 and S130 (13), we found that K_m values 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 $K_{\rm m}$ values increased 2-fold (S130G) to 13-fold (R220S) relative to WT, with the exception of variant C69L, which displayed nearly 3fold 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. 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 $K_{\rm m}$ values remain similar, leading to modest 4to 8-fold decreases in catalytic efficiency (Table 2.2). 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 and the third-generation CRO FOX 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 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 (29). 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. Due to 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 penicillinβ-lactamase inhibitor cocktail. These results are in line with recent survival assays performed with 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 2.1). 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 27fold (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 Indeed, C69L-K234R double variant. maintains the same improved k_{cal} as K234R, yielding 4- to 6-fold better catalytic efficiencies than WT for the two penicillin substrates tested. However, 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 rate at which the enzyme-inhibitor complex is formed (k_{inact}) , the inhibitor binding affinity (K_i) , the clavulanate hydrolysis rate (k_{cat}) , and the partition ratio (k_{cat}/k_{inact}) for BlaC and characterized variants are shown in Table 2.3. As expected, all single variants

that the IRT phenotype observed in class A homologues 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 μ M (0.43 μ M for WT) and a k_{inact} in the same range as BlaC. This yields a variant only three times more likely to hydrolyze clavulanate than WT (k_{cat}/k_{inact}) , which is mainly due to a 7-fold increase in the rate of clavulanate hydrolysis $(k_{cat} = 1267 \text{ s}^{-1} \text{ relative to } 333 \text{ s}^{-1} \text{ for WT})$. In contrast, all other single variants show substantially perturbed clavulanate binding affinities, ranging from 67-fold (K234R) to 595-fold (S130G) lower Kis, and inactivation rates (k_{inact}) ranging from 0.03 s⁻¹ (K234R) to 0.005 s⁻¹ (R220S). This yields variants 20 to 40 times more likely than WT to breakdown clavulanate than being inactivated by it Double IRT variant $(k_{cat}/k_{inact}).$ R220S/K234R has a synergistically detrimental effect on clavulanate affinity when compared to its deconvoluting single mutants ($K_i = 620 \mu M$ for R220S/K234R, relative to 263 µM and 29 µM for R220S and K234R, respectively). The effect on kinact is comparable and the presence of the K234R mutation exacerbates the R220S replacement. This yields a double variant with a k_{inact}/K_i ratio 127,000-fold lower than

show resistance to clavulanate, confirming

WT, demonstrating that clavulanate is terribly inefficient at inhibiting R220S-K234R. However, introducing both the R220S and K234R in combination also perturbs the rate of clavulanate hydrolysis by an order of magnitude relative to WT. Consequently, although the R220S-K234R variant is extremely resistant to clavulanate, its k_{cat}/k_{inact} relative to WT is lower than its respective single mutants. This yields a variant that is not as efficient as the single **R220S** and K234R replacements at hydrolyzing clavulanate. The C69L-K234R double variant is an even more potent combination that can efficiently avert clavulanate inhibition while at the same time significantly increasing the rate of inhibitor hydrolysis relative to WT (2844 s⁻¹ relative to 333 s^{-1}). These combined substitutions generate a protein variant with a partition ratio very similar to the single S130G replacement. 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 24h—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 24h in presence of 5 µg/ml clavulanate, as recently described (13). In line with previous time-dependent inhibition experiments, our results show rapid enzyme deactivation by clavulanate for most variants (Figure 2.4). All single replacements and the C69L-K234R double variant show less than 30% residual activity after only 5h 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 βlactam hydrolytic activities of 46% and 83% after 24h incubation, respectively.

DISCUSSION

To predict and characterize clavulanate resistance in BlaC, we constructed a series of single and double mutants at residue positions that were previously shown to be involved in IRT phenotype acquisition in

homologous class A β -lactamases (15,30). Residues 69, 130, 234 and 220/244 are the most commonly observed IRT replacements found in clinical isolates of homologous βlactamases (14,15). Met69 (Cys69 in BlaC) is very close to the strictly conserved catalytic nucleophile Ser70 and is the most common residue replacement reported in TEM IRT variants (Figure 2.2b) (15). To this day, nearly 30 IRTs and/or CMTscomplex mutant TEMs, which combine IRT and ESBL mutations-show an incredible tolerance for substitutions at this position (17). fact, Despite this only three substitutions (M69I, M69L, M69V) were observed in clinical isolates or selected from directed evolution studies on TEM and SHV (31). These three variants lead to important decreases in inhibitor efficiency, which was mainly attributed to hydrophobic factors (32). The second targeted position is the critical Ser130 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 cross-linking of mechanism-based inhibitors between Ser130 and the catalytic Ser70, its replacement for glycine confers resistance to all β -lactamase suicide inhibitors (clavulanate, sulbactam and tazobactam) (33). Arg220 is the

39

structural equivalent to Arg244 found in many class A β -lactamases (9). In fact, these two positions are interchangeable in TEM-1 (34) and partially interchangeable in BlaC (13). Since the guanidinium side chains of both Arg244 and Arg220 point in the same direction and roughly occupy the same strategic orientation in the active site (Figure 2.2b), a serine replacement causes the displacement of a conserved water molecule essential for the secondary ring opening of clavulanate, thereby conferring inhibitor resistance (13,35-37). 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 (16,38). Lys234 is highly conserved among class A β -lactamases and PBPs (39), forming the KTG (or KSG) motif involved in substrate recognition and transition-state stabilization (40, 41).However, Lys234 is replaced by arginine in most known carbenicillinases (42).

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 βlactamases found in the fast-growing Enterobacteriaceae. In fact, 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 convincingly argued that the in vivo resistance phenotype is a combination of time-dependent inactivation of BlaC and the slow doubling time of Mtb (~24h). 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 24h 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, remain relatively immune to long-term clavulanate inactivation, preserving 83% and 46% β-lactam residual hydrolysis activity after 24h incubation with the inhibitor. This observation suggests that combinatorial active-site IRT variants could potentially remain active and immune to inhibition in vivo 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 inhibitorresistant 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 measured. 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 Blactamases antibiotic selective upon pressure.

References

1. Hugonnet, J. E., Tremblay, L. W., Boshoff, H. I., Barry, C. E., and Blanchard, J. S. (2009) Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **323**, 1215-1218

2. Nguyen, L. (2012) Targeting antibiotic resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*: recharging the old magic bullets. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **10**, 963-965

3. WHO. (2010) Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO Press

4. Kurz, S., and 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., and Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and βlactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 361-385

6. Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., and Waley, S. G. (1991) A standard numbering scheme for the class A β-lactamases. *Biochem. J.* **276**, 269-270

7. Flores, A. R., Parsons, L. M., and Pavelka, M. S., 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, J. E. (1965) The nature of mycobacterial penicillinase. Am. Rev. Respir. Dis. 91, 117-119

9. Wang, F., Cassidy, C., and Sacchettini, J. C. (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, P. A. (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., and Kocagoz, T. (2004) The vitro efficacy of β -lactam and β -lactamase inhibitors against multidrug resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Antimicrob. Agents 23, 408-411

12. Dauby, N., Muylle, I., Mouchet, F., Sergysels, R., and Payen, M.-C. (2011) Meropenem/clavulanate and linezolid treatment for extensively drug-resistant tuberculosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 812-813

13. Kurz, S. G., Wolff, K. A., Hazra, S., Bethel, C. R., Hujer, A. M., Smith, K. M., Xu, Y., Tremblay, L. W., Blanchard, J. S., Nguyen, L., and Bonomo, R. A. (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

 Salverda, M. L. M., De Visser, J. A. G. M., and Barlow, M. (2010) Natural evolution of TEM-1 β-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1015-1036

Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010) Three decades of β-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160-201

16. Mendonça, N., Manageiro, V., Robin, F., Salgado, M. J., Ferreira, E., Caniça, M., and 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, Q. K., Bos, F., and Pleiss, J. (2009) The lactamase engineering database: a critical survey of TEM sequences in public databases. *BMC genomics* **10**, 390

18. Orencia, M. C., Yoon, J. S., Ness, J. E., Stemmer, W. P., and Stevens, R. C. (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 238-242

19. Hugonnet, J.-E., and Blanchard, J. S. (2007) Irreversible inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* β-lactamase by clavulanate. *Biochemistry* **46**, 11998-12004

20. Bouthors, A. T., Dagoneau-Blanchard, N., Naas, T., Nordmann, P., Jarlier, V., and 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

21. De Wals, P. Y., Doucet, N., and Pelletier, J. N. (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

22. Tribuddharat, C., Moore, R. A., Baker, P., and Woods, D. E. (2003) *Burkholderia pseudomallei* class A β -lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2082-2087

23. Fersht, A. (1984) Enzyme structure and mechanism, W.H. Freeman & Company

24. Krippendorff, B.-F., Neuhaus, R., Lienau, P., Reichel, A., and 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. Silverman, R. B. (1988) Mechanism-based enzyme inactivation: chemistry and enzymology, CRC Press

26. Wang, X., Minasov, G., and Shoichet, B. K. (2002) Noncovalent interaction energies in covalent complexes: TEM-1 β-lactamase and β-lactams. *Proteins* **47**, 86-96

27. Greenfield, N. J. (2006) Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. *Nat. Protoc.* **1**, 2891-2899

28. Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 119-139

29. Chica, R. A., Doucet, N., and Pelletier, J. N. (2005) Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 378-384

30. Guthrie, V. B., Allen, J., Camps, M., and 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

31. Helfand, M. S., Hujer, A. M., Sonnichsen, F. D., and Bonomo, R. A. (2002) Unexpected advanced generation cephalosporinase activity of the Met69Phe variant of SHV β -lactamase. *J. Biol. Chem.* 277, 47719-47723

44

32. Chaibi, E. B., Péduzzi, J., Farzaneh, S., Barthélémy, M., Sirot, D., and 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

33. Thomas, V. L., Golemi-Kotra, D., Kim, C., Vakulenko, S. B., Mobashery, S., and Shoichet, B. K. (2005) Structural consequences of the inhibitor-resistant Ser130Gly substitution in TEM β -lactamase. *Biochemistry* **44**, 9330-9338

34. Marciano, D. C., Brown, N. G., and 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

35. Giakkoupi, P., Tzelepi, E., Legakis, N. J., and Tzouvelekis, L. S. (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

36. Imtiaz, U., Billings, E., Knox, J. R., Manavathu, E. K., Lerner, S. A., and 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

37. Delaire, M., Labia, R., Samama, J. P., and Masson, J. M. (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

38. Manageiro, V., Ferreira, E., Albuquerque, L., Bonnet, R., and 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

39. Healey, W. J., Labgold, M. R., and Richards, J. H. (1989) Substrate specificities in class A β -lactamases: preference for penams vs. cephams. The role of residues 237. *Proteins* **6**, 275-283

40. Sakurai, Y., Tsukamoto, K., and Sawai, T. (1991) Nucleotide sequence and characterization of a carbenicillin-hydrolyzing penicillinase gene from *Proteus mirabilis*. J. *Bacteriol.* **173**, 7038-7041

45

41. Lenfant, F., Petit, A., Labia, R., Maveyraud, L., Samama, J. P., and Masson, J. M. (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

42. Lenfant, F., Labia, R., and Masson, J. M. (1991) Replacement of lysine 234 affects transition state stabilization in the active site of β -lactamase TEM-1. *J. Biol. Chem.* **266**, 17187-17194

FOOTNOTES

This work was supported by a "Fonds de Recherche Québec – Nature et Technologie" (FRQNT) new researcher start up program (to N.D.) and a "Fonds de Recherche Québec – Santé" (FRQS) Research Scholar Junior 1 Career Award (to N.D). P.E. and J.P.V. were respectively recipients of M.Sc. and B.Sc. scholarships from the "Fondation Universitaire Armand-Frappier de l'INRS".

