

**Etude de la métallo - $\beta$ -lactamase de sous-classe B2 YEM-1,  
produite par *Yersinia mollaretii* Wauters.**

**Mémoire présenté par SYLVIE BLÉTARD**

En vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire à  
finalité approfondie.

*Année académique 2016-2017*

**Promoteur :** Moreno Galleni  
**Co-promoteur :** Paola Mercuri

# Remerciements

*Au terme de ce mémoire, je voudrais apporter mes remerciements.*

*En premier lieu, je souhaite remercier Monsieur Galleni pour m'avoir accueillie dans son unité et permis de réaliser ce travail de fin d'études. Je le remercie pour le suivi de mon mémoire et les conseils prodigués tout au long du semestre.*

*J'adresse à Paola de vifs remerciements, pour avoir supervisé ce mémoire. Je la remercie pour sa patience et sa disponibilité, pour avoir su me guider et me conseiller tout au long de ces mois de travail.*

*A toute l'équipe du CIP, ce fut une merveilleuse expérience passée parmi vous. Entre potins et conseils, les journées de travail se tintaient d'une charmante ambiance. Il ne m'est pas possible de citer tout le monde, aussi vous remercie-je à tous, chercheurs, doc' et post-doc', étudiants et techniciens, un grand merci à tout ce joyeux monde dont se remplit au quotidien les laboratoires universitaires de l'Ulg.*

*Je tiens tout spécialement à remercier Elodie pour son entraide quotidienne, sa motivation contagieuse et les nombreux conseils et coups de main prodigués durant toute cette aventure.*

*Un grand merci à mes proches et ma famille qui m'ont soutenue tout au long de mes études.*

*Je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

# Résumé

Depuis plusieurs décennies, l'utilisation intensive et parfois abusive des antibiotiques est l'une des causes majeures de l'émergence de souches bactériennes résistantes. Parmi un ensemble de mécanismes développés par celles-ci pour contrer l'effet létal des antibiotiques, la production de  $\beta$ -lactamases est le moyen le plus répandu. Ces enzymes rendent les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame inactifs par hydrolyse de leur noyau  $\beta$ -lactame. Les  $\beta$ -lactamases se divisent en deux familles, les  $\beta$ -lactamases à sérine active (classe A, C et D de la classification d'Ambler) et les métallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) (classe B), qui se répartissent à leur tour en trois sous-classes : B1, B2, B3. Les métallo- $\beta$ -lactamases de sous-classe B2 sont des carbapénémases strictes. Parmi les enzymes de cette sous-classe, CphA est une métallo- $\beta$ -lactamase bien connue. Une analyse bioinformatique des banques de données, en utilisant la séquence de l'enzyme CphA comme référence, a permis d'identifier quatre nouvelles MBLs potentielles qui appartiendraient à la sous-classe B2. L'une d'entre elles, YEM-1, est produite par *Yersinia mollaretii*.

Notre travail se porte sur la caractérisation de YEM-1. La protéine YEM-1 a été produite, purifiée et caractérisée. Etant donné qu'elle est supposée appartenir à la sous-classe B2, son profil d'activité est comparé à celui de CphA. L'étude cinétique de cette protéine montre une efficacité catalytique réduite pour l'ensemble des carbapénèmes testés (à l'exception de l'imipénème) par rapport à CphA. L'effet des ions métalliques ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ) et d'agents chélatants (EDTA, phénantroline, acide dipicolinique) sur l'activité de YEM-1 montre qu'elle a une affinité réduite par rapport à CphA pour la fixation d'un second ion zinc et qu'elle est plus résistante à l'effet des chélatants. La comparaison de la structure tridimensionnelle de CphA et du modèle de la structure de YEM-1 met en évidence trois résidus (Y63, T158, S236) proches du site actif qui pourrait influencer l'activité enzymatique de YEM-1. Les résidus Y63 et S236 ont été modifiés par mutagenèse dirigée afin de restaurer les acides aminés présents chez CphA. Parmi ceux-ci le mutant Y63V de YEM-1 a été produit et purifié. Sa caractérisation cinétique démontre une augmentation de l'efficacité catalytique du mutant par rapport à l'enzyme sauvage.

# Liste des abréviations

μg	Microgramme
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
ε	Coefficient d'extinction molaire
ADN	Adénosine désoxyribonucléotide
CIP	Centre d'Ingénierie des Protéines
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
h	Heure
g	Gramme
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilo Base
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyronaside
L	Litre
M	Molaire
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
min	Minute
nm	Nanomètre
pb	Paire de base
PBP	Penicillin-Binding-Protein
pm	Poids moléculaire
rpm	Rotation par minute
g	Force centrifuge
s	Seconde
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl sulfate – Poly Acrylamid Gel electrophoresis
YEM-1	<i>Yersinia mollaretii</i> 1

## Liste acides aminés

Ala	A	Alanine	Met	M	Méthionine
Cys	C	Cystéine	Asp	N	Asparagine
Asp	D	Acide aspartique	Pro	P	Proline
Glu	E	Acide glutamique	Gln	Q	Glutamine
Phe	F	Phénylalanine	Arg	R	Arginine
Gly	G	Glycine	Ser	S	Sérine
His	H	Histidine	Thr	T	Thréonine
Iso	I	Isoleucine	Val	V	Valine
Lys	K	Lysine	Try	W	Tryptophane
Leu	L	Leucine	Tyr	Y	Tyrosine

## Liste des bases

A	Adénine
T	Thymine
C	Cytosine
G	Guanine

# TABLES DES MATIERES

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. $\beta$ -lactames et résistance bactérienne .....	1
1.2. $\beta$ -lactamases .....	2
1.2.1. Les $\beta$ -lactamases à sérine active .....	2
1.2.2. Métallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) .....	3
<b>2. OBJECTIF.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATÉRIEL.....</b>	<b>15</b>
3.1. Plasmides .....	15
3.2. Les souches bactériennes.....	16
3.2.1. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	16
3.2.2. <i>E. coli</i> Rosetta (DE3).....	16
3.3. Milieux de culture.....	16
3.3.1. Milieu liquide LB (Luria-Bertani) .....	16
3.3.2. Milieu liquide LBA (Luria-Bertani) .....	16
3.3.3. Milieu SOC (Super Optima broth with Catabolic repressor) .....	16
3.3.4. Milieu liquide TB (Terrific Broth) .....	17
3.4. Solutions d'antibiotiques.....	17
3.4.1. Kanamycine .....	17
3.4.2. Chloramphénicol.....	17
3.5. Marqueurs .....	17
3.4.1. GeneRuler <sup>TM</sup> 1kb DNA ladder, ready-to-use.....	17
3.4.2. Unstained Protein Weight Marker .....	17
3.5. Enzymes.....	18
3.5.1. Enzymes de restriction .....	18
3.6. Amorces .....	18
3.7. Tampons et solutions.....	19
3.7.1. Tampon MES (pH 6).....	19
3.7.2. Tampon HEPES (pH 7.5) .....	19
3.7.3. Tampon TGS .....	19
3.7.4. Tampon TAE (pH 8) .....	19
3.7.5. IPTG .....	19
3.7.6. Bleu dénaturant 5x.....	19
3.7.7. Pageblue protein staining solution.....	20
3.8. Gène <i>yem-1</i> .....	20
<b>4. MÉTHODES.....</b>	<b>21</b>

4.1.	Biologie moléculaire.....	21
4.1.1.	Préparation des cellules compétentes <i>E. coli</i> .....	21
4.1.2.	Transformation des cellules compétentes d' <i>E.coli</i> .....	21
4.1.3.	Extraction et purification d'ADN plasmidique.....	21
4.1.4.	Détermination de la concentration en ADN.....	22
4.1.5.	Visualisation sur gel agarose.....	22
4.1.6.	Réaction de polymérisation en chaîne.....	22
4.1.7.	Mutagenèse dirigée.....	23
4.1.8.	Séquençage de l'ADN.....	24
4.1.9.	Stock glycérol bactérien.....	24
4.2.	Méthodes liées aux protéines.....	25
4.2.1.	Visualisation sur gel de polyacrylamide.....	25
4.2.2.	Production de protéines.....	25
4.2.3.	Purification des protéines.....	27
4.2.4.	Détermination de la concentration en protéine.....	28
4.2.5.	Spectrométrie de masse.....	29
4.2.6.	Caractérisation cinétique.....	29
<b>5.</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>31</b>
5.1.	Biologie moléculaire.....	31
5.2.	Production et purification de la protéine YEM-1 et du mutant Y63V.....	33
5.2.1.	Test de production du mutant Y63V.....	33
5.2.2.	Production.....	34
5.2.3.	Purification.....	34
5.2.4.	Dosage des protéines.....	38
5.2.5.	Spectrométrie de masse d'Y63V.....	39
5.3.	Tests cinétiques de la protéine YEM-1 et du mutant Y63V.....	40
5.3.1.	Effet du DMF et du DMSO.....	41
5.3.2.	Influence des métaux.....	42
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>50</b>

# 1.Introduction

## 1.1. $\beta$ -lactames et résistance bactérienne

La découverte de la pénicilline par Fleming en 1929 [1] et la mise au point d'un agent thérapeutique par Florey et Chain en 1940 [2] ont été le point de départ du succès des antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame pendant plusieurs décennies. Largement répandus, efficaces et connus pour l'absence d'effets secondaires, ils représentent la plus grande classe parmi les antibactériens connus. Ils possèdent un large spectre d'activité en prenant pour cible aussi bien les bactéries à Gram-positif que les bactéries à Gram-négatif. A l'heure actuelle, ils demeurent le traitement le plus commun pour les infections bactériennes. Leurs structures se caractérisent par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame (*Figure 1*). Cette structure partage une grande homologie avec celle de l'extrémité D-Ala-Ala de mucopeptides, substrats naturels d'une catégorie d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, les D,D-transpeptidases (aussi appelées PBP pour « Penicillin Binding Protein »). Leur mode d'action se traduit par l'inactivation du domaine D,D-transpeptidase des PBPs, pour lesquels ils agissent comme des substrats suicides. Elles ne sont dès lors plus en mesure d'assurer la synthèse du peptidoglycane. Incapable de résister à la différence de pression osmotique entre le milieu extérieur et le cytoplasme, la bactérie meurt par lyse cellulaire [3].