*To whom correspondence should be addressed: Nicolas Doucet, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada, Tel: (450) 687-5010, ext. 4212; Fax: (450) 686-5501; E-mail: nicolas.doucet@iaf.inrs.ca

	T _m	∆ <i>T_m</i> relative to WT
	(°C)	(°C)
WT BlaC	49.9±0.6	0
C69L	46.2±0.4	-3.7
S130G	50.1±0.2	+0.2
R220S	47.6±0.3	-2.4
K234R	47.3±0.3	-2.6
S130G-K234R	45.8±0.2	-4.1
R220S-K234R	47.9±0.4	-2.0
C69L-K234R	46.9±0.3	-3.0

Table 2.1. Thermal denaturation of WT and mutant BlaC β -lactamase variants monitored by CD spectroscopy. Mean value \pm standard deviation.

	Benzylpenicillin (BZ)		Ampicillin (AMP)		Cefalothin (CF)				
	K _m	k _{cat}	k _{cat} /K _m	K _m	k _{cat}	k _{cat} /K _m	K _m	k _{cat}	k _{cat} /K _m
	(µM)	(s ⁻¹)	(μM ⁻¹ s ⁻¹)	(μM)	(s ⁻¹)	(μM ⁻¹ s ⁻¹)	(μM)	(s ⁻¹)	(μM ⁻¹ s ⁻¹)
WT	33±3	6.3±1.8	0.19±0.07	465±89	7.5±0.7	0.016±0.007	214±28	18±2	0.084±0.002
C69L	106±7	22±1	0.21±0.01	165±41	3.1±0.3	0.019±0.006	323±81	3.5±0.1	0.011±0.003
S130G	391±34	22±7	0.06±0.02	1100±267	4.0±0.6	0.004±0.001	773±441	0.13±0.06	0.0002±0.0001
R220S	2801±173	99±20	0.04±0.01	6115±1719	11±4	0.002±0.001	n/m	n/m	0.005±0.001
K234R	457±117	399±48	0.87±0.12	751±181	121±10	0.16±0.06	113±13	2.1±0.1	0.019±0.006
S130G-K234R	1815±416	4.2±0.8	0.002±0.001	2829±443	0.52±0.05	0.00019±0.00002	n/m	n/m	n/m
R220S-K234R	2213±502	16±3	0.007±0.004	13618±6442	4.0±1.5	0.00030±0.00003	n/m	n/m	n/m
C69L-K234R	404±109	414±4	1.1±0.4	1676±607	94±16	0.061±0.022	52±8	0.053±0.002	0.0010±0.0001

Table 2.2. β -lactam hydrolysis by WT BlaC and several single/double variants. Mean value \pm standard deviation. n/m: not measureable.

	<i>K_i</i> (μΜ)	k _{inac} (s ^{•1})	k _{inac} /K _i (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k _{cal} (s ⁻¹)	k _{cat} /k _{inac}	k _{inac} /K _i relative to WT	k _{cal} /k _{inac} relative to WT
WT	0.43±0.05	0.15±0.04	0.35±0.05	333±100	2220±17	1	1
C69L	4.5±0.3	0.19±0.03	0.04±0.01	1267±300	6668±2741	0.11	3
S130G	256±36	0.009±0.002	3.5±1.3×10 ⁻⁵	800±300	88889±10292	0.0001	40
R220S	263±34	0.005±0.001	1.9±0.2×10 ⁻⁵	250±67	50000±12599	0.00005	23
K234R	29±8	0.03±0.02	1.0±0.3×10 ⁻³	1317±733	43900±5379	0.003	20
S130G-K234R	134±41	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
R220S-K234R	620±23	0.0017±0.0001	2.74±0.07×10 ⁻⁶	28.7±1.3	16860±770	0.000008	8
C69L-K234R	79±31	0.037±0.011	4.7±0.7×10 ⁻⁴	2844±510	76871±13790	0.0013	35

Table 2.3. Inhibition of WT BlaC and single/double variants by clavulanate. Mean value \pm standard deviation.

Figure 2.1



FIGURE 2.1. 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.

Figure 2.2



FIGURE 2.2. Structural overlay of BlaC, TEM-1 and SHV-1 β -lactamases. (a) Structures of the highly homologous BlaC (PDB 2GDN), TEM-1 (PDB 1BTL) and SHV-1 (PDB 1SHV) β -lactamases are shown in blue, grey 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 (C69, S130, R220, 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, grey for TEM-1 and pink for SHV-1.

Figure 2.3



FIGURE 2.3. Circular dichroism spectra of WT BlaC and IRT variants. The far-UV spectra are shown for enzymes studied in 200 mM phosphate buffer (pH 7.0, 25°C). Thermal denaturation (T_m) values monitored by CD spectroscopy are given in Table 2.1.

Figure 2.4



FIGURE 2.4. Time-dependent enzyme inactivation of BlaC and IRT variants by clavulanate. Enzymes were incubated for 24h in presence of 5 μ g/ml clavulanate, as previously 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 5h. 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 24h, respectively.

Prédiction expérimentale de mutants résistants aux inhibiteurs chez la β-lactamase BlaC de Mycobacterium tuberculosis

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3 ÉTUDE DE LA POSSIBLE EXPANSION DU SPECTRE D'HYDROLYSE DE BlaC

3.1 Mise en contexte

Les β-lactamases ont présenté deux profils évolutifs au cours du temps : le profil IR, caractérisé par une résistance aux inhibiteurs de β-lactamases (22) et le profil ESBL, caractérisé par un spectre d'hydrolyse très large des β-lactames (34). Il s'agit de deux profils évolutifs présents chez les homologues de BlaC que l'enzyme pourrait, selon notre hypothèse, adopter afin de contrer la mise en clinique de la combinaison méropénème-clavulanate, comme chez ses homologues.

BlaC étant naturellement une ESBL (45,47), il nous semblait plus probable que celle-ci évolue vers un profil IR afin de déjouer la combinaison méropénème-clavulanate. Ce profil ayant montré des résultats intéressants confirmant notre hypothèse et menant à la rédaction d'un article, les résultats relatifs aux mutations menant à un possible profil ESBL ont été intégrés à ce mémoire de façon complémentaire dans le présent chapitre.

3.2 Facteurs expliquant le caractère ESBL natif de BlaC

BlaC hydrolyse avec une efficacité déconcertante les β -lactames, des pénicillines aux carbapénèmes. Or, nombre de ses homologues ont subi plusieurs cycles d'évolution pour en arriver à ce résultat. BlaC ne partageant que 40% d'identité de séquence avec ses homologues de la classe A (47) (Figure 1.4), cette distinction se trouve assurément dans sa séquence et dans plusieurs différences structurales que ses homologues ont mis du temps à acquérir :

L'insertion de quatre acides aminés au sein du site actif (Gly145 à Ala150). Cette insertion offre à BlaC l'occasion de placer de plus gros substrats (ex : céphalosporine de dernière génération Figure 1.1) dans son site actif et donc, de les hydrolyser (Figure 1.5). Il a été récemment démontré chez TEM-1 qu'un quelconque élargissement de site actif jouait un rôle dans l'acquisition d'un profil ESBL (69).

- Une boucle « SDN » devenue « SDG » (47) : cette particularité au sein du site actif et de la classe A des β-lactamases permet la liaison des carbapénèmes .
- Une boucle oméga largement plus grande que celle de TEM-1 (Val159 à Thr180 chez BlaC, contre Asn161 à Asn170 chez TEM-1). Cette boucle contient des acides aminés importants pour la catalyse et le positionnement du substrat, dont le Glu166 (important pour la désacylation) et l'Asn170 (impliqué dans le positionnement d'une molécule d'eau nécessaire à la déacylation de l'enzyme) (70) (Figure 1.7).
- Une orientation différente de la chaîne latérale du résidu S104 : là encore, le site actif est plus flexible et plus large chez BlaC (Figure 3.2).
- Les substitutions R244A (compensée par R220 chez BlaC) et R169A : ces deux mutations, présentes respectivement sur le brin β1 et la boucle oméga, permettent l'agrandissement du site actif (Figure 1.5) et une meilleure tolérance aux derniers antibiotiques (Figure 1.1).
- La substitution R164A. L'arginine 164, présente dans la boucle oméga (Figure 1.6) est un résidu qui influe fortement sur la catalyse des substrats lorsqu'il est muté. La boucle oméga est un élément structural très étudié chez les β-lactamases. Celui-ci est une structure proche du site actif lié à l'apparition de résistance dont l'importance est démontrée depuis quelques années (68,71-73) et le résidu 164 est en contact avec une molécule d'eau fortement conservée au sein des β-lactamases de classe A. Avec ce contact, R164 se trouve liée par un pont salin à l'Asp179 qui, lorsque ce pont est rompu (par la mutation), mène à une expansion du spectre d'action des β-lactamases.
- La substitution M182T : cette substitution se retrouve chez beaucoup de β-lactamases dérivées de TEM-1, grâce à son action stabilisante (21,74,75). Cette mutation est considérée comme un « suppresseur global » des effets déstabilisants des mutations ESBL ou IR (76) et se retrouve dans les deux profils d'évolution retrouvés en cliniques (Figure 3.1).
- La substitution L201P : muter une leucine en proline en position 201 chez TEM-1 permet une meilleure stabilité chez le mutant R244A et une meilleure expression protéique (77). Son action stabilisante s'effectue donc à plusieurs niveaux. Toutefois, le gain de stabilité est moins prononcé qu'avec M182T, mais l'enzyme supporte mieux un environnement à haute température (Figure 3.1).

3.3 Mutations sélectionnées pour l'amélioration du profil ESBL de BlaC

L'ensemble des mutations répertoriées en clinique comme conférant un profil ESBL chez TEM-1 est montré en Figure 3.1 :



Figure 3.1 : Fréquence de mutations observées en clinique conférant une résistance de type ESBL envers les β -lactames chez TEM-1.

Les substitutions marquées d'un asténsque (*) sont les mutations choisies pour cette étude dans le cadre d'un profil ESBL chez BlaC. Créé à partir de Salverda, 2010.

Les mutations choisies dans cette étude (Figure 3.2) ont clairement une influence sur la catalyse ou la fixation du substrat et se situent proche du site actif.



Figure 3.2 : Positions cibles de l'étude, à l'intérieur et à proximité du site catalytique de la β-lactamase BlaC.

Les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse du substrat sont en rouge (Ser70), en jaune (Lys73) et vert (Glu166). Les acides aminés ciblés par des études mutationnelles sont en bleu.

Lorsque la glycine en position 238 est substituée par une sérine chez TEM-1, la résistance contre les céphalosporines de 3ème génération est augmentée (Figure 1.1) (78). Cependant, seule ou en combinaison avec la mutation 104, une perte d'activité est observée contre l'ampicilline (78), un substrat appartenant à la famille des pénicillines historiques, très bien hydrolysées chez les β-lactamases de classe A. Chez l'enzyme SHV-1, l'activité catalytique contre le céfotaxime augmente fortement avec le double mutant D104K-G238S, ou encore dans le cas de la mutation seule E104K chez TEM-1 (79). Enfin, une asparagine à la position 104 est importante pour la catalyse de l'homologue PER-1 (lysine chez TEM-1) étant donné sa position par rapport au résidu Glu166 impliqué dans le mécanisme catalytique ; c'est aussi la mutation la plus répandue sur le résidu 104 chez TEM-1, important dans le développement des TEM ESBL (64,80,81). Enfin, une mutation au résidu 240 (E240K) octroie une meilleure efficacité contre les céphalosporines de 3^{ème} génération chez TEM-1 (82).

3.4 Résultats

3.4.1 Cinétique enzymatique

Comparativement à l'enzyme native, les mutants ESBL présentent un profil d'hydrolyse des βlactames similaire, dont les paramètres cinétiques sont présentés dans le Tableau 3.1. En présence des mutations D240K, G238S et S104K, BlaC reste toujours active contre la BZ, mais perd un ordre de grandeur en termes d'efficacité catalytique. Ceci s'explique par une perte d'affinité contre ce substrat pour D240K (112 μM), ou encore une perte d'activité catalytique pour S104K (77 min⁻¹). Ensuite, la mutation D240K n'apporte pas de gain d'efficacité contre le CF (céphalosporine de 1^{ère} génération), malgré une meilleure affinité (53 μM), contrebalancée par une perte d'activité catalytique (223 min⁻¹). La même observation est faite chez G238S.

Lorsqu'on regarde chez son homologue TEM-1, il semble aussi y avoir chez cette enzyme la perte d'un ordre de grandeur contre les pénicillines pour ses dérivés ESBL (78,83,84). BlaC semble donc se comporter comme son homologue quant à son activité pénicillinase en présence d'une mutation ESBL.

Malgré le nombre de β -lactamases de classe A recensées, peu de données cinétiques sont retrouvées dans la littérature pour chacune des variantes avec plusieurs substrats. Cependant, chez TEM-43, un équivalent du mutant S104K de BlaC, il a été démontré que l'enzyme possédait un profil ESBL malgré une moins bonne efficacité relative contre les pénicillines et céphalosporines de premières et de dernière génération (85). Toutefois, une meilleure affinité avec la céphaloridrine et le céfotaxime a été démontrée chez les variants de TEM-1 comparativement à l'enzyme d'origine. C'est la caractéristique des mutations ESBL. L'enzyme nouvellement créée est capable de mieux reconnaitre dans son site actif les substrats de dernière génération et donc de les hydrolyser. Toutefois, contrairement à nos mutants, l'activité contre la FOX n'était pas mesurable, démontrant l'impact négatif des mutations sur la catalyse des β -lactamases. La mutation S104K se retrouve par ailleurs de nombreuses fois chez TEM-1, mais de façon combinée avec d'autres mutations (21).

Ensuite, pour la FOX, une céphalosporine de seconde génération, BlaC-D240K possède une affinité semblable à l'enzyme native, mais une activité catalytique multipliée par 6. De ce fait, la mutation D240K fait gagner un ordre de grandeur pour l'hydrolyse de la FOX et semblerait donc apporter un avantage évolutif à BlaC. Cependant, le mutant S104K possède un profil ESBL moins marqué que D240K et G238S. Celui-ci perd de l'affinité contre le CF (typique des IR),

60
mais ne gagne pas en activité catalytique (contrairement aux IR). De plus, ce mutant n'a pas été en mesure de conférer une activité contre la FOX. Cette mutation serait donc peu encline à apparaître chez BlaC.

Les études mutationnelles précédemment réalisées sur le résidu 240 se concentrent essentiellement sur les céphalosporines de dernière génération. Ce résidu, dont l'influence mutationnelle est plus marquée lorsque combinée avec G238S, permet une meilleure hydrolyse de plusieurs substrats. Certaines hypothèses avancent un effet stabilisateur de D240K pour l'hydrolyse des céphalosporines (21). Pour la céftazidime, l'enzyme gagne trois ordres de grandeur chez TEM-1 en présence de cette double mutation, contre un seul lorsque la mutation E240K est présente seule (78,83,84). Il a été suggéré que le changement E240K engendrerait un meilleur positionnement des β -lactames (86) qui, couplé à la mutation G238S (agrandissant le site actif) favoriserait l'hydrolyse de substrats plus complexes. Cette mutation est aussi retrouvée de nombreuses fois chez les dérivés ESBL de l'homologue SHV-1 (33).

La substitution G238S réduit globalement le spectre d'hydrolyse de BlaC. L'effet le plus marguant étant avec la FOX, où l'enzyme gagne deux ordres de grandeur dans son efficacité catalytique avec la mutation D240K (10⁴ contre 10⁶), couplé à une perte d'activité avec G238S. Cependant, chez TEM-1, une sérine en position 238 amène à une haute résistance contre les céphalosporines de dernières générations (ceftazidime, céfotaxime) (78,84,87). De plus, couplée à la mutation D240K (plus stabilisante), un effet synergique est visible pour ces substrats, comme décrit précédemment. Cette synergie a aussi été montrée chez l'homologue SHV-1 pour la céphalothine, le céfotaxime et la ceftazidime (88). Chez TEM-1, il a été montré par cristallographie que cette mutation engendre un élargissement de la cavité du site actif par un repositionnement du résidu 240 (76) et des encombrements stériques (75,89,90). Ceci est surtout observable chez BlaC, qui est une enzyme ESBL à l'état natif. Chez SHV, le même effet a été observé avec une autre chaîne latérale courte (G238A) (33,91,92). Dans le cas du CF, l'enzyme mutée en G238S conserve son activité native, mais son activité catalytique fait défaut, contrairement à D240K. Chez son homologue SHV, cette mutation permet une meilleure affinité de l'enzyme envers ce substrat (88). BlaC n'aurait donc pas grand avantage évolutif à subir cette mutation.

61

Substrat	Enzyme	κ _m (μΜ)	k _{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ min ⁻¹)
BZ	WT	33±3	380±106	11,5±0,1.10 ⁷
	D240K	112±5	585±15	5,2±0,4.10 ⁶
	G238S	7±2	58±10	8,7±0,7.10 ⁶
	S104K	29±1	77±5	2,5±0,2.10 ⁶
CF	WT	214±28	1073±116	5,0±0,11.10 ⁶
	D240K	53±16	223±60	4,2±0,2.10 ⁶
	G238S	46±17	54±7	1,3±0,4.10 ⁶
	S104K	436±111	99±18	2,3±0,3.10 ⁵
FOX	WT	246±28	153±20	6,2±0,09.10 ⁵
	D240K	206±53	715±149	3,5 ⁶ ±0,3.10 ⁶
	G238S	NM	NM	1,7x1±0,5.10 ⁴
	S104K	NM	NM	NM

Tableau 3.1 : Paramètres cinétiques des mutants ESBL de BlaC contre BZ, CF et FOX.

Finalement, à la lumière des résultats obtenus pour le mutant D240K, un essai d'inhibition par le clavulanate a été fait. En présence de clavulanate, une mutation ESBL devrait hypothétiquement conférer un profil de sensibilité à l'inhibiteur semblable à celui de l'enzyme native, ces mutations n'étant pas spécifiquement dirigées pour contrer le mécanisme d'inhibition. Ainsi, le mutant D240K possède une sensibilité moindre à l'inhibiteur par rapport à l'enzyme native ($k_{inac}/K_i = 4,27 \times 10^6$ pour D240K contre 2x10⁷ pour WT). Cette perte d'un ordre de grandeur du k_{inac}/K_i s'explique principalement par une baisse du k_{inac} , le K_i (0.7 µM) étant plus proche de l'enzyme native (0.4 µM). Ce résultat rappelle ceux du mutant C69L (Chapitre 2), où l'enzyme mutée possède un profil d'hydrolyse proche de BlaC native avec une légère résistance au clavulanate engendrée par la mutation.

3.4.2 Dichroïsme circulaire

Même si les effets des mutations ESBL ne sont pas totalement semblables à ceux retrouvés chez TEM-1, les résultats des expériences de dichroïsme circulaire semblent confirmer l'identité de structure des différents variants. Tel que montré sur la Figure 3.3, les structures secondaires de BlaC sont peu affectées par les mutations introduites. Ceci confirme la conservation du repliement global de l'enzyme, présentant toujours un profil caractéristique d'une enzyme majoritairement composée d'hélices α [ANNEXE 2.4], avec des spectres de très bonne qualité. Ceci corrèle avec les résultats de cinétique enzymatique, qui montrent des variants mutationnels toujours actifs contre les substrats testés (Tableau 3.1).