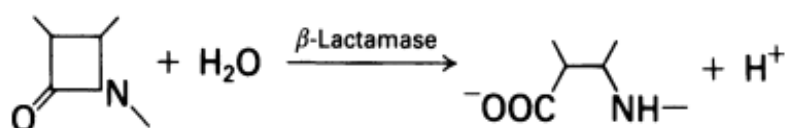
Depuis leur apparition dans l'arsenal thérapeutique, l'utilisation intensive et parfois abusive de ces antibiotiques a conduit à l'émergence de souches résistantes dans la population bactérienne. Les stratégies développées par les bactéries pour échapper à l'action létale de ces composés sont multiples : modification de la perméabilité membranaire, activation de systèmes d'efflux, diminution de l'affinité ou production en excès des enzymes cibles ainsi que la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Cette dernière stratégie est la plus répandue parmi les mécanismes de défense déployés par les bactéries. Elle est souvent combinée à l'une des autres stratégies [4]. C'est en 1940 qu'Abraham et Chain ont découvert la première enzyme inactivant la pénicilline, lui donnant le nom de pénicillinase [5]. Au début des années 60, cette famille de protéines sera rebaptisée  $\beta$ -lactamases, en lien avec le mode d'action mis en lumière à cette époque : l'hydrolyse du lien amide du noyau  $\beta$ -lactame [6]. Les antibiotiques du genre  $\beta$ -lactamines, rendus inactifs, ne sont dès lors plus capables de reconnaître leur cible, les D,D-transpeptidases, et ne peuvent donc plus interférer avec le développement des bactéries [7].



## 1.2. $\beta$ -lactamases

Ces enzymes appartiennent à la famille des hydrolases. Elles hydrolysent de manière spécifique le noyau  $\beta$ -lactame (*Figure 1*) des antibiotiques de type  $\beta$ -lactamine.

Elles peuvent être produites de manière constitutive ou induite, et sont respectivement secrétées dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram-négatif ou dans le milieu de culture des bactéries à Gram-positif. Le gène codant pour ces enzymes est soit d'origine chromosomique ou plasmidique. Les gènes localisés sur des plasmides sont facilement transférables entre bactéries. C'est une des causes de propagation de la résistance dans la population bactérienne [7].



**Figure 1 : réaction d'hydrolyse d'un antibiotique à noyau  $\beta$ -lactame par une  $\beta$ -lactamase [8].**

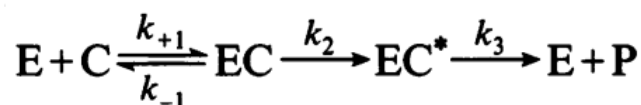
A l'heure actuelle, plus de 700  $\beta$ -lactamases sont connues. Au vue de leur grande diversité de séquence, ces enzymes sont triées selon la classification d'Ambller. Une classification plus récente réalisée par Bush fut la première à corrélér la structure moléculaire des  $\beta$ -lactamases avec leur profil d'activité. Elles sont tout d'abord séparées en deux familles. La première est composée des enzymes à sérine active. Les  $\beta$ -lactamases à sérine active sont réparties en trois classes : A, C et D. La seconde famille est composée de métallo- $\beta$ -lactamases (MBLs). Ces enzymes forment la classe B. Cette dernière classe se distingue des trois autres par leur mécanisme catalytique qui nécessite la liaison d'un ou deux ions zinc au sein de leur site actif. [9]

### 1.2.1. Les $\beta$ -lactamases à sérine active

Les enzymes de la classe A sont reconnues comme des pénicillinases, celles la classe C comme des céphalosporinases et celles de la classe D comme des oxacillinases [9]. Au niveau de la structure primaire des enzymes d'une même classe, elles possèdent un degré de similitude compris entre 20 à 50%. Néanmoins, on note la présence de trois motifs conservés au sein des trois classes: Ser\*-Xaa-Xaa-Lys, où Ser représente la sérine active, Ser(Tyr)-Xaa-Asn et Lys-Thr(Ser)-Gly [10].

Le mécanisme d'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame suit le modèle de Michaelis-Menten (*Figure 2*) et s'opère en trois étapes. La première est liée à la formation du complexe enzyme-substrat non-covalent (EC). Ce dernier évolue vers la formation d'un complexe covalent (acyl-enzyme EC\*)

obtenu par acylation de la sérine active par l'hydrolyse du lien amide du noyau  $\beta$ -lactame et finalement, par hydrolyse de l'acyl-enzyme, assurant la restauration de l'enzyme sous forme libre E et le relargage du produit P [11].



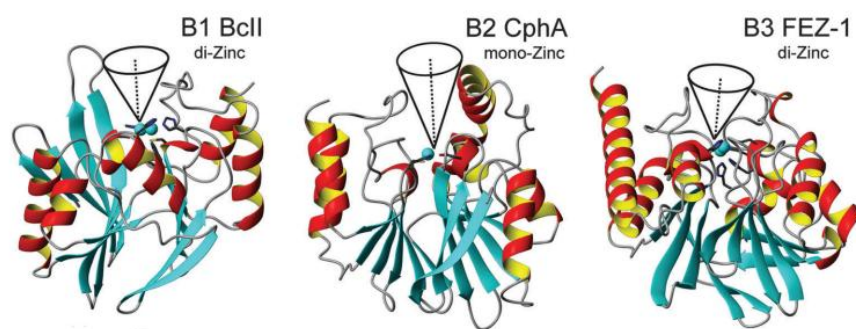
**Figure 2 : mécanisme cinétique selon le modèle de Michaelis-Menten [11].**  $k_{+1}$  est la constante d'association de E+S,  $k_{-1}$  représente la constante de dissociation du complexe EC,  $k_2$  et  $k_3$ , des constantes de premier ordre, correspondent respectivement à la vitesse de formation et d'hydrolyse de l'acyl-enzyme  $EC^*$ .

### 1.2.2. Métallo- $\beta$ -lactamases (MBLs)

Cette classe d'enzymes est longtemps restée au stade de curiosité biochimique après le premier cas découvert chez *Bacillus cereus* (*B. cereus*) en 1966. Il faudra attendre deux décennies pour s'y intéresser à nouveau, avec la découverte de résistance aux carbapénèmes et l'identification de nombreuses MBLs au sein de souches nosocomiales [12].

Elles se caractérisent par un large spectre d'activité envers les  $\beta$ -lactamines. A l'exception des monobactames, elles sont capables d'hydrolyser toutes les classes de  $\beta$ -lactames, y compris les carbapénèmes (antibiotiques utilisés en thérapie intensive en milieu clinique). Aucun inhibiteur efficace de MBLs n'a encore pu être trouvé jusqu'à aujourd'hui. Cependant, ces enzymes sont inactivées par des chélateurs de métaux comme l'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), l'acide dipicolonique, la phénantroline. Il est aussi intéressant de noter que la majorité des gènes codant pour ces enzymes sont d'origine plasmidienne et qu'ils sont facilement transférables entre souche bactérienne par les phénomènes de conjugaison ou de transposition. Les MBLs peuvent se disséminer facilement et permettre la propagation des résistances aux carbapénèmes [12].

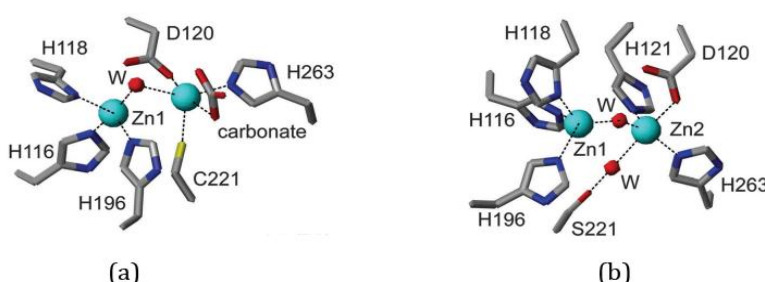
La première caractéristique structurale de ces enzymes repose sur la présence de deux sites de liaisons au zinc ( $Zn1$  et  $Zn2$ ), proches l'un de l'autre. Sur base de leur identité de séquence et de la coordination du zinc, les MBLs sont subdivisées en trois sous-classes : B1, B2 et B3. Le degré de similitude entre les trois sous-classes est faible et est inférieur à 10%. Les enzymes de la sous-classe B1 possèdent 23% d'identité entre elles, à peine 11% pour celles de la sous-classe B2 et encore moins pour la sous-classe B3, où seulement neuf résidus strictement conservés ont été identifiés. Par contre, toutes ces enzymes possèdent une structure tridimensionnelle conservée. Elles sont dotées d'une structure  $\alpha\beta\beta\alpha$ , avec des feuillets  $\beta$  anti-parallèles au centre, flanqués par des hélices- $\alpha$  (Figure 3). Le site actif se trouve enchâssé au centre de cette structure [12].



**Figure 3 : structure représentative des trois sous-classes des MBLs (B1, B2 et B3).** Les feuillets  $\beta$  sont représentés en bleu, les hélices alpha en rouge/jaune, les boucles en gris et la cavité du site actif est indiquée par un entonnoir [13].

### 1.2.2.1. Sous-classes B1 et B3

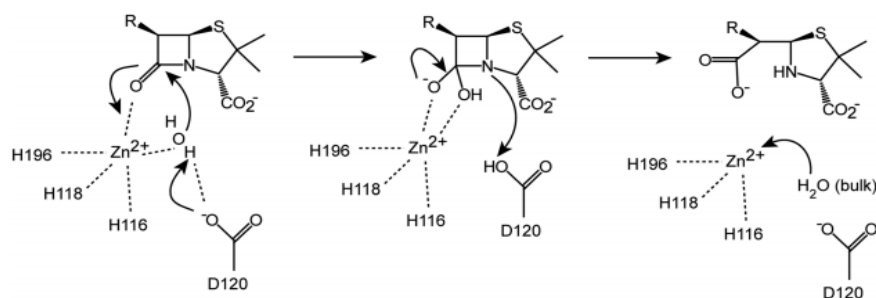
Les MBLs des sous-classes B1 et B3 possèdent un large spectre d'activité. La sous-classe B1 hydrolyse efficacement les pénicillines, céphalosporines et carbapénèmes tandis que la sous-classe B1 hydrolyse seulement les pénicillines et les céphalosporines. Si elles peuvent fonctionner avec une forme monozinc (enzyme GOB-1 de la sous-classe B3), elles possèdent un optimum d'activité sous forme dizinc (B1 et B3). Pour la sous-classe B1, le premier site de liaison au zinc se compose de trois histidines (H116, H118 et H196) et le deuxième site de liaison au zinc se compose d'une histidine (H263), d'une cystéine (C221) et d'un acide aspartique (D120) (Figure 4a). Le premier site de liaison au zinc de la sous-classe B3 est identique à la sous-classe B1, mais elle se distingue au niveau du second site, où la cystéine (Figure 4a) est remplacée par une sérine (Figure 4b) [12,13].