Figure 3.3 : Dichroïsme circulaire des mutants ESBL de BlaC.

BlaC native est en rouge, BlaC-D240K est en pointillé vert, BlaC-S104K en noir et BlaC-G238S est en pointillé bleu.

Des mutations au sein d'une protéine peuvent altérer son activité et sa stabilité. Des expériences de dénaturation thermique ont été entreprises afin d'en savoir plus sur les modifications subis par l'enzyme au niveau de sa résistance à la chaleur et de ses structures secondaires (Tableau 3.2). Ces expériences, basées sur le signal CD de la protéine à une longueur d'onde précise, permettent de mesurer l'impact thermodynamique d'une mutation. Dans le cas présent, la mesure s'est faite aux alentours de 208 et 222 nm. Ces longueurs d'ondes correspondent aux pics les plus intenses retrouvés dans le signal CD de BlaC. Ce signal, en forme de double vague, est caractéristique des enzymes majoritairement composées

d'hélices a (93). Dans le cas de BlaC, les résultats sont très tranchés entre les différentes mutations ESBL. Lorsque la mutation G238S est présente, l'enzyme est fortement déstabilisée, montrant une température de dénaturation de plus de six degrés Celsius inférieure par rapport à l'enzyme native (T_m = 43,9°C pour G238S contre 50,2°C pour WT, Tableau 3.2). Cette même tendance est observée avec le mutant S104K (-6,7°C), ce qui pourrait expliquer le profil d'hydrolyse altéré de S104K. A contrario, l'enzyme est remarquablement stabilisée par la mutation D240K, montrant un gain de cinq degrés au niveau du T_m (55,5°C). De manière générale, l'enzyme conserve sa structure tridimensionnelle, attestant donc d'une perte de stabilité des mutants d'intérêt. Peu d'études de dichroïsme circulaire ont été réalisées sur les βlactamases, et plus spécifiquement sur les ESBL. Cependant, BlaC possède un Tm très proche de celui de TEM-1 (74,94,95) (T_m = 50,2°C). De plus, le phénomène de compensation entre les deux mutations ESBL D240K et G238S (75) est retrouvé chez TEM-1 (86), avec une augmentation du spectre d'hydrolyse de l'enzyme (céphalosporines de troisième génération). Une fois l'enzyme dénaturée, des expériences de renaturation en dichroïsme circulaire ont montré la non-réversibilité chez BlaC d'une dénaturation thermique (perte totale du signal). Or, chez son homologue TEM-1 non ESBL, plus de 95% du signal est retrouvé : la dénaturation est réversible (95,96).

	<i>Tm</i> (°C)	∆ <i>Tm</i> (°C)
BlaC	50,2±0,8	0
BlaC-G238S	43,9±0,3	-6,3
BlaC-D240K	55,5±0,2	+5,3
BlaC-S104K	43,3±0,7	-6,7

Tableau 3.2 : Paramètres de la dénaturation thermique des mutants ESBL de BlaC.

3.5 Conclusion

Cette seconde partie de l'étude visait à évaluer la possible extension du spectre d'hydrolyse de BlaC lors d'une plus grande exposition à des antibiotiques β-lactames de troisième et de quatrième génération, comme cela fut démontré depuis la fin des années 1980 chez ses homologues de classe A. Ses homologues ont, au fil du temps, acquis des mutations au sein de leur gène *bla* spécifiquement dirigées contre les nouveaux substrats introduits sur le marché, plus complexes que les pénicillines historiques. Le choix des mutations étudiées pour ce profil a été guidé par la fréquence d'apparition clinique et l'impact de ces substitutions sur le spectre d'hydrolyse des homologues TEM-1 et SHV-1, dont le nombre de dérivés dépasse actuellement la centaine (référence vers la table Lahey, (33)).

Les résultats obtenus chez BlaC ne sont pas aussi marqués que ceux rapportés chez ses homologues. Il faut rappeler la caractéristique intrinsèque de BlaC :c'est-à-dire son optimisation native pour l'hydrolyse de β-lactames complexes. L'enzyme étant déjà efficace contre ces molécules, il était probable donc que l'enzyme ne soit pas aussi gagnante que ses consœurs lors de mutations de types ESBL au sein de son gène.

Ces résultats suggèrent alors qu'une adaptation propre de l'enzyme apparaitra uniquement si un réel intérêt pour l'usage des β-lactames contre TB est relancé et ce, avec des substrats mal hydrolysés par l'enzyme, la forçant donc à évoluer de manière plus complexe.

Prédiction expérimentale de mutants résistants aux inhibiteurs chez la β-lactamase BlaC de Mycobacterium tuberculosis

CHAPITRE 4

CHAPITRE 4 SURVIE CELLULAIRE - RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Les études in vitro réalisées avec BlaC nécessitaient une construction tronquée de la protéine afin de faciliter sa purification, permettant sa production en grosse quantité et sous forme soluble chez E. coli (47). Les premières tentatives d'expression de la protéine entière reportées dans la littérature ont en effet échoué (47). Ces problèmes d'expression semblent provenir du système d'expression et/ou du repliement de BlaC faisant intervenir sa séquence de localisation périplasmique. Cette séquence, de 42 acides aminés, située à l'extrémité N-terminale de la protéine, semble permettre la translocation de BlaC vers le périplasme et son attachement à la membrane plasmique bactérienne. Plusieurs autres β-lactamases ont été identifiées comme étant attachées à la surface de la membrane (97) chez d'autres bactéries Gram positive, sous forme active, et sont considérées comme des lipoprotéines (98,99). Il n'est pas encore exactement connu comment BlaC se comporte in vivo chez TB, mais ce peptide signal, composé de résidus hydrophobes, semblerait servir d'ancrage à la bicouche phospholipidique. Dans notre étude, l'enzyme a été purifiée avec succès et en grande quantité sous forme tronquée à l'aide d'une étiquette histidine, tel que décrit dans la littérature (47).

Les études de survie cellulaire corrélant souvent avec les résultats de cinétique, plusieurs essai d'expression de BlaC chez *E. coli* ont été effectués afin d'étudier son comportement en milieu cellulaire. Le peptide signal natif de BlaC a été fusionné à la séquence de la protéine mature dans le vecteur pJexpress411, appartenant au système Tat, présent aussi chez *E. coli* (100). La séquence du peptide signal est montrée dans la Figure 4.1A.

68

A MRNRGFGRRELLVAMAMLVSVTGCARHASGARPASTTLPAGA B MAKKTAIAIAVALAGFATVAQA

Figure 4.1: Séquences protéiques des peptides signaux utilisés lors des essais de survie cellulaire.

(A) Séquence du peptide signal natif de BlaC. (B) Séquence de OmpA. En (B), une alanine (en vert) fut rajoutée pour conserver le cadre de lecture.

Concrètement, après avoir déterminé le nombre de CFU initial de nos cultures, 100 μ l de milieu LB stérile était inoculé avec 1×10⁵ CFU/ml de bactéries. Ce milieu LB possédait une concentration d'antibiotique diluée en série par un facteur 2. Les mesures furent reproduites avec des cultures indépendantes, après 24h d'incubation à 37°C, sous agitation et atmosphère hermétique afin d'éviter l'évaporation (83). Ainsi, la première concentration pour laquelle la croissance était inhibée déterminait la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cependant, aucune croissance bactérienne ne fut observée malgré la présence de BlaC, observant un niveau identique au contrôle négatif (souche *E. coli* BL21 (DE3) vide, CMI de 16 μ g/ml pour la BZ). Dans ce cas-ci, le contrôle positif était l'expression de TEM-1 fusionnée à OmpA dans un vecteur pET28 (CMI de 2 mg/ml pour la BZ).

Ces tentatives d'expression ayant échoué, une alternative choisie était de remplacer ce peptide signal natif par une séquence connue permettant de faciliter l'exportation des protéines dans le périplasme chez *E. coli*, OmpA (101). La séquence d'OmpA et la construction utilisée sont montrées dans la Figure 4.1 B.

Ces expériences ont permis de confirmer les négatifs utilisés, mais aussi que BlaC n'était pas fonctionnelle chez *E. coli*, dans le système proposé ici, tant avec son peptide signal natif qu'avec OmpA.

Ces résultats négatifs ont été confirmés par une tentative très récente d'expression de l'enzyme chez *E. coli* (102). Les auteurs ont utilisé un peptide d'export de la

69

trimethylamine N-oxide reductase (ssTorA). Ce peptide signal avait été précédemment utilisé avec succès chez TEM-1 (103). Ainsi, ssTorA-Bla a permis l'obtention d'une CMI de 25 µg/ml pour l'AMP chez *E. coli*. Enfin, les auteurs ont confirmé que la séquence signal (et donc l'export de la protéine dans le périplasme) était nécessaire pour mener à une résistance aux antibiotiques dans le cas de BlaC. Prédiction expérimentale de mutants résistants aux inhibiteurs chez la β-lactamase BlaC de *Mycobacterium tuberculosis*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Même si l'humain a depuis toujours observé des effets anti-infectieux ou curatifs de certaines substances, il a fallu attendre le travail de scientifiques pour comprendre le lien entre ces substances et les maladies qu'elles soignaient. C'est ainsi que la tuberculose, l'une des plus grandes maladies du siècle, fut presque éradiquée dans le monde occidental en quelques années seulement, laissant croire à une élimination totale de cette maladie autrefois mortelle.

Cependant, comme avec de nombreuses autres maladies infectieuses, des cas de résistances bactériennes aux traitements antibiotiques sont apparus. Dans le cas de TB, l'apparition de cas d'extrême résistance parfois couplés à une infection au VIH ont mis en lumière les échecs successifs des scientifiques face aux bactéries. Une meilleure compréhension de ces phénomènes de résistance est nécessaire et apportera des informations pertinentes pour le design de nouveaux antibiotiques. Dans le cadre de cette étude, la résistance s'accomplie par l'acquisition de mutations au sein des gènes codant pour les β-lactamases. Par conséquent, il a été proposé de vérifier si BlaC, comme il a été remarqué chez ses homologues de classe A, pouvait acquérir des mutations au sein de son gène, lui permettant ainsi de contrer la grande efficacité d'une nouvelle combinaison clinique « β-lactame/inhibiteur de β-lactamases ». Avec l'adaptation constante des bactéries aux pressions évolutives, un échec clinique de cette nouvelle combinaison sera certainement constaté à moyen terme. Il était ainsi crucial de cibler des résidus impliqués à la fois dans la reconnaissance et la discrimination des substrats, dans la catalyse enzymatique et dans l'apparition de mécanismes d'inhibition.

Dans un premier temps, nous avons fait l'étude de résidus impliqués dans le phénomène d'inhibition irréversible de BlaC par le clavulanate. Plus précisément, les mutants C69L, S130G, R220S et K234R, retrouvés en grand nombre parmi les homologues IR de BlaC, coordonnent des molécules d'eau nécessaires à l'inactivation de BlaC ou perturbent l'environnement de l'inhibiteur qui doit adopter une conformation différente au sein du site actif, empêchant ainsi l'inhibition chez les autres β-lactamases de classe A. Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré que BlaC gagnerait à se comporter comme ses homologues en adoptant ces mutations précises afin de déjouer directement le mécanisme d'inhibition par le clavulanate.

Des paramètres cinétiques précis ont été obtenus pour mieux apprécier l'effet de chacune des mutations sur l'activité de l'enzyme, mais surtout sa sensibilité au clavulanate. Le mutant C69L conserve un profil d'hydrolyse et d'inhibition semblable à l'enzyme native. À l'inverse, les autres mutants ont perdu beaucoup de leur affinité pour les substrats classiques de BlaC (et donc leur efficacité catalytique). Les études d'inhibition réalisées dans ce projet (voir ANNEXE II.d) ont permis de quantifier cette résistance attribuable à une mutation unique au sein du site actif de l'enzyme. Ainsi, l'efficacité catalytique de l'inhibiteur se trouve fortement compromise (perte de plusieurs ordres de grandeur), attestant la validité de notre hypothèse.

Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur l'apparition des phénotypes de types ESBL par l'intermédiaire de plusieurs substitutions de résidus au sein du site actif de BlaC. Si un effet bénéfique a été observé contre certains substrats (céfoxitine, céphalothine), une mutation au sein du site actif de BlaC perturbe grandement la stabilité et l'activité de l'enzyme. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils démontrent que le site actif de BlaC, déjà optimisé pour l'hydrolyse de substrats complexes (section 3.2), devra évoluer alternativement pour conserver son efficacité.

Bien que nos résultats confirment l'importance pour le monde de la recherche de travailler dès maintenant à une meilleure compréhension du phénomène de résistance aux antibiotiques afin de mieux le contrer, plusieurs recherches en aval de ce projet pourraient apporter de nouveaux éléments de réponses aux questions posées. Afin de mieux comprendre le rôle joué par ces résidus clés sur l'échec d'une combinaison antibiotique « miracle », une approche plus structurelle par la résolution par rayons X de la structure cristalline des mutants (en présence de ligands) serait une priorité. Ces structures nous éclaireraient sur les liaisons mises en jeu ou rompues lors d'une mutation. Par la suite, la création d'une librairie combinatoire in silico permettrait d'élargir notre approche en suggérant des résidus non répertoriés dans la littérature qui pourraient jouer un rôle important dans la discrimination ou la reconnaissance des substrats. De plus, l'aspect combinatoire de cette librairie permettrait de détecter des effets additifs ou synergiques entre plusieurs mutations dans un but évolutif précis (dans ce cas-ci, la résistance aux inhibiteurs ou aux β-lactames). Les résultats obtenus serviraient alors à la création de mutants répondants à des critères précis, afin de maximiser la réussite d'études plus approfondies sur l'évolution moléculaire de BlaC. Enfin, l'utilisation d'une souche proche de TB comme Mycobacterium smegmatis pourrait remédier aux difficultés rencontrées dans l'expression in vivo de BlaC native et ses mutants chez E. coli. Les informations obtenues

serviront alors à compléter les résultats de cinétiques et à faire une évaluation rapide de nouveaux mutants tous susceptibles d'être influencés par des facteurs expérimentaux hors de notre contrôle (comme un mécanisme de résistance aux antibiotiques secondaire, section 1.2.2).

Aujourd'hui encore, la résistance aux antibiotiques est une question en perpétuelle recherche de réponses. En effet, le rapport de force installé entre les bactéries et l'être humain au XX^{ème} siècle – qui était à notre avantage – tend à se rééquilibrer en faveur des bactéries. En plus des difficultés croissantes auxquelles doivent faire face les nouveaux antibiotiques synthétisés (de plus en complexes), d'autres approches indépendantes devraient être utilisées pour ne pas revenir à une situation semblable à l'ère pré-médecine moderne. Parmi ces approches, une meilleure gestion de la prescription d'antibiotiques par les médecins, un meilleur suivi des patients ou encore une meilleure éducation de la population quant à la prise de ces médicaments vont permettront d'améliorer la réussite à long terme des nouveaux antibiotiques et freiner la réaction bactérienne à cette pression évolutive.

RÉFÉRENCES

- 1. Dye, C., and Williams, B. G. (2010) The Population Dynamics and Control of Tuberculosis. *Science* **328**, 856-861
- 2. O.M.S. (2003) Le traitement de la tuberculose: principes à l'intention des programmes nationaux.
- Holloway, K. L., Henneberg, R. J., de Barros Lopes, M., and Henneberg, M. (2011) Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 62, 402-458
- 4. O.M.S. Journée mondiale de la tuberculose.
- 5. Fleming, A. (2001) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. *Bull World Health Organ* **79**, 780-790
- 6. Flores, A. R., Parsons, L. M., and Pavelka, M. S., Jr. (2005) Genetic analysis of the beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**, 521-532
- 7. Dauby, N., Muylle, I., Mouchet, F., Sergysels, R., and Payen, M.-C. (2011) Meropenem/Clavulanate and Linezolid Treatment for Extensively Drug-resistant Tuberculosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **30**, 812-813
- Hugonnet, J. E., Tremblay, L. W., Boshoff, H. I., Barry, C. E., and Blanchard, J. S. (2009) Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Science* 323, 1215-1218
- 9. Kurz, S. G., and Bonomo, R. A. (2012) Reappraising the use of β-lactams to treat tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**, 999-1006
- 10. Gonzalo, X., and Drobniewski, F. (2013) Is there a place for β-lactams in the treatment of multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis? Synergy between meropenem and amoxicillin/clavulanate. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 366-369
- 11. Interview de Jean-Emmanuel Hugonnet, c. à. l. l. Interview de Jean-Emmanuel Hugonnet, chercheur à l'INSERM.
- 12. Payen, M. C., De Wit, S., Martin, C., Sergysels, R., Muylle, I., Van Laethem, Y., and Clumeck, N. (2012) Clinical use of the meropenem-clavulanate combination for extensively drug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **16**, 558-560
- 13. Wong, E. B., Cohen, K. A., and Bishai, W. R. (2013) Rising to the challenge: new therapies for tuberculosis. *Trends in Microbiology* **21**, 493-501

- 14. Hawgood, B. J. (2007) Albert Calmette (1863–1933) and Camille Guérin (1872– 1961): the C and G of BCG vaccine. *J Med Biogr* **15**, 139-146
- England, K., Boshoff, H. I. M., Arora, K., Weiner, D., Dayao, E., Schimel, D., Via, L. E., and Barry, C. E. (2012) Meropenem-Clavulanic Acid Shows Activity against Mycobacterium tuberculosis In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3384-3387
- 16. Veziris, N., Truffot, C., Mainardi, J.-L., and Jarlier, V. (2011) Activity of Carbapenems Combined with Clavulanate against Murine Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2597-2600
- Ambler, R. P., and Scott, G. K. (1978) Partial amino acid sequence of penicillinase coded by Escherichia coli plasmid R6K. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3732-3736
- 18. Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., and Andries, K. (2011) The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **469**, 483-490
- Velayati, A. A., Masjedi, M. R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., Ziazarifi, A. H., and Hoffner, S. E. (2009) Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest* 136, 420-425
- Vincent, V., Rigouts, L., Nduwamahoro, E., Holmes, B., Cunningham, J., Guillerm, M., Nathanson, C. M., Moussy, F., De Jong, B., Portaels, F., and Ramsay, A. (2012) The TDR Tuberculosis Strain Bank: a resource for basic science, tool development and diagnostic services. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 16, 24-31
- Salverda, M. L. M., De Visser, J. A. G. M., and Barlow, M. (2010) Natural evolution of TEM-1 β-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1015-1036
- 22. Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010) Three Decades of β-Lactamase Inhibitors. 23, 160-201
- Andreotti, D., Biondi, S., Di Modugno, E., and Abraham, D. J. (2003) β-Lactam Antibiotics. in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc. pp
- 24. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., and Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 234-258
- 25. Poole, K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 12-26
- 26. Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 361-385
- 27. Laible, G., Spratt, B. G., and Hakenbeck, R. (1991) Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. *Mol. Microbiol.* **5**, 1993-2002

- 28. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **35**, 322-332
- 29. Bauernfeind, A., and Hörl, G. (1987) Novel R-factor borne beta-lactamase of Escherichia coli confering resistance to cephalosporins. *Infection* **15**, 257-259
- 30. Abraham, E. P., and Chain, E. (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 677-678
- 31. Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., and Waley, S. G. (1991) A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* **276**, 269-270
- 32. Helfand, M. S., and Bonomo, R. A. (2003) Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**, 9-23
- 33. Lahey, C. ß-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.
- 34. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M., and Bonomo, R. A. (2007) THE CONTINUING CHALLENGE OF ESBLS. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 459-469
- 35. Abate, G., and Hoffner, S. E. (1997) Synergistic antimycobacterial activity between ethambutol and the beta-lactam drug cefepime. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 119-122
- 36. Wynd, M. A., and Paladino, J. A. Cefepime : A fourth-generation parenteral cephalosporin. *The Annals of pharmacotherapy* **30**, 1414-1424
- Rodríguez-Martínez, J. M., Fernández-Echauri, P., Fernández-Cuenca, F., Alba, P. D. d., Briales, A., and Pascual, A. (2012) Genetic characterization of an extended-spectrum AmpC cephalosporinase with hydrolysing activity against fourth-generation cephalosporins in a clinical isolate of Enterobacter aerogenes selected in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 64-68
- Sirot, D., Recule, C., Chaibi, E. B., Bret, L., Croize, J., Chanal-Claris, C., Labia, R., and Sirot, J. (1997) A complex mutant of TEM-1 beta-lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an Escherichia coli clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1322-1325
- 39. Poirel, L., Mammeri, H., and Nordmann, P. (2004) TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type beta-lactamase from Enterobacter aerogenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4528-4531
- Neuwirth, C., Madec, S., Siebor, E., Pechinot, A., Duez, J.-M., Pruneaux, M., Fouchereau-Peron, M., Kazmierczak, A., and Labia, R. (2001) TEM-89 β-Lactamase Produced by a Proteus mirabilis Clinical Isolate: New Complex Mutant (CMT 3) with Mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3591-3594