**Figure 4 : structure du premier et du second site de liaison des ions zinc de la sous-classe B1 (a) et de la sous-classe B3 (b).** Les exemples schématisés représentent la forme BclI-dizinc en (a) et L1-dizinc en (b) [13].

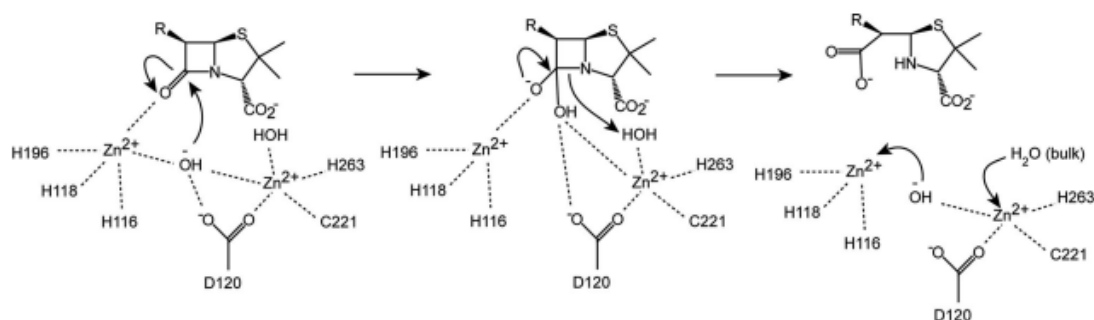
Le mécanisme catalytique supposé pour la forme monozinc est assuré par la génération d'un ion hydroxyde par l'interaction entre une molécule d'eau et l'ion zinc qui agit comme un acide de Lewis. L'ion zinc est en interaction avec les trois histidines du premier site de fixation. Dans ce mécanisme, la production d'ion hydroxyde est aussi favorisée par la présence d'une base

générale, jouée par la chaîne latérale de l'acide aspartique 120. L'ion zinc a pour rôle de fixer le substrat dans le site actif et diminuer le pKa d'une molécule d'eau. Déprotonnée par la base générale, la molécule d'eau produit un ion hydroxyde qui provoque une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle du noyau- $\beta$ -lactame, formant un intermédiaire tétraédrique non-covalent. Cet intermédiaire est stabilisé par l'ion zinc. L'azote du noyau  $\beta$ -lactame reçoit ensuite un proton de D120, menant à l'ouverture du cycle et au relargage du produit (*Figure 5*) [13].



**Figure 5 : mécanisme catalytique proposé pour les MBLs B1 mono-zinc [13].**

Le mécanisme catalytique supposé pour la forme dizinc des sous-classes B1 et B3 est légèrement différent (*Figure 6*). L'ion hydroxyde menant une attaque nucléophile sur le carbonyle du noyau  $\beta$ -lactame forme un pontage avec les deux ions zinc. L'ouverture du cycle n'est pas réalisée grâce à un proton porté par base générale, déjà embrigadée dans une interaction avec le second zinc, mais par une seconde molécule d'eau, liée à ce deuxième ion zinc. L'acide aspartique 120 n'aurait plus un rôle de base générale mais plutôt un double rôle structural : positionnement du second ion zinc et orientation du pont hydroxyde-zinc. Le mécanisme est identique pour les deux sous-classes. La seule différence structurale à relever, mentionnée plus tôt, est la cystéine 221 (sous-classe B1), remplacée par une sérine à la même position (sous-classe B3) [13].



**Figure 6 : mécanisme catalytique proposé pour les MBLs B1 dizinc [13].**

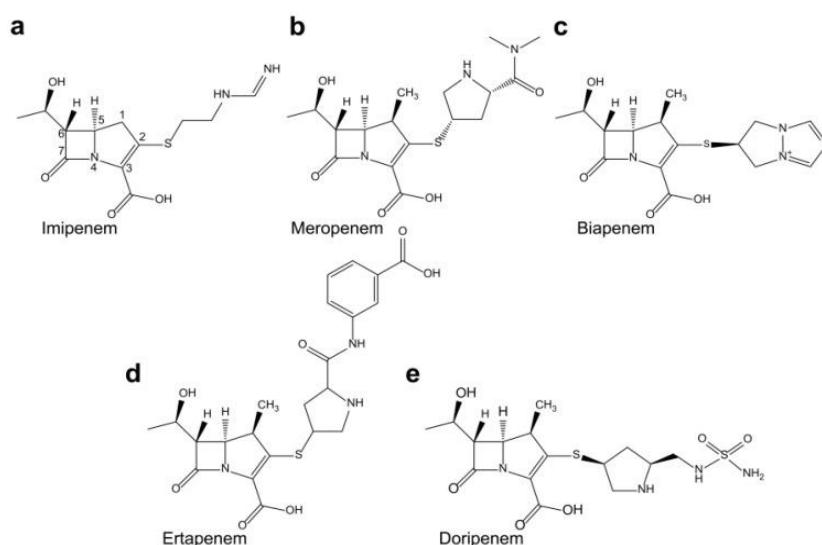
D'un point de vue clinique, les enzymes de la sous-classe B1 sont toujours les plus prépondérantes. On retrouve les enzymes BcII de *B. cereus*, BlaB d'*Elizabethkingia*

*meningoseptica* (*E. meningoseptica*), les  $\beta$ -lactamases de type NDM, IMP, VIM etc. La majorité de ces enzymes est codée par des gènes localisés sur des plasmides facilement transférables entre souches bactériennes. Une autre particularité de ces plasmides est qu'ils possèdent plusieurs gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases d'autres classes et aussi des antibiotiques non  $\beta$ -lactames comme les composés de la famille de la tétracycline, des aminoglycosides etc. Ceci permet aux bactéries qui les possèdent d'exhiber un profil de multi-résistance envers la majorité des antibiotiques utilisés en milieu clinique.

Les  $\beta$ -lactamases de la sous-classe B3 partagent seulement des similarités structurales avec les sous-classes B1 et B2. Ces enzymes sont généralement encodées par le chromosome. On peut notamment retrouver dans cette sous-classe : L1 produit par *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), GOB-1 produit par *Chryseobacterium meningosepticum* (*C. meningosepticum*), FEZ-1 produit par *Legionella garmarii* (*L. gormanii*) etc. On note aussi que ces enzymes sont monomériques à l'exception de L1 qui est tétramérique [12].

#### 1.2.2.2. Sous-classe B2

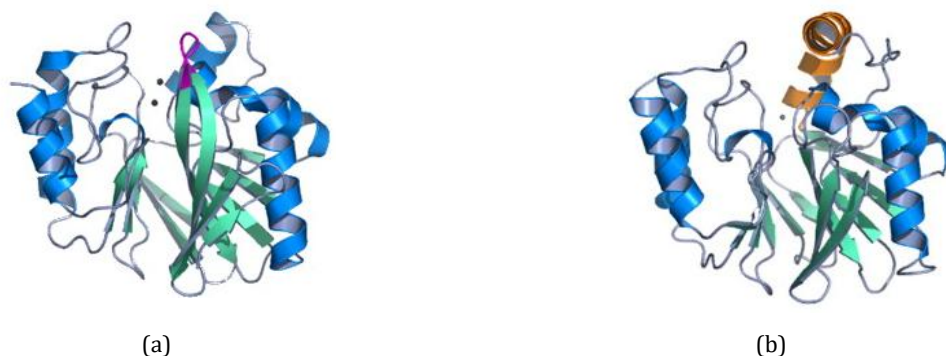
Les enzymes appartenant à la sous-classe B2 sont des carbapénémases stricts. Elles hydrolysent de manière spécifique les carbapénèmes (Figure 7) et ont une faible activité contre les pénicillines et les céphalosporines [13].



**Figure 7 : Structure des carbapénèmes [14].** Imipénème, meropénème, biapénème, ertapénème, doripénème.

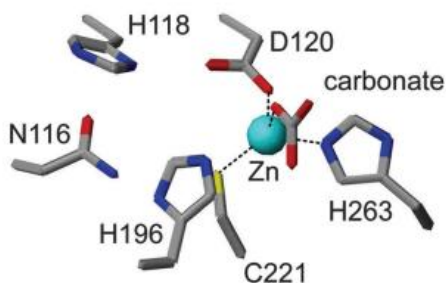
Elles possèdent le repliement propre aux MBLs, mais le site actif semble ancré plus en profondeur dans la structure. Par ailleurs, plusieurs différences entre les MBLs de sous-classes B2 et B1/B3 pourraient expliquer le spectre d'activité étroit de ces enzymes. D'un point de vue structural, on note la présence d'une hélice  $\alpha 3$  allongée (R140-L161) fermant la cavité dans

laquelle est enchâssé le site actif (*Figure 8b*). La disposition de cette hélice induirait la présence d'un cluster hydrophobe orienté vers le site actif. Ce dernier serait bénéfique à la liaison des substrats de type carbapénème dans le site actif de CphA. Une boucle mobile de 6 résidus (résidus 60-66) impliquée dans la liaison de substrats ou d'inhibiteurs présente dans la sous-classe B1 (*Figure 8a*) fait défaut à cette sous-classe [12].



**Figure 8 : Structure d'une MBL de sous-classe 1, BclI (a) et d'une MBL de sous-classe B2, CphA (b).** Les hélices sont représentées en bleu, les feuillets  $\beta$  en turquoise, les boucles en gris, la boucle mobile (60-66) en mauve chez BclI et l'hélice  $\alpha$ -3 en orange chez CphA [12].

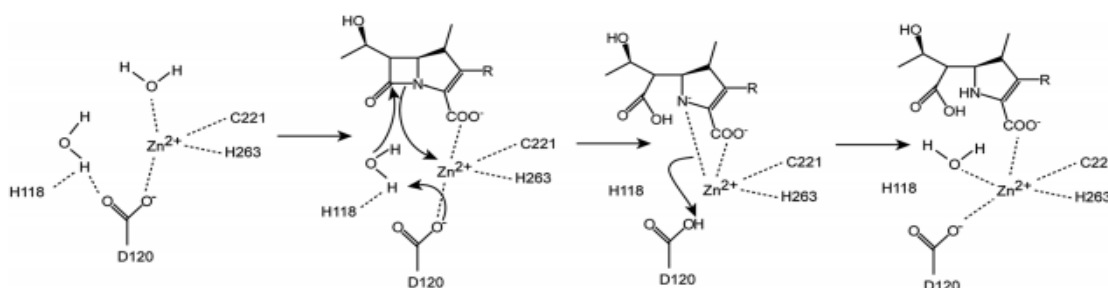
Les MBLs de sous-classe B2 ont leur optimum d'activité sous forme monozinc. Le site liant l'ion zinc catalytique et correspondant au second site commun des trois sous-classes de MBLs ( $Zn_2$ ), est composé de l'histidine H263, de la cystéine C221 et de l'acide aspartique D120 (*Figure 9*). Le site  $Zn_1$  se distingue des MBLs des sous-classes B1 et B3, avec le remplacement de l'histidine 116 par une asparagine N116. Une différence pouvant expliquer l'absence d'interaction du premier site avec un ion zinc. Ce site est occupé par des molécules d'eau. La liaison d'un second ion zinc bloquerait le site de liaison dans une conformation induisant une perte d'activité suite à la réorientation de certains résidus essentiels à l'activité catalytique [13].