- 41. Robin, F., Delmas, J., Brebion, A., Dubois, D., Constantin, J.-M., and Bonnet, R. (2007) TEM-158 (CMT-9), a New Member of the CMT-Type Extended-Spectrum ?-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 4181-4183
- 42. Weber, D. J., Tolkoff-Rubin, N. E., and Rubin, R. H. (1984) Amoxicillin and Potassium Clavulanate: An Antibiotic Combination Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Antimicrobial Spectrum, Clinical Efficacy and Adverse Effects. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **4**, 122-133
- Bradford, P. A. (2001) Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 933-951
- 44. Reading, C., and Cole, M. (1977) Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from Streptomyces clavuligerus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 852-857
- 45. Hugonnet, J.-E., and Blanchard, J. S. (2007) Irreversible inhibition of the Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase by clavulanate. *Biochemistry* **46**, 11998-12004
- 46. Chambers, H. F., Moreau, D., Yajko, D., Miick, C., Wagner, C., Hackbarth, C., Kocagoz, S., Rosenberg, E., Hadley, W. K., and Nikaido, H. (1995) Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2620-2624
- Wang, F., Cassidy, C., and Sacchettini, J. C. (2006) Crystal structure and activity studies of the Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase reveal its critical role in resistance to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2762-2771
- 48. Hackbarth, C. J., Unsal, I., and Chambers, H. F. (1997) Cloning and sequence analysis of a class A beta-lactamase from Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1182-1185
- Barthélémy, M., Peduzzi, J., and Labia, R. (1985) Distinction entre les structures primaires des β-lactamases TEM-1 et TEM-2. Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie 136, 311-321
- 50. Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211-1233
- 51. Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Taly, J.-F., and Notredame, C. (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* **39**, W13-17
- 52. Tremblay, L. W., Hugonnet, J.-E., and Blanchard, J. S. (2008) Structure of the covalent adduct formed between Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase and clavulanate. *Biochemistry* **47**, 5312-5316

- 53. Wolfenden, R., and Snider, M. J. (2001) The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Acc. Chem. Res.* **34**, 938-945
- 54. Donald Voet, J.-G. V. G. R. e. L. D. (2005) *Biochimie*, De Boeck
- 55. Chow, C., Xu, H., and Blanchard, J. S. (2013) Kinetic Characterization of Nitrocefin, Cefoxitin, and Meropenem Hydrolysis by the β-lactamase from Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*
- 56. Chambers, H. F., Kocagöz, T., Sipit, T., Turner, J., and Hopewell, P. C. (1998) Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 874-877
- 57. Thomas, V. L., Golemi-Kotra, D., Kim, C., Vakulenko, S. B., Mobashery, S., and Shoichet, B. K. (2005) Structural Consequences of the Inhibitor-Resistant Ser130Gly Substitution in TEM β-Lactamase. *Biochemistry* **44**, 9330-9338
- Chaibi, E. B., Péduzzi, J., Farzaneh, S., Barthélémy, M., Sirot, D., and Labia, R. (1998) Clinical inhibitor-resistant mutants of the β-lactamase TEM-1 at amino-acid position 69: Kinetic analysis and molecular modelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology* **1382**, 38-46
- Meroueh, S. O., Roblin, P., Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S. B., Zhang, Y., Samama, J.-P., and Mobashery, S. (2002) Molecular Dynamics at the Root of Expansion of Function in the M69L Inhibitor-Resistant TEM β-Lactamase from Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9422-9430
- 60. Helfand, M. S., Hujer, A. M., Sonnichsen, F. D., and Bonomo, R. A. (2002) Unexpected advanced generation cephalosporinase activity of the Met69Phe variant of SHV beta-lactamase. *J. Biol. Chem.*
- 61. Wang, X., Minasov, G., and Shoichet, B. K. (2002) The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant beta-lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *The Journal of biological chemistry* **277**, 32149-32156
- Lenfant, F., Petit, A., Labia, R., Maveyraud, L., Samama, J. P., and Masson, J. M. (1993) Site-directed mutagenesis of beta-lactamase TEM-1. Investigating the potential role of specific residues on the activity of Pseudomonas-specific enzymes. *Eur. J. Biochem.* 217, 939-946
- 63. Delaire, M., Labia, R., Samama, J. P., and Masson, J. M. (1992) Site-directed mutagenesis at the active site of Escherichia coli TEM-1 beta-lactamase. Suicide inhibitor-resistant mutants reveal the role of arginine 244 and methionine 69 in catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 20600-20606
- Bouthors, A. T., Delettré, J., Mugnier, P., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (1999) Site-directed mutagenesis of residues 164, 170, 171, 179, 220, 237 and 242 in PER-1 beta-lactamase hydrolysing expanded-spectrum cephalosporins. *Protein Eng.* 12, 313-318
- 65. Zhu, K., Lu, J., Liang, Z., Kong, X., Ye, F., Jin, L., Geng, H., Chen, Y., Zheng, M., Jiang, H., Li, J.-Q., and Luo, C. (2013) A quantum mechanics/molecular

mechanics study on the hydrolysis mechanism of New Delhi metallo-βlactamase-1. *J Comput Aided Mol Des* **27**, 247-256

- 66. Meroueh, S. O., Fisher, J. F., Schlegel, H. B., and Mobashery, S. (2005) Ab initio QM/MM study of class A beta-lactamase acylation: dual participation of Glu166 and Lys73 in a concerted base promotion of Ser70. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15397-15407
- 67. Fisette, O., Morin, S., Savard, P.-Y., Lagüe, P., and Gagné, S. M. (2010) TEM-1 backbone dynamics-insights from combined molecular dynamics and nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* **98**, 637-645
- 68. Fisette, O., Gagné, S., and Lagüe, P. (2012) Molecular dynamics of class A βlactamases-effects of substrate binding. *Biophys. J.* **103**, 1790-1801
- 69. Giampaolo, A. D., Mazza, F., Daidone, I., Amicosante, G., Perilli, M., and Aschi, M. On the structural affinity of macromolecules with different biological properties: Molecular dynamics simulations of a series of TEM-1 mutants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*
- 70. Banerjee, S., Pieper, U., Kapadia, G., Pannell, L. K., and Herzberg, O. (1998) Role of the omega-loop in the activity, substrate specificity, and structure of class A beta-lactamase. *Biochemistry* **37**, 3286-3296
- 71. Bös, F., and Pleiss, J. (2008) Conserved water molecules stabilize the Omegaloop in class A beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1072-1079
- 72. Yi, H., Cho, K.-H., Cho, Y. S., Kim, K., Nierman, W. C., and Kim, H. S. (2012) Twelve Positions in a β-Lactamase That Can Expand Its Substrate Spectrum with a Single Amino Acid Substitution. *PLoS ONE* 7
- 73. Yi, H., Kim, K., Cho, K.-H., Jung, O., and Kim, H. S. (2012) Substrate Spectrum Extension of PenA in Burkholderia thailandensis with a Single Amino Acid Deletion, Glu168del. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4005-4008
- Kather, I., Jakob, R. P., Dobbek, H., and Schmid, F. X. (2008) Increased Folding Stability of TEM-1 β-Lactamase by In Vitro Selection. *Journal of Molecular Biology* 383, 238-251
- 75. Wang, X., Minasov, G., and Shoichet, B. K. (2002) Evolution of an Antibiotic Resistance Enzyme Constrained by Stability and Activity Trade-offs. *Journal of Molecular Biology* **320**, 85-95
- Orencia, M. C., Yoon, J. S., Ness, J. E., Stemmer, W. P. C., and Stevens, R. C. (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nature Structural & Molecular Biology* 8, 238-242
- Marciano, D. C., Pennington, J. M., Wang, X., Wang, J., Chen, Y., Thomas, V. L., Shoichet, B. K., and Palzkill, T. (2008) Genetic and structural characterization of an L201P global suppressor substitution in TEM-1 beta-lactamase. *Journal of Molecular Biology* 384, 151-164
- 78. Venkatachalam, K. V., Huang, W., LaRocco, M., and Palzkill, T. (1994) Characterization of TEM-1 beta-lactamase mutants from positions 238 to 241

with increased catalytic efficiency for ceftazidime. The Journal of Biological Chemistry 269, 23444-23450

- Petit, A., Maveyraud, L., Lenfant, F., Samama, J. P., Labia, R., and Masson, J. M. (1995) Multiple substitutions at position 104 of beta-lactamase TEM-1: assessing the role of this residue in substrate specificity. *Biochem. J.* 305 (Pt 1), 33-40
- 80. Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. (1991) More extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1697-1704
- Bethel, C. R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Thomson, J. M., Ruszczycky, M. W., Anderson, V. E., Pusztai-Carey, M., Taracila, M., Helfand, M. S., and Bonomo, R. A. (2006) Role of Asp104 in the SHV B-Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 4124-4131
- 82. Knox, J. R. (1995) Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type betalactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2593-2601
- 83. Cantu, C., 3rd, Huang, W., and Palzkill, T. (1996) Selection and characterization of amino acid substitutions at residues 237-240 of TEM-1 beta-lactamase with altered substrate specificity for aztreonam and ceftazidime. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 22538-22545
- 84. Huang, W., Le, Q. Q., LaRocco, M., and Palzkill, T. (1994) Effect of threonine-tomethionine substitution at position 265 on structure and function of TEM-1 betalactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2266-2269
- Yang, Y., Bhachech, N., Bradford, P. A., Jett, B. D., Sahm, D. F., and Bush, K. (1998) Ceftazidime-resistant Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli isolates producing TEM-10 and TEM-43 beta-lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1671-1676
- Raquet, X., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Goussard, S., Courvalin, P., and Frère, J. M. (1995) Stability of TEM β-lactamase mutants hydrolyzing third generation cephalosporins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 23, 63-72
- Giakkoupi, P., Tzelepi, E., Tassios, P. T., Legakis, N. J., and Tzouvelekis, L. S. (2000) Detrimental effect of the combination of R164S with G238S in TEM-1 β-lactamase on the extended-spectrum activity conferred by each single mutation. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 101-104
- Huletsky, A., Knox, J. R., and Levesque, R. C. (1993) Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type betalactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 3690-3697
- 89. Saves, I., Burlet-Schiltz, O., Maveyraud, L., Samama, J.-P., Prome, J.-C., and Masson, J.-M. (1995) Mass Spectral Kinetic Study of Acylation and Deacylation During the Hydrolysis of Penicillins and Cefotaxime by .beta.-Lactamase TEM-1 and the G238S Mutant. *Biochemistry* **34**, 11660-11667