**Figure 9 : structure du site de liaison de la forme mono-zinc des MBLs B2 [13].** Le premier site, composé de H118, H196 et N116, ne lie pas d'ion zinc. Le second site, composé de D120, C221 et H263, lie l'ion zinc (sphère bleue).

Le mécanisme d'action diffère des deux autres sous-classes. Contrairement au mécanisme catalytique des MBLs de sous-classes B1 et B3, la réaction catalytique se déroule sur le second site de liaison au zinc. L'attaque nucléophile du substrat sur le carbonyle du noyau  $\beta$ -lactame est

réalisée par une molécule d'eau qui n'est pas liée au zinc. Elle serait activée par l'acide aspartique 120 et/ou l'histidine 118. L'ion zinc interagit ensuite avec l'azote du cycle et stabilise la charge négative portée par le résidu pendant la phase de transition. Le mécanisme se termine sur la protonation de l'azote par une molécule d'eau et le relargage du produit final (Figure 10) [13].



**Figure 10 : mécanisme catalytique proposé pour les MBLs de forme mono-zinc de la sous-classe B2 [13].**

La MBL CphA produite par *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) est une enzyme très étudiée de la sous-classe B2. On retrouve aussi ImS et Sfh-1 respectivement produites par *Aeromonas veronii* (*A. veronii*) et *Serratia fonticola* (*S. fonticola*) [12].

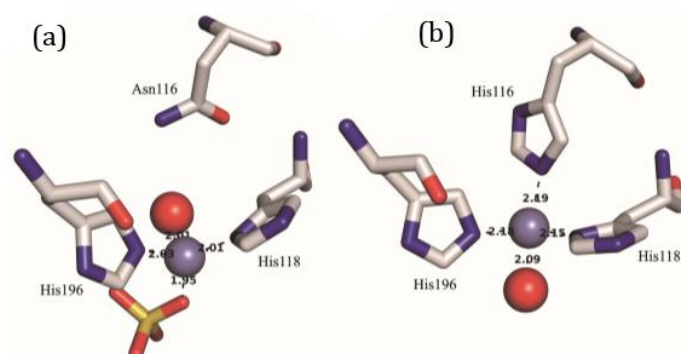
### • CphA

CphA est une carbapénèmase très active connue parmi d'autres. Elle est produite par *A. hydrophila*, souche responsable d'infections épidermiques, tissulaires, gastrointestinales et de bactériémie chez les poissons. Elle est aussi produite par d'autres souches du genre *Aeromonas* (*A. veronii*, *A. jandaei*,...).

C'est une protéine globulaire monomérique composée de 227 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 25.2 kDa. En tant qu'enzyme de la sous-classe B2, CphA exhibe un maximum d'activité sous forme monozinc. Elle est inhibée par la liaison d'un second ion zinc, à une constante de dissociation ( $K_{d2}$ ) égale à 46  $\mu$ M, une valeur élevée par rapport aux MBLs des autres sous-classes (1,8 nM (sous-classe B1) et < 6 nM (sous-classe B3)). Elle peut s'expliquer par une sphère de coordination atypique, où vient s'enchâsser une boucle (D114-H118), entravant le mouvement de l'ion métallique, ainsi que par la substitution d'une histidine (H116) par une asparagine (N116).

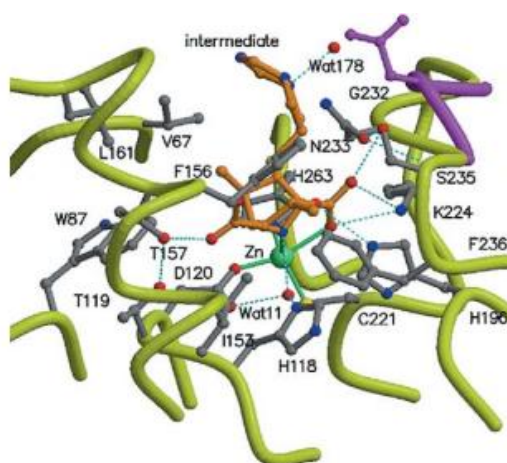
Le premier ion zinc, correspondant à l'ion métallique catalytique, se trouve sur le site D120, C221 et H263. Le second ion zinc est coordonné par H118 et H196, appartenant au site histidine conservé (Zn1) des MBLs. Une étude des mutants H118 et H196 de CphA a démontré l'effet de la liaison du second ion zinc inhibiteur sur les résidus histidines 118 et 196. Il empêcherait ces

deux histidines de jouer leur rôle dans l'hydrolyse des carbapénèmes. Par rapport à l'enzyme sauvage, une perte d'activité (facteur 1000) contre les carbapénèmes est observée chez ces deux mutants. Sans être impliquées dans la liaison de l'ion zinc catalytique, l'histidine 118 contribue à l'activation de la molécule d'eau et l'histidine 196 stabiliserait le trou oxyanionique en formant une liaison hydrogène avec l'oxygène carbonyle de la liaison  $\beta$ -lactame. La liaison du zinc inhibiteur aux deux histidines entrave l'enzyme dans l'hydrolyse des carbapénèmes. De plus, l'asparagine 116, remplacée par une histidine dans les MBLs de sous-classes B1 et B3, altérerait la coordination du zinc dans le site histidine, en sachant que l'histidine 116 est impliquée dans la liaison de l'ion zinc du site histidine chez les MBLs de sous-classe B1 (*Figure 11*) [15-17].



**Figure 11 : Structure du site Zn1 de CphA (a) et d'une MBL de sous-classe B1 (b).** Les molécules de zinc et d'eau sont respectivement représentées en gris et en rouge [15].

Des résidus comme les phénylalanines 156 et 236 ou les thréonines 119 et 157 se sont révélés importants dans la stabilisation et l'orientation du biapénème dans le site actif, en formant respectivement des liaisons hydrophobes et des liaisons hydrogènes avec ce substrat (*Figure 12*) [17].



**Figure 12 : vue modélisée du site actif de CphA en interaction avec le biapénème.** Le biapénème est représenté en orange et CphA en vert [17].

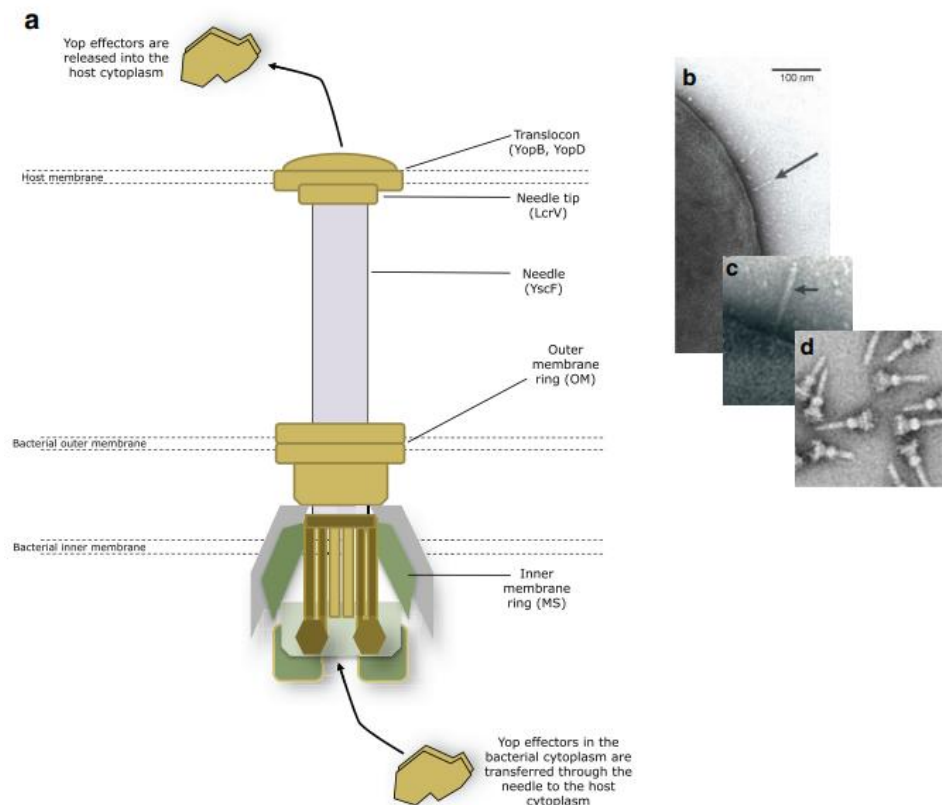
### • Nouvelles MBLs de sous-classe B2

Une analyse bioinformatique des banques de données en utilisant la séquence de l'enzyme CphA comme référence a permis d'identifier quatre nouvelles MBLs qui appartiendraient à la sous-classe B2 (*Figure 13*). Elles possèdent un degré d'identité supérieur à 50% par rapport à CphA.



[illegible]

de protéines toxiques directement dans le cytosol de la cellule eucaryote, conduisant inévitablement en l'apoptose de l'hôte [20].



**Figure 14 : schéma d'un type de système à trois sécrétions (T3SS) [20].**

Dans cette même famille se présentent de nombreuses souches non-pathogènes, démontrant une grande diversité génétique, mais appartenant tout de même à la famille des *Enterobacteriaceae*. La souche *Yersinia mollaretii*, découverte par Wauters en 1988, dont le nom a été donné en mémoire à Henri H. Mollaret pour ses nombreuses contributions scientifiques, a été extraite de l'écosystème terrestre. On le retrouve souvent dans les échantillons alimentaires, de sols, d'eau et d'environnement, mais certaines espèces de cette souche ont été directement isolées de l'humain, à partir de selles de patients atteints de diarrhée [19-21].