- 90. Cantu, C., and Palzkill, T. (1998) The Role of Residue 238 of TEM-1 B-Lactamase in the Hydrolysis of Extended-Spectrum Antibiotics. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26603-26609
- 91. Yuan, M., Hall, L. M. C., Savelkoul, P. H. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., and Livermore, D. M. SHV-13, a novel extended-spectrum β-lactamase, in Klebsiella pneumoniae isolates from patients in an intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1081-1084
- Podbielski, A., Schönling, J., Melzer, B., Warnatz, K., and Leusch, H. G. (1991) Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type beta-lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon Klebsiella pneumoniae. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 569-578
- 93. Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119-139
- 94. Ehmann, D. E., Jahić, H., Ross, P. L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G. K., and Fisher, S. L. (2012) Avibactam is a covalent, reversible, non–β-lactam βlactamase inhibitor. *PNAS* **109**, 11663-11668
- 95. Wang, X., Minasov, G., and Shoichet, B. K. (2002) Noncovalent interaction energies in covalent complexes: TEM-1 β-lactamase and β-lactams. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 47, 86-96
- 96. Chen, Y., Delmas, J., Sirot, J., Shoichet, B., and Bonnet, R. (2005) Atomic Resolution Structures of CTX-M β-Lactamases: Extended Spectrum Activities from Increased Mobility and Decreased Stability. *Journal of Molecular Biology* 348, 349-362
- 97. Sutcliffe, I. C., and Russell, R. R. (1995) Lipoproteins of gram-positive bacteria. J Bacteriol **177**, 1123-1128
- 98. Bootsma, H. J., Dijk, H. v., Verhoef, J., Fleer, A., and Mooi, F. R. (1996) Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of Moraxella (Branhamella) catarrhalis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 966-972
- 99. Hutchings, M. I., Palmer, T., Harrington, D. J., and Sutcliffe, I. C. (2009) Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends in Microbiology* **17**, 13-21
- McDonough, J. A., Hacker, K. E., Flores, A. R., Pavelka, M. S., Jr., and Braunstein, M. (2005) The twin-arginine translocation pathway of Mycobacterium smegmatis is functional and required for the export of mycobacterial betalactamases. *J Bacteriol* 187, 7667-7679
- 101. Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of Escherichia coli.
- Feiler, C., Fisher, A. C., Boock, J. T., Marrichi, M. J., Wright, L., Schmidpeter, P. A., Blankenfeldt, W., Pavelka, M., and DeLisa, M. P. (2013) Directed evolution of Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase reveals gatekeeper residue that regulates antibiotic resistance and catalytic efficiency. *PLoS ONE* 8, e73123

- 103. Fisher, A. C., Kim, W., and DeLisa, M. P. (2006) Genetic selection for protein solubility enabled by the folding quality control feature of the twin-arginine translocation pathway. *Protein Sci.* **15**, 449-458
- 104. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792-1797
- Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E., and Ben-Tal, N. (2003) ConSurf: identification of functional regions in proteins by surfacemapping of phylogenetic information. *Bioinformatics* 19, 163-164
- 106. Cornish-Bowden, A., Jamin, M., and Saks, V. (2005) *Cinétique enzymatique*, EDP SCIENCES
- 107. Ambler, R. P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **289**, 321-331
- 108. Xie, H., Mire, J., Kong, Y., Chang, M., Hassounah, H. A., Thornton, C. N., Sacchettini, J. C., Cirillo, J. D., and Rao, J. (2012) Rapid point-of-care detection of the tuberculosis pathogen using a BlaC-specific fluorogenic probe. *Nature Chemistry*
- 109. Todd, M. J., and Gomez, J. (2001) Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? *Analytical Biochemistry* 296, 179-187
- 110. Storer, A. C., and Cornish-Bowden, A. (1974) The kinetics of coupled enzyme reactions. Applications to the assay of glucokinase, with glucose 6-phosphate dehydrogenase as coupling enzyme. *Biochem J* **141**, 205-209
- 111. Index, T. M. The Merck Index Online chemicals, drugs and biologicals.
- 112. Waley, S. G. (1974) A spectrophotometric assay of ?-lactamase action on penicillins (Short Communication). *Biochem J* **139**, 789-790
- 113. Michaelis, L., and Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkun. *Biochem* 49, 333-369
- 114. Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A., and Goody, R. S. (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50**, 8264-8269
- 115. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frère, J. M. (1998) Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* **330**, 581-598
- 116. Bisswanger, P. D. H. (2008) *Enzyme Kinetics: Principles and Methods, Second Edition*,
- 117. Krippendorff, B.-F., Neuhaus, R., Lienau, P., Reichel, A., and Huisinga, W. (2009) Mechanism-based Inhibition: Deriving KI and kinact directly from Time-Dependent IC50 Values - NUI Maynooth ePrints and eTheses Archive. *Journal of Biomedical Screening*

ANNEXE I CONSERVATION DES ACIDES AMINÉS AU COURS DE L'ÉVOLUTION ENTRE BLAC ET SES HOMOLOGUES



Figure I.1 : Conservation des acides aminés au sein des β-lactamases homologues à BlaC.

Un alignement multiple (104) de séquences protéiques comparées à celle de BlaC a été réalisé et visualisé avec le programme Consurf (105). Un pourcentage d'identité minimal de 35 % et maximal de 95 % pour les meilleures 100 entrées retrouvées a été paramétré. Les résidus fortement conservés du site actif sont en bâtons.

ANNEXE II BRÈVE INTRODUCTION SUR LES MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

II.a Cinétique enzymatique

L'action d'une enzyme *in vivo* est la finalité de toute étude sur une protéine dotée d'une activité catalytique. Cependant, cette activité est soumise à différents facteurs (pH, croissance bactérienne, profil d'expression protéique) pouvant fortement influencer son efficacité et donc, fausser l'interprétation des résultats. C'est pourquoi la caractérisation d'une enzyme passe inévitablement par la cinétique enzymatique (étude quantitative et non qualitative), qui pourrait être définie comme ceci (106) :

La cinétique enzymatique a pour objectif d'identifier et de décrire les mécanismes de réaction [des enzymes] en étudiant leur vitesse et les flux métaboliques. En partant des enzymes isolées et en allant vers des systèmes métaboliques organisés et intégrés, les méthodes de cinétique enzymatique permettent de décrire de manière quantitative les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes de leur régulation.

Dans le cas de BlaC, deux mécanismes ont été étudiés dans cette étude : l'hydrolyse des βlactames et l'inhibition irréversible de l'enzyme par le clavulanate.

II.b Hydrolyse des β-lactames

BlaC est une enzyme à sérine (107) catalysant la réaction d'hydrolyse des β-lactames. Il existe plusieurs méthodes pour étudier la cinétique d'une enzyme : spectrophotométrie (majoritairement utilisée), fluorimétrie (108), titrage calorimétrique isotherme (109) ou même de manière indirecte par couplage avec des réactions enzymatiques rapportrices (110).

Les β -lactames sont connus pour leur propriété d'absorption de la lumière UV (111). Or, quand ceux-ci sont hydrolysés par une β -lactamase (112), cette absorption tend à disparaitre en fonction du temps. Ainsi, une mesure par spectrophotométrie de la réaction peut se faire en déterminant une pente correspondant à la vitesse initiale de la réaction. Ces vitesses initiales

sont alors utilisées dans l'équation de Michaelis-Menten (113,114) afin de calculer les paramètres cinétiques des enzymes. On obtient alors une hyperbole michaelienne (vélocité initiale en fonction de la concentration du substrat) comme présenté en Figure II.2.



Figure II.2 : Courbe de Michaelis-Menten

La décroissance d'absorbance est mesurée pour différentes concentrations de substrats en présence d'une concentration d'enzyme unique. Les vitesses initiales (v_o) sont ensuite reportées sur un graphique en fonction de la concentration de substrat S. Les données sont ensuite soumises à la régression non-linéaire par rapport à l'équation de Michaelis-Menten. L'enzyme tend à une limite supérieure théorique correspondant à une vitesse maximale V_{max} lorsqu'elle est saturée ([S] >> K_m). La constante de Michaelis K_m équivaut à la concentration de substrat pour obtenir $V_{max}/2$.

La réaction de catalyse d'une β -lactamase se fait selon le modèle et l'équation (1) :

$$E + S \stackrel{k_1}{\leftarrow} E: S \stackrel{k_2}{\rightarrow} E - S \stackrel{k_3}{\rightarrow} E + P \tag{1}$$

Où E représente l'enzyme ;

S est la molécule de substrat ;

P est le produit de la réaction ;

E:S représente le complexe michaelien ;

E-S est l'acyle-enzyme

avec l'équation de Michaelis-Menten (2), où à l'état stationnaire :

$$v_{\rm o} = \frac{v_{\rm max}\,[s]}{\kappa_{\rm m} + [s]} \tag{2}$$

Où v_o est la vitesse initiale de la réaction ;

V_{max} est la vitesse maximale de réaction ;

K_m est la constante de Michaelis ;

[S] est la concentration du substrat ;

*k*₁ est la constante de vitesse de la réaction réversible menant à un complexe transitoire Enzyme-Substrat (E : S);

 k_2 est la constante de vitesse de la réaction à sens unique menant à un complexe covalent Enzyme-Substrat dit de Michaelis-Menten (E - S);

et k_3 la une constante de vitesse de la réaction où se produit la libération de l'enzyme, son retour à l'état natif et la libération du produit (E+P)

La vitesse (v_o) de la réaction est alors dépendante du substrat à l'état d'équilibre. La constante de vitesse k_{cat} sera calculée selon $V_{max} = k_{cat}$ [E], où [E] est la concentration totale d'enzyme présente. La constante catalytique k_{cat} représente le nombre de molécules de substrat hydrolysées par unité de temps pour un seul site de l'enzyme à saturation. Enfin, la constante de spécificité $\frac{kcat}{Km}$ sera déterminée selon la même méthode. Celle-ci permet de comparer l'efficacité catalytique de différentes enzymes entre elles et est limitée par la vitesse d'association du complexe michaelien (54). Les enzymes les plus efficaces (115) (dont des β lactamases) ont une constante de spécificité de l'ordre de 10⁸ M⁻¹ s⁻¹.