Si une étude a démontré l'absence de marqueurs de virulence chez *Y. mollaretii*, elle a mis en évidence l'existence d'antigènes communs entre *Y. enterocolitica* et *Y. mollaretii*. *Y. Enterocolitica* présente six groupes biovars en raison d'une grande hétérogénéité. Les souches sont réparties dans les biogroupes selon la distribution géographique, les niches écologiques et les propriétés de pathogénicité. Si *Y. Enterocolitica* est une souche pathogène qui suscite

inquiétude, c'est aussi lié à sa résistance à de nombreux  $\beta$ -lactames. Cette résistance serait en grande partie liée à l'expression de deux  $\beta$ -lactamases : BlaA et BlaB. La première est associée aux  $\beta$ -lactamases de classe A tandis que la seconde est associée aux  $\beta$ -lactamases de classe C. Toutes les biovars d'*Y. enterocolitica* possèdent ces gènes, exprimés à des degrés différents. Il en découle un niveau de susceptibilité aux  $\beta$ -lactames dépendant du biovars. *Y. mollaretii* appartient au biogroupe 3A, capable de fermenter le L-sorbose et le i- ou myo-inositol. [20-23].

Récemment, la MBL de sous-classe B2 produite par *Y. mollaretii* a été trouvée dans les échantillons de patient malade, parmi d'autres souches pathogènes. Au vue de son manque de pathogénicité, son intérêt médical reste modeste, mais le fait qu'elle produise une entérotoxine thermostable, présente aussi chez *Y. enterocolitica*, pourrait cependant changer la donne. Ces dernières années, des souches de *Yersinia* considérées comme non-pathogènes sont probablement associées à des maladies humaines qui aurait put être attribuées, par défaut, à *Y. enterocolitica*, en raison des similarités phénototypiques entre cette souche et les autres de *Yersinia*. En tant que biovar d'*Y. enterocolitica*, *Y. mollaretii* pourrait agir comme un pathogène opportuniste. Cette enzyme est au centre de mon projet [21-23].

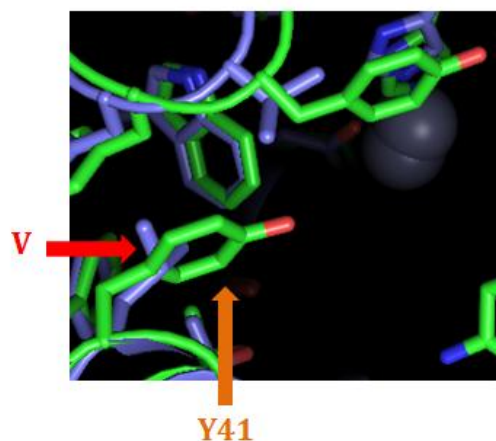
## 2.Objectif

Depuis plusieurs décennies, les  $\beta$ -lactamases n'ont jamais cessées d'attirer le regard scientifique, de part leur capacité de propagation et de dissémination à travers les souches. Ces enzymes sont produites par certaines bactéries comme moyen de défense face aux antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, d'où un grand intérêt à découvrir le mécanisme de ces nouvelles enzymes pour aboutir à de nouveaux moyens thérapeutiques. Si des inactivateurs ont été trouvés pour les  $\beta$ -lactamases à sérine active, c'est loin d'être le cas pour les métallo- $\beta$ -lactamases (MBLs). Dès lors, caractériser ces enzymes et comprendre leurs mécanismes, est une priorité pour développer de nouveaux antibiotiques.

La première partie de ce travail est de produire, purifier et caractériser l'enzyme YEM-1, produite par la souche *Y. mollahareitii* Wauters DMS 18520. Son profil d'activité sera alors comparé à celui d'une MBL de sous-classe B2 déjà caractérisée : CphA, étant donné que YEM-1 est supposé faire partir de cette sous-classe [24].

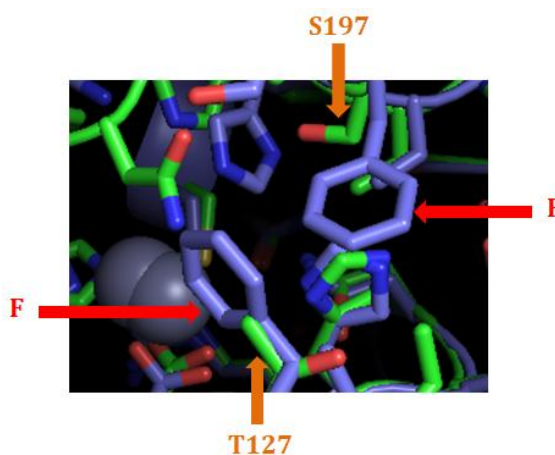
La seconde partie du travail repose sur l'étude des résidus faisant partie du site actif. La comparaison de la structure tridimensionnelle (3D) de CphA déterminée par cristallographie RX et le modèle de la structure de YEM-1 permet d'identifier trois résidus proches du site actif qui influenceraient le profil d'activité de CphA et YEM-1. Notre attention s'est portée sur les résidus en position 41 Y\*/V (*Figure 15*), en position 127 T\*/F et en position 197 S\*/F (*Figure 16*) (\* pour les résidus retrouvés chez YEM-1). L'idée principale de cette seconde partie est de restaurer certains résidus de CphA chez YEM-1 afin de mesurer l'impact de ces changements au niveau de l'activité de l'enzyme. L'accessibilité des substrats au centre du site actif dépend de l'encombrement de ces résidus disséminés autour de l'ion zinc et pourrait expliquer l'augmentation ou la diminution d'activité entre les deux enzymes.

Y41, le premier résidu choisi, sera remplacé par une valine retrouvée chez CphA. Le mutant généré sera intitulé Y63V, selon la numérotation standard établie pour les MBLs [25].



**Figure 15 : schéma du site actif de YEM-1 (vert) et de CphA (mauve).** Une tyrosine (flèche orange) prend place au lieu d'une valine (flèche rouge).

S197 et T127 de YEM-1 sont chacun remplacés par une F retrouvée chez CphA. Les mutants générés sont intitulés S236F et T158F selon la numérotation standard établie pour les MBLs [25].



**Figure 16 : schéma du site actif de YEM-1 (vert) et de CphA (mauve).** Une sérine et une thréonine (flèche orange) à la place de deux phénylalanines (flèche rouge) se font face.



## **3.2. Les souches bactériennes**

### **3.2.1. *E. coli* DH5α**

Souche utilisée pour les étapes de clonage (invitrogen). Son génotype est le suivant : F-Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1. L'expression des endonucléases et des recombinaisons est empêchée grâce à recA et endA. La qualité de préparation des plasmides s'en retrouve fortement améliorée.

### **3.2.2. *E. coli* Rosetta (DE3)**

Souche utilisée pour la production de la protéine étudiée. Son génotype est le suivant : F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>). Elle contient une copie chromosomique du gène codant pour la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur *lacUV5*. Le plasmide pLys porte le gène de résistance au chloramphénicol. Il contient aussi un gène exprimant constitutivement des faibles taux de lysozyme T7, réduisant ainsi l'expression basale des gènes recombinants en réduisant la production basale de la T7 RNA polymérase. Rosetta est une souche idéale pour la production de protéines possédant un certain nombre de codons rares (AGG, AGA, CUA, CGG, AUA, CCC, GGA) [26].

## **3.3. Milieux de culture**

Les milieux sont autoclavés à 121 °C à une surpression de 1 bar pendant 20 minutes. Ils sont ensuite conservés à 4 °C.

### **3.3.1. Milieu liquide LB (Luria-Bertani)**

Milieu riche utilisé pour la culture et la production de protéines recombinantes par *E.coli*. Il est composé de 5 g/L d'extraits de levure, 10 g/L de bacto-tryptone et 10 g/L de NaCl. Le milieu est amené à un pH de 7,0 à l'aide de NaOH 5N.

### **3.3.2. Milieu liquide LBA (Luria-Bertani)**

Milieu riche gélosé utilisé pour la transformation et la sélection de cellules d'*E.coli*. Il est composé de 5 g/L d'extraits de levure, 10 g/L de bacto-tryptone, de 10g /L de NaCl et de 20 g/L d'agar. Le milieu est amené à un pH de 7,0 à l'aide de NaOH 5N.

### **3.3.3. Milieu SOC (Super Optima broth with Catabolic repressor)**

Milieu riche utilisé dans l'étape finale de la transformation bactérienne afin d'obtenir une efficacité maximale de transformation des cellules compétentes d'*E.coli*. Il est composé de 5 g/L d'extraits de levure, 10 g/L de bacto-tryptone, 0,6 g/L de NaCl, 1,9 g/L de KCl, 2,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 2 g/L de MgCl<sub>2</sub> et 4 g/L de glucose. Le milieu est amené à un pH de 7,0 à l'aide de NaOH 5N.

### **3.3.4. Milieu liquide TB (Terrific Broth)**

Milieu riche utilisé pour la culture et la production des protéines recombinantes chez *E. coli*. L'importante quantité de tryptone permet aux bactéries de produire un meilleur rendement de plasmides. Il permet aussi, avec les extraits de levure, d'améliorer la production des protéines recombinantes. Il est composé de 12 g/900mL de tryptone, de 24g/900mL d'extraits de levure, de 2,31 g/100mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et de 6,43 g/100mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Les composés phosphates sont autoclavés séparément du reste de la solution. Du glycérol 40% sera finalement ajouté à raison de 4 mL pour 250mL de milieu.

## **3.4. Solutions d'antibiotiques**

Les solutions d'antibiotiques sont conservées à -20°C.

### **3.4.1. Kanamycine**

Antibiotique utilisé dans la sélection des cellules *E. coli* Rosetta(DE3) et *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) transformées avec pET26b/*yem-1*. C'est un complexe d'antibiotiques (kanamycine A, B et C) issus de *Streptomyces kanamyceticus* (*S. kanamyceticus*), ayant pour rôle d'altérer la sous-unité 16S du ribosome et par conséquent, d'inhiber la synthèse protéique chez la bactérie. Une solution stock de 50 mg/mL est réalisée dans de l'eau stérile. La concentration finale utilisée dans le milieu est de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (dilution 1/1000).

### **3.4.2. Chloramphénicol**

Antibiotique utilisé dans la sélection des cellules d'*E.coli* Rosetta(DE3) transformées avec pET26b/*yem-1*. Une solution stock de 30 mg/mL est préparée dans de l'éthanol 100 %. La concentration finale utilisée dans le milieu est de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (dilution 1/000).

## **3.5. Marqueurs**

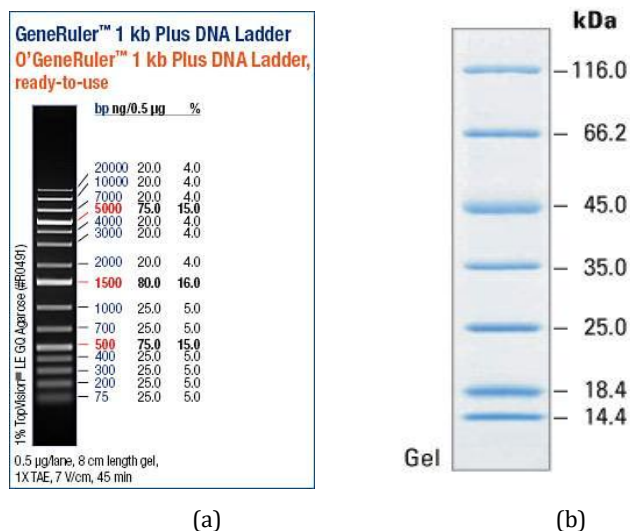
### **3.4.1. GeneRuler™ 1kb DNA ladder, ready-to-use**

Marqueur de poids moléculaire (ThermoScientific) constitué de mélange de fragments d'ADN. Il est utilisé pour déterminer la taille et quantifier un large éventail d'ADN double brin sur gels d'agarose (*Figure 18a*).

### **3.4.2. Unstained Protein Weight Marker**

Marqueur non coloré constitué d'un mélange de sept protéines natives (14,4kDa à 116kDa) utilisé en tant que standard de taille dans une électrophorèse SDS-PAGE (*Figure 18b*).





**Figure 18 : unstained Protein Weight Marker (Thermoscientific) (a) et O' GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Thermoscientific)**

### 3.5. Enzymes

#### 3.5.1. Enzymes de restriction

Enzyme	Site de restriction	Bouts générés	Fournisseur
<i>Nde1</i>	CATATG GTATAC	Bouts collants	Biolabs
<i>BamH1</i>	GGATCC CCTAGG	Bouts collants	Biolabs

**Tableau 1 : Séquences oligonucléotidiques utilisés pour le clonage du gène codant pour la protéine YEM-1 dans le plasmide pET26b.**

### 3.6. Amorces

Oligonucléotides	Séquences
Y63V <i>forward</i>	TGAGGACGACTATTATGTCAGAGAAAACCTCCATGGTTTACATTG
Y63V <i>reverse</i>	CAATGTAAACCATGGAGTTTCTCTGACATAATAGTCGTCCTCGA
S236F <i>forward</i>	AGAAATTAGGTAATTTGGCCCTTGCTAATATAAAGGAGTACCCTA
S236F <i>reverse</i>	TAGGGTACTCCTTTATATTAGCGAAGGCCAAATTACCTAATTTCT

**Tableau 2 : amorces utilisées pour la synthèse des mutants (Eurogentec). La mutation insérée est colorée en vert.**

Le tableau 2 donne les séquences nucléotidiques des oligonucléotides utilisés pour modifier les codons pour Y63 et S236.

### **3.7. Tampons et solutions**

Les tampons et solutions sont préparés à partir d'eau désionisée.

#### **3.7.1. Tampon MES (pH 6)**

Le MES (2-(N-morpholino) éthanesulfonique) est utilisé comme tampon majeur dans la production, la purification et la caractérisation de la protéine YEM-1. Il est composé de 195 g/L de MES hydraté. Le pH de la solution est ajusté à 6 par ajout d'une solution de NaOH 5N.

#### **3.7.2. Tampon HEPES (pH 7.5)**

L'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1pipérazine) est un composé organique zwitterionique utilisé comme tampon de préparation de la protéine YEM-1 pour la purification par affinité sur colonne ZN-PDC-4FF. Il est composé de 238 g/L d'HEPES hydraté. Le pH de la solution est ajusté à 7,5 par ajout d'une solution de NaOH 5N.

#### **3.7.3. Tampon TGS**

Tampon de migration utilisé lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Il est composé de Tris-HCL 25 mM, de glycine 192 mM et de SDS 0,1% (vol/vol).

#### **3.7.4. Tampon TAE (pH 8)**

Tampon utilisé en électrophorèse sur gel agarose pour la séparation des acides nucléiques tels que l'ADN ou l'ARN. Il est composé de 242 g/L de TrisBase, de 57,1 mL d'acide acétique glacial 100 %, de 100 mL d'EDTA 0,5 M ajusté à un pH de 8,0 par ajout d'une solution de NaOH 5N.

#### **3.7.5. IPTG**

L'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich) est utilisé comme analogue de l'allolactose, un métabolite impliqué dans l'activation de la transcription de l'opéron lactose. Une solution stock est préparée à une concentration de 100 mM et stérilisée par filtration sur un filtre de porosité 0,22  $\mu$ m.

#### **3.7.6. Bleu dénaturant 5x**

Solution utilisée lors des SDS-PAGE, pour soumettre les échantillons protéiques à un prétraitement dénaturant. Elle est composée de tampon Tris-HCL 0,5M pH 6,8, de  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,1 %, de SDS 10% (w/v) dans l'H<sub>2</sub>O, de glycérol (25 %, v/v), de bleu de bromophénol. Elle est amené à 10 mL avec de l'eau désionisée.

### 3.7.7. Pageblue protein staining solution

Solution de Coomassie G-250 colloidal utilisée pour colorer les protéines dans les gels de polyacrylamide. Cette solution ne contient pas de méthanol ou d'acide acétique.

### 3.8. Gène *yem-1*

Le gène *yem-1* (Tableau 3) isolé à partir de l'ADN génomique, a été amplifié par PCR à partir des oligonucléotides synthétiques permettant d'introduire les sites des enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI* de part et d'autres du gène. Le fragment a ensuite été cloné dans le plasmide pET26b. Ce plasmide possède un marqueur de sélection à la kanamycine et contient le gène d'intérêt codant pour la protéine YEM-1.

Nom de la souche	<i>Yersinia mollaretii</i> ATCC 43969 contig00758
Longueur du gène (nucléotides)	738
Protéine mature (acides aminés)	226
Poids moléculaire théorique (Da)	25634.27
pI	6.52
Coefficient d'extinction molaire ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	38850

Tableau 3 : paramètres de la protéine codée YEM-1

```

      10      20      30      40      50      60
SKIALVKLSD NLYVVEDDY YRENSMVIIG KDYITVIGAT WTPDTAKELD AQIKKISKKP

      70      80      90     100     110     120
IAEVINTNYH TDRAGGNLYW KSIGAELIST KMTYNLMEKH WQDILETTRK GYDGFDPDIPL

     130     140     150     160     170     180
VLPTKTFDNN FELQNGEIKI IYTGESHTPD GIFVYFPKEK TLYGNCCIKE KLGNLASANI

     190     200     210     220
KEYPKTLQKL KNLNLDIKTV VGGHDSPIHG SELIDSYKKL IEAANK
```

Figure 19 : séquence protéique mature de YEM-1

## 4. Méthodes

### 4.1. Biologie moléculaire

#### 4.1.1. Préparation des cellules compétentes *E. coli*

2 mL de milieu LB sont inoculés à partir d'une suspension d'*E. coli* prélevée à partir d'un glycérol stock conservé à -80 °C. La préculture est incubée à 37 °C toute la nuit sous agitation orbitale (New Brunswick Scientific, Excella E24, incubator shaker series). La préculture est alorsensemencée à 100 mL de milieu LB. La culture est incubée à 37 °C sous agitation orbitale jusqu'à atteindre une absorbance à 600 nm comprise entre 0.6 et 0.9. La culture est partagée dans deux falcons de 50 mL, puis centrifugée 10 minutes à 4000 g (Beckman, GH-3.8). Chaque culot est resuspendu dans 8,5 mL de solution glacée de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Ils sont ensuite incubés 25 minutes sur glace. La suspension est alors centrifugée 10 minutes à 4000 g (Beckman, GH-3.8). Les bactéries sont alors compétentes. Les culots sont resuspendus dans 1,2 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM et 1,15 mL de glycérol 40 % stérile pour remettre le culot en suspension sans vortexer. La solution est alors aliquotée dans des eppendorfs autoclavés à raison de 100 µL, puis immédiatement plongés dans de la carboglace pour être finalement stockés à -80 °C.

#### 4.1.2. Transformation des cellules compétentes d'*E.coli*

La transformation des cellules compétentes repose sur l'application d'un choc thermique qui entraîne l'élargissement des pores membranaires et donc, l'entrée de l'ADN cible dans la cellule. La transformation avec les cellules *E. coli* DH5α est utilisée dans le but de pouvoir effectuer la production massive de plasmides. La technique utilisée avec les cellules *E.coli* Bl21(DE3) ou encore Rosetta est plutôt employée pour l'introduction du matériel ADN dans les bactéries.

Les cellules bactériennes sont ici transformées par le plasmide pET26b. 50 ng de plasmide sont ajoutés à 100 µL d'une suspension de cellules bactériennes. La solution est incubée à 4 °C pendant 30 minutes. Un choc thermique à 42 °C est appliqué pendant 45 secondes, suivi par 2 minutes d'incubation sur glace. 300 µL de milieu SOC sont ensuite ajoutés à la solution de cellules transformées, puis incubé 1 h à 37 °C (New Brunswick Scientific, Excella E24, incubator shaker series). Le mélange est ensuite étalé sur boîte de Petry de milieu LBA additionné à/aux l'antibiotique(s) appropriés (kanamycine/pET26b (*E. coli* DH5α), kanamycine+chloramphénicol/pET26b (*E. coli* Rosetta)) puis incubé toute une nuit à 37°C.

#### 4.1.3. Extraction et purification d'ADN plasmidique

La purification de l'ADN plasmidique à partir des bactéries est connue aussi sous le nom de miniprep. Elle repose sur la lyse de la bactérie et la séparation de l'ADN bactérien de l'ADN plasmidique. Dans ce cas, le kit Thermoscientific « GeneJet Plasmid Miniprep Kit » est utilisé pour extraire les plasmides issus des cultures d'*E.coli* DH5α. Le kit contient trois solutions

(resuspension, lyse et neutralisation) et repose sur l'utilisation d'une colonne de centrifugation composée d'une membrane à base de silice dans le but d'extraire l'ADN plasmidique.