Les paramètres cinétiques K_m et k_{cat} ont été calculés par régression non-linéaire à l'aide du logiciel GraphPad Prism (San Diego, USA). La méthode de calcul par régression non-linéaire prend en compte les données expérimentales obtenues et les affines de manières plus précise

(influence de l'erreur expérimentale) par rapport à d'autres méthodes de transformations mathématiques (linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten) (116). Toutefois, les méthodes linéaires (Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk, par exemple) sont utilisables à des fins complémentaires et de vérifications rapides des résultats, elles-mêmes plus précises que la détermination d'après l'hyperbole michaelienne effectuée manuellement.

Ces études cinétiques nous renseignent donc sur les effets directs d'une mutation chez une enzyme (affinité envers le substrat, vitesse de catalyse). Ces résultats peuvent, par la suite, mener à une étude plus approfondie de profils cinétiques intéressants.

II.c Inhibition irréversible

Certains β-lactames, comme le clavulanate, agissent à titre d'inhibiteurs enzymatiques et répondent à un modèle cinétique différant de celui énoncé plus haut, dépendant alors du type d'inhibition exercé sur l'enzyme (22). En science des protéines, la grande majorité des inhibiteurs connus agissent à titre d'inhibiteurs réversibles, où leur action n'est que transitoire et l'enzyme retrouve sa forme libre (Figure II.3).



Figure II.3 : Inhibition enzymatique

Activité enzymatique en absence d'inhibiteur (vert), d'inhibiteur dont l'action est réversible (orange) et irréversible (rouge). Sur une courte période de temps, l'enzyme parait, dans le cas d'une inhibition réversible, totalement inhibée par son inhibiteur. En cas d'inhibition irréversible, la perte d'activité enzymatique se fait de manière exponentielle et dépendante du temps. Modifié de Enzyme Kinetics (116).

Une caractéristique de l'inhibition irréversible est la dépendance de la réaction au temps et le besoin d'une seule molécule d'inhibiteur pour inhiber une molécule d'enzyme dans le cas d'un inhibiteur puissant (116). Cette réaction d'inhibition est intrinsèquement de second ordre, influençant ainsi la manière de calculer les paramètres cinétiques d'inhibition. Ainsi, le clavulanate est considéré comme un inhibiteur-suicide de type compétitif, car le site de fixation est identique à celui des β -lactames chez BlaC. Le clavulanate entre ainsi dans le mécanisme d'hydrolyse « classique » des β -lactames, mais garde le lien covalent qu'il a avec l'enzyme (Ser70 chez BlaC), tel que montré en Figure 1.8. Il n'est donc pas relâché sous forme de produit, l'enzyme ne se régénère pas et le site actif est occupé de manière définitive.

C'est ce type d'inhibition irréversible qui est la clé du succès de la combinaison ampicillineclavulanate contre BlaC native chez TB et d'autres protéines (inhibiteur irréversible = efficacité à long terme sur BlaC native). Ainsi, l'inhibition de BlaC par le clavulanate se fait comme suit (équation 3) :

$$E + I \stackrel{k_1}{\Leftrightarrow} E: I \stackrel{k_2}{\to} E - I \stackrel{k_3}{\to} E - I *$$
(3)

Où E représente l'enzyme ;

l représente l'inhibiteur ;

E : l est le complexe enzyme-inhibiteur intermédiaire dont la formation est réversible;

E-l est le complexe acylé enzyme-inhibiteur dont la réaction chimique est irréversible;

E-l* est l'état du complexe enzyme-inhibiteur lié de façon covalente, dont la réaction chimique est irréversible. Ceci correspond à la dernière étape de ce processus d'inhibition où l'enzyme est incapable de se régénérer comme en catalyse enzymatique; k1 est la constante de vitesse de la réaction réversible menant à un complexe enzyme-inhibiteur intermédiaire ;

k2 est la constante de vitesse de la réaction irréversible menant à un complexe enzymeinhibiteur covalent ;

k3 est la constante de vitesse de la réaction irréversible menant à un complexe enzymeinhibiteur covalent où l'enzyme, définitivement altérée, ne retrouve plus son état natif et où l'inhibiteur devient un inhibiteur de type suicide

Nous pouvons ainsi remarquer que les étapes de catalyse sont semblables à celles en absence d'inhibiteur. De nouveaux paramètres spécifiques à ce système (en présence d'inhibiteur) sont calculés : k_{inact} (semblable au k_{cat}) et K_{i} (constante d'inhibition, semblable au K_{m}). De même, un état intermédiaire supplémentaire apparait (E : l pourrait être assimilé à l'étape C de la Figure

1.8 et semblable au complexe michaelien, E-I à l'étape C-I et E-I* I à l'étape J). Ces paramètres sont, dans le cas d'une inhibition irréversible, dépendant de l'influence du temps sur l'IC₅₀ et de la perte d'enzyme active totale. Dans le cadre de cette étude, la BZ a été utilisé comme substrat rapporteur lors des essais d'inhibition par mesure dans le spectre UV (232 nm).

Concrètement, après avoir réalisé la cinétique de la BZ par BlaC, un ratio E : S dans des concentrations permettant d'obtenir une belle droite d'hydrolyse est sélectionnée. Ces gammes, diffèrent toutefois selon le substrat utilisé et l'enzyme en présence. Les concentrations sélectionnées sont de l'ordre du micro molaire pour les substrats et du nano à milli molaire pour les enzymes (nano molaire correspondant aux enzymes les plus affines pour le dit substrat). Ainsi, le ratio E : S diffère pour chaque enzyme.

Ainsi, pour ce mémoire, l'étude d'inhibition s'est alors faite à ces concentrations fixes E et S pour différentes concentrations d'inhibiteurs, permettant un calcul d'activité résiduelle d'après la réaction sans inhibiteur (Figure II.4).





L'hydrolyse d'un substrat en présence de clavulanate est mesurée pour différents temps d'incubation. L'IC₅₀ de chaque mesure est ensuite associé aux temps d'incubation puis, une régression non-linéaire d'après l'équation de (117) est appliquée pour obtenir les paramètres k_{inact} et K_{i} . Figure inspirée de (117).

Cette mesure a ensuite été répétée à différents temps d'incubation pour déterminer les IC_{50} nécessaires au calcul des constantes cinétiques d'inhibition d'après l'équation (4) (117) :

$$IC_{50}(t) = K_i \left(1 + \frac{s}{\kappa_m} \right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta IC_{50} \cdot k_{inac} \cdot t}}{\eta IC_{50} \cdot k_{inac} \cdot t} - 1 \right);$$
(4)

avec
$$\eta IC_{50} = \frac{IC_{50}(t)}{\kappa_i \left(1 + \frac{S}{\kappa_m}\right) + IC_{50}(t)}$$
 (5)

où IC₅₀ (t) est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique en fonction du temps (t) ;
*K*_i est la constante d'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme ;
*k*_{inac} est la constante de vitesse de l'inhibiteur pour l'enzyme ;
S est la concentration de substrat ;
*K*_m la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat rapporteur (ici la BZ)

Enfin, d'autres paramètres cinétiques (dont k_{cat}) dérivés de ces études ont pu être déterminés à l'aide de la méthode par ratio (Chapitre 0). Ce paramètre permet entre autres de mesurer la tendance d'une enzyme à choisir entre la voie d'inhibition par l'inhibiteur (sensibilité) ou d'hydrolyse de l'inhibiteur (résistance).

Ces études cinétiques nous renseignent donc sur les effets directs d'une mutation chez une enzyme envers l'action d'un inhibiteur. Ces résultats peuvent, par la suite, mener à une étude plus approfondie de profils de résistances intéressants.

II.d Étude de stabilité par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (93) est un phénomène présent chez des molécules optiquement actives (ou chirales, Figure II.5). Lorsqu'elles sont traversées par une lumière monochromatique polarisée circulaire (gauche et droite dans le cas de nos expériences), elles engendrent un changement du plan de polarisation de la lumière. Celle-ci se trouve sous forme elliptique et c'est la différence d'absorption entre la lumière gauche et droite qui est mesurée. Ceci résulte en un spectre spécifique à chaque molécule étudiée du signal CD en fonction de la longueur d'onde.



Figure II.5 : Principe du dichroïsme circulaire.

Chez les protéines, des profils reliés aux structures secondaires des protéines sont facilement reconnaissables (Figure II.5) et permettent de vérifier le repliement et la stabilité d'une protéine dans le temps. En dehors de cela, diverses informations peuvent être connues sur les protéines grâce à cette technique : intégrité d'un site de fixation pour un cofacteur, effets d'agents dénaturant, changements conformationnels lors de la fixation d'un ligand ou l'effet d'un tampon sur la stabilité de la protéine (93). Ces expériences, très sensibles aux paramètres expérimentaux, requièrent une excellente pureté de la protéine (99%) et un tampon stable malgré les changements de température, par exemple (le tampon Tris est donc à éviter) ou absorbant peu la lumière (surtout dans le spectre UV).

Dans cette étude, les expériences de CD ont permis d'obtenir le profil structural de la protéine et la température de dénaturation (T_m , où 50% de la protéine se trouve sous forme dénaturée) pour chacun des mutants afin de les comparer au type natif, et donc de nous en apprendre davantage sur les effets biophysiques de chaque mutation.

Dans une expérience de dichroïsme circulaire, l'enzyme se trouve à être traversée par un rayon de lumière monochromatique polarisée. Cette lumière, circulaire en droite et gauche, permet de mesurer une différence d'absorption après le passage au travers de l'échantillon. Cette différence d'absorption est elliptique, ce qui mène à un spectre (empreinte unique à chaque échantillon) d'ellipticité molaire en fonction de la longueur d'onde. Dans cet exemple, un profil typique d'une protéine constituée d'hélices a est montré.