#### **4.1.4. Détermination de la concentration en ADN**

La concentration en l'ADN plasmidique est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovue™ (GE Healthcare). Cet appareil calcule la concentration sur base de la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon \cdot l \cdot C$  ( $A$ = absorbance,  $\epsilon$ = coefficient d'extinction molaire,  $l$ = largeur de la cuvette en cm et  $C$ = concentration de la solution en mol/L à la longueur d'onde  $\lambda$ ).

#### **4.1.5. Visualisation sur gel agarose**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique permettant de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Pour la préparation du gel, la poudre d'agarose est diluée dans du tampon TAE 1x, puis portée à ébullition pour permettre la solubilisation du composé solide. Le mélange est ensuite coulé dans un support approprié.

Le principe repose sur l'application d'un champ électrique dans un appareillage doté d'une anode (électrode positive) et d'une cathode (électrode négative). Les échantillons portant une charge négative sont déposés sur gel où ils vont migrer dans un sens prédéfini, de la borne négative à la borne positive. La vitesse de migration dépend du voltage appliqué, de la concentration en agarose du gel (1 à 2%), de la taille et de la charge des fragments étudiés. Le Midori Green (Nippon Genetics Europe GMBH) ajouté dans le gel lors de sa préparation est un colorant permettant la révélation des échantillons par fluorescence UV (Visidoc-it™ imaging system @UVP). Il est aussi possible d'utiliser le bromure d'éthidium, un agent intercalant, pour l'étape de révélation. Le gel est trempé quelques minutes dans une solution de bromure d'éthidium, puis rincé avec du tampon TAE1X. Le matériel génétique est ensuite révélé au moyen d'une fluorescence sous UV.

Les échantillons sont mélangés avec du glycérol pour les alourdir et empêcher la sortie des échantillons des puits. La densité du gel dépend de la taille des fragments (par exemple, 1% pour des fragments de 200 à 10 000pb). Un marqueur de poids moléculaire est ajouté dans un puits dans le but de pouvoir estimer la taille des fragments.

#### **4.1.6. Réaction de polymérisation en chaîne**

La technique de PCR permet d'amplifier, *in vitro*, un fragment d'ADN spécifique à partir de deux amorces appelées oligonucléotides. Elle est réalisée dans un thermocycleur (Biorad, T-100 Thermal Cycler) et se déroule en trois grandes étapes basées sur la variation de température. La première étape est la dénaturation qui se déroule à 95 °C et qui consiste en la séparation des deux brins d'ADN. La deuxième étape est l'hybridation, pendant laquelle les amorces vont

s'hybrider avec les simples brins d'ADN complémentaires. La température à cette étape dépend de l'oligonucléotide utilisé et varie ici entre 50°C et 60°C. Pour finir, en présence de désoxyribonucléotides et à une température ajustée en fonction du type de polymérase utilisée, une DNA polymérase thermophile synthétise le brin complémentaire à partir de l'oligonucléotide hybridé comme amorce. Les polymérases fonctionnent en général entre 68 et 72 °C. Cette étape est l'élongation. Pour une amplification suffisante, 30 cycles sont jugés corrects. Une dernière étape d'élongation de 5 minutes permet d'optimiser l'allongement des fragments. Le produit PCR obtenu est alors détecté par électrophorèse sur gel d'agarose.

#### 4.1.7. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est réalisée à l'aide du kit Q5 site-directed Mutagenesis kit. Le principe repose sur l'introduction de mutations, à l'aide d'amorces portant la ou les mutations, sur le plasmide double brin méthylé superenroulé contenant l'insert d'intérêt. Les oligonucléotides servant d'amorces sont repris dans le tableau 2 (cf §3.6). Dans un volume total de 50 µL, le milieu réactionnel se compose de :

Sans DMSO	Avec DMSO 1%
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 µL de master-mix 2x Q5 (</li> <li>- 1 µL d'ADN matrice ( &lt; 1000 ng)</li> <li>- 0,5 µL d'oligonucléotide « forward » (10 µM)</li> <li>- 0,5 µL d'oligonucléotide « reverse » (10 µM)</li> <li>- 23 µL d'eau stérile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 µL de master-mix 2x Q5 (</li> <li>- 1 µL d'ADN matrice ( &lt; 1000 ng)</li> <li>- 0,5 µL d'oligonucléotide « forward » (10 µM)</li> <li>- 0,5 µL d'oligonucléotide « reverse » (10µM)</li> <li>- 1 µL DMSO 100%</li> <li>- 22 µL d'eau stérile</li> </ul>

**Tableau 4 : mélanges réactionnels PCR utilisés.**

Le DMSO (diméthylsulfoxyde) est un solvant polaire organique utilisé comme agent additif en PCR afin d'améliorer l'amplification des régions riche en GC. Il atténue la formation de structures secondaires qui peuvent se former dans les amorces monocaténares. Il vient se lier sur l'ADN au niveau du résidu cytosine et change sa conformation, rendant l'ADN plus labile. Il augmente cependant le risque d'amplicons non spécifiques. Il est utilisé ici pour générer le mutant *s236f*, dont les amorces présentent des risques de formation de structures secondaires.

La solution « mastermix Q5 » est un mélange composé de l'ADN polymérase Q5 (une polymérase thermostable dotée d'une activité exonucléase 3' → 5' et fusionnée à un domaine Sso7d améliorant sa processivité), d'un mélange de dNTPs (200 µM\*), de Mg<sup>2+</sup> (2 mM\*) et de tampon Q5 ( \* = concentration finale). Cette solution stock est concentrée 2x.

La réaction se déroule en trois étapes (*Figure 20*). L'ADN matrice va être préalablement dénaturé à une température de 98 °C pendant 30 secondes, avant d'être soumis à 30 cycles d'amplification. Chaque cycle d'amplification se déroule comme suit : dénaturation de 10

secondes à 98 °C, une étape d'hybridation de 5 minutes à 55 °C et une étape d'élongation de 30 secondes à 72 °C. Une étape finale d'élongation à 72 °C de 5 minutes assure l'intégrité de des amplifications. Ensuite, le mélange réactionnel est incubé une heure à 37 °C en présence de 10 unités d'enzyme *DpnI*, ce qui permet de digérer l'ADN méthylé et hémiméthylé du plasmide parental. Enfin, une étape de transformation (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) est réalisée avec 5  $\mu$ L du mélange réactionnel final.

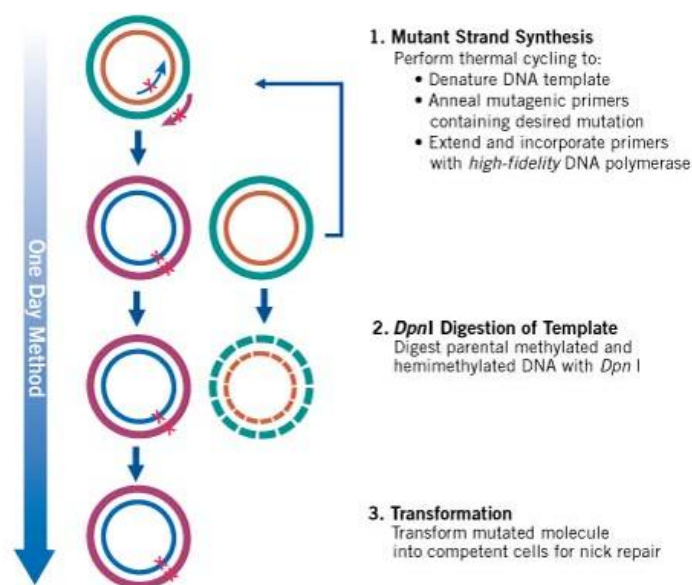


Figure 20 : étapes de la mutagenèse dirigée (QuickChange, agilent)

Ce protocole a été modifié pour produire la mutation du gène *yem-1* permettant de produire le mutant S236F. Un gradient de température de 50 à 60 °C est utilisé pour l'étape d'hybridation.

#### 4.1.8. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est basé sur la technique de terminaison des chaînes en présence de didésoxynucléotides (Sanger et al, 1997). Les clones recombinants identifiés, les plasmides sont extraits par minipreps puis séquencés afin de vérifier l'intégrité de la séquence. 400 à 500 ng de plasmide recombinant sont mélangés de l'eau stérile et 10  $\mu$ L d'amorce (T7 *forward* primer, T7 *reverse* primer) pour atteindre un volume final de 20  $\mu$ L. Les échantillons sont envoyés à la plateforme Génomique du GIGA (ULiège) pour l'étape de séquençage.

#### 4.1.9. Stock glycérol bactérien

Les stocks glycérols permettent le stockage à long terme de plasmides. Ils évitent de devoir refaire des cellules compétentes et des transformations. Le glycérol stabilise les bactéries congelées et évite aux membranes cellulaires de s'endommager pendant la congélation. La conservation des plasmides se fait à -80 °C et peut-être préservé durant plusieurs années.

Un clone est prélevé pour ensemer 10 mL de milieu LB liquide, mis à incuber une nuit à 37 °C (Eppendorf, Innova® 40). La culture est centrifugée 20 minutes à 4000 g (Beckman, GS-6R). Le culot bactérien est resuspendu dans 1 mL de milieu LB/glycérol. Le mélange final est conservé à -80 °C.

## **4.2. Méthodes liées aux protéines**

### **4.2.1. Visualisation sur gel de polyacrylamide**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis) est une technique permettant la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente sous l'effet, d'un champ électrique. Les protéines sont préalablement soumises à un traitement dénaturant : le  $\beta$ -mercaptoéthanol va rompre les ponts disulfures alors que le SDS va entraîner la dénaturation de la protéine et lui conférer une charge nette négative. L'ensemble des échantillons portant une charge négative, les protéines vont migrer vers l'anode et seul leur poids moléculaire sera fonction de leur séparation.

Avant chargement sur gel, les échantillons sont mélangés avec du bleu dénaturant dans un volume final de 30  $\mu$ L puis portés à ébullition pendant 5 minutes. Cette étape thermique permet de dénaturer l'ensemble des protéines de l'échantillon.

La technique se déroule dans une cuve à électrophorèse remplie de tampon de migration TGS dans laquelle repose un système anode/cathode où se retrouve imbriqué le gel. 15 à 20  $\mu$ L d'échantillon sont chargés dans chaque puit. Le marqueur de poids moléculaire Unstained Protein Weight Marker (Thermoscientific) est déposé sur gel comme référence standard pour estimer la taille des protéines étudiées. La migration se déroule à 120 volts pendant 50 minutes. Le gel est ensuite soumis à deux lavages à l'eau désionisée puis colorer avec une solution PageBlue™ Protein Staining Solution. Finalement, le gel est décoloré avec de l'eau désionisée. Les gels utilisés sont des gels commerciaux pré-coulés 4 % - 20 % (Biorad, mini Protean ® TXG™).

### **4.2.2. Production de protéines**

#### **4.2.2.1. Test de production et d'activité**

Une colonie de *E. coli* Rosetta(DE3)/pET26b-*yem1* est utilisée pour ensemer 3 mL de milieu LB additionné à l'antibiotique de sélection. La préculture est incubée à 37 °C toute une nuit (New Brunswick Scientific, Excella E24, incubator shaker series). 100 mL de milieu de TB additionnés à l'antibiotique de sélection sont inoculés avec la préculture puis incubés à 37 °C (New Brunswick Scientific, Innova 24) jusqu'à atteindre une absorbance à 600 nm entre 0,6 et 0,9. La culture est induite avec une solution d'IPTG à une concentration finale de 100  $\mu$ M puis incubée à 18 °C toute la nuit sous agitation orbitale (New Brunswick Scientific, Innova 24). 1 mL de culture



est prélevé pour être centrifugé 10 minutes à 3400 g (Eppendorf Centrifuge 5424). Le surnageant est récupéré et le culot bactérien resuspendu dans 750 µL de tampon MES 50 mM pH 6.0 correspond à la fraction insoluble. Les échantillons sont ensuite soumis à 3 cycles de sonication puis centrifuger 30 minutes à vitesse maximale (Eppendorf Centrifuge 5424) à 4 °C pour faire culotter la fraction insoluble et séparer le surnageant contenant les protéines solubles. Finalement, le surnageant est récupéré et le culot bactérien est resuspendu dans 750 µL de tampon MES 50 mM pH 6.0.

L'activité enzymatique des différents échantillons est mesurée de la manière suivante. L'imipénème 100 µM sert de substrat à l'enzyme YEM-1. Il est préparé dans du tampon MES 50 mM pH 6.0. Dans une cuvette en quartz de 1 cm, 5 µL de solution sont ajoutées à 495 µL de substrat (imipenem 100 µM). L'évolution de l'absorbance à 300 nm est suivie en fonction du temps. La valeur de la vitesse initiale d'hydrolyse de l'imipénème est assimilée à l'activité de notre échantillon.

Finalement, les échantillons sont chargés sur gel SDS-PAGE 16% : 24 µL d'échantillons mélangés à 6 µL de bleu dénaturant (4x), préalablement portés à ébullition pendant 5 minutes puis déposés sur gel.

#### **4.2.2.2. Production**

##### **4.2.2.2.1. Pré-culture**

Le vecteur pET26b/*yem-1* est utilisé pour transformer par choc thermique des cellules compétentes *E. coli* Rosetta(DE3). Le mélange est étalé sur milieu LBA additionné de kanamycine (50 µg/mL) et de chloramphénicol (30 µg/mL) puis incubé à 37°C toute une nuit. 3 mL de préculture de milieu LB additionné de kanamycine (50 µg/mL) et de chloramphénicol (30 µg/mL) sont inoculés avec une colonie. La solution est incubée 3 à 4 heures à 37 °C sous agitation orbitale jusqu'à observer un trouble de la solution ( $A^{600} \approx 0.3$ ). La préculture est ensuite ajoutée à 100 mL de milieu LB additionné de kanamycine (50 µg/mL) et de chloramphénicol (30 µg/mL). La préculture est incubée toute la nuit à 37 °C sous agitation orbitale (New Brunswick Scientific, Excella E24, incubator shaker series).

##### **4.2.2.2.2. Culture**

Une culture de 1 L de milieu LB additionnée de kanamycine (50 µg/mL) et de chloramphénicol (30 µg/mL) est inoculée avec un volume de préculture correspond à 1/50ème du volume de la préculture. La solution est alors incubée à 37 °C sous agitation orbitale (New Brunswick Scientific, Excella E24, incubator shaker serie). Lorsqu'une absorbance à 600 nm entre 0,6 et 0,9 est atteinte, la culture est induite par ajout d'une solution d'IPTG à une concentration finale de

100  $\mu$ M puis est incubée une nuit à 18 °C sous agitation orbitale (New Brunswick Scientific, Excella E24, incubator shaker serie).

#### **4.2.2.2.3. Extraction protéines cytoplasmiques**

La culture est centrifugée 20 minutes à 12000 g (Beckman Coulter, JA-10) à 4 °C. Les culots sont resuspendus dans 8 mL de tampon MES 50 mM pH 6.0. Une tablette d'inhibiteurs de protéases (Roche, complete mini EDTA-free) est ajoutée avant le traitement lytique du mélange au disrupteur (Emulsifex C3). La suspension bactérienne est alors soumise à quatre cycles à haute pression puis centrifuger 45 minutes à 48000 g (Beckman Coulter, JA-20) à 4 °C. Le surnageant correspondant à l'extrait brut de la protéine est récupéré.

Des tests d'activité comme décrits plus haut (cf. §4.2.2.1.) sont réalisés pour s'assurer de la présence de la protéine étudiée dans l'extrait brut.

#### **4.2.2.2.4. Dialyse**

Après s'être assuré de la présence de l'enzyme étudiée et avant les étapes de purification par chromatographie, une dialyse est réalisée pour éliminer les excédents de sels potentiels. L'échantillon est déposé dans un boudin de dialyse dont le diamètre des pores est inférieur à la taille de la protéine (cut off de 12 000 à 14 000) et dialysé contre un volume de tampon MES 50 mM pH 6.0 cent fois supérieur au volume de l'échantillon, une nuit à 4°C.

### **4.2.3. Purification des protéines**

Pour atteindre une pureté idéale de la protéine YEM-1 sauvage et du mutant Y63V, trois étapes de purification se sont révélées nécessaires. Chaque étape se compose de trois procédures communes : fixation, purification, élution. Toutes les solutions utilisées pour la purification sont filtrées au travers d'une membrane de porosité égale à 0,22  $\mu$ M. L'absorbance à 280 nm de l'éluat est mesuré en continu et permet de cibler les fractions pouvant contenir notre protéine d'intérêt.

Après chaque étape de purification, des tests cinétiques sont réalisés pour distinguer les fractions contenant l'activité  $\beta$ -lactamasique. La vitesse initiale d'hydrolyse d'une solution d'imipénème 100  $\mu$ M préparée dans du tampon MES 50 mM pH 6.0. est mesurée à 300 nm. Les fractions les plus actives sont déposées sur gel SDS-PAGE pour en évaluer la pureté. Les fractions les plus pures sont alors réunies pour la prochaine étape de purification ou pour être stockées à -20 °C après détermination de la concentration protéique.

#### **4.2.3.1. Chromatographie échangeuse cationique**

La première étape de purification est une chromatographie échangeuse d'ions. Elle repose sur la séparation des protéines en fonction de la charge sur leur surface nette, à travers des

interactions électrostatiques qui se forment entre les protéines et la phase stationnaire chargée [27].

L'extrait brut est chargé sur deux colonnes Hitrap™ SP HP 5 mL (GE Healthcare) préalablement équilibrées avec du tampon MES 50mM pH 6.0. La résine utilisée est composée de sulfopropyl, un ligand chargé négativement. La protéine possède un point isoélectrique de 6.5. Elle va se fixer à la colonne et sera récupérée par une élution avec un gradient linéaire en NaCl (0 à 1 M) réalisé sur dix volumes de colonne, à un débit de 2 mL/min.

#### **4.2.3.2. Chromatographie d'affinité**

La protéine purifiée sur HiTrap™ est préalablement dialysée dans du tampon HEPES 50 mM pH 7.5, tampon requis pour la second étape de purification. L'extrait purifié sur Hitrap™ SP-HP, chargé dans un boudin de dialyse (cut off 12000-14000) est dialysé contre un volume de tampon HEPES 50 mM pH 7.5 cent fois supérieur au volume de l'échantillon, pour une nuit à 4 °C sous agitation orbitale faible.

La chromatographie d'affinité repose sur la fixation spécifique et réversible d'une protéine à un ligand lié à la matrice. La résine composée d'un chélateur de pentadentate couplé à la sépharose va former un complexe avec la protéine d'intérêt.

La protéine dialysée est chargée sur colonne Zn-PDC-4FF 5 mL préalablement équilibrée avec du tampon HEPES 50 mM pH 7.5. La résine utilisée repose sur l'affinité du zinc et va interagir avec les protéines étudiées. L'élution est réalisée avec un gradient linéaire en NaCl (0 à 1 M) sur dix volumes de colonne, à un débit de 2 mL/min. Sur base des résultats sur gel SDS-PAGE, les fractions pures sont réunies et dialysées dans du tampon MES 50 mM pH 6.0.

#### **4.2.3.3. Tamis moléculaire**

Le tamis moléculaire repose sur la séparation des protéines en fonction de leur taille. Les protéines les plus grosses passeront en première, suivies des plus protéines les plus petites [27].

L'extrait de protéines est chargé sur une colonne de 75 mL Superdex™ 10/300 préalablement équilibrée avec du tampon MES 50 mM pH 6.0 (AKTA Explorer). Les fractions purifiées sont récupérées, soumises à des tests cinétiques puis déposées sur gel SDS-PAGE.

Des aliquots de YEM-1 (100 µL) à une concentration de 0,3 mg/mL sont conservés à -80 °C.

#### **4.2.4. Détermination de la concentration en protéine**

La concentration de la protéine est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm au spectrophotomètre (Analytik Jena, Specord 50). La concentration est calculée au moyen de la loi de Beer-Lambert  $A = \epsilon \cdot l \cdot C$  ( $A$ = absorbance,  $\epsilon$ = coefficient d'extinction molaire,  $l$ = largeur de la

cuvette en cm et C= concentration de la solution en mol/L à la longueur d'onde  $\lambda$ ) où l'absorbance est proportionnelle à la concentration.

#### 4.2.5. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique utilisée pour déterminer la masse moléculaire. Le principe général de la technique repose sur l'ionisation du composé sous forme gazeuse, conduisant à l'accélération puis la séparation des ions et enfin, à leur détection. ESI (electrospray ionization) est la méthode d'ionisation par électro-nébulisation utilisée pour l'analyse de nos protéines. Elle consiste à ioniser les protéines en solution. Sous l'effet d'un gaz ioniseur, la solution est vaporisée. Les ions sont ensuite accélérés selon la méthode TOF (Spectrométrie à temps de vol). Les ions, soumis à une même quantité d'énergie, portent une charge négative commune mais développent une vitesse dépendant de leur rapport masse/charge. Ils atteignent le détecteur à des temps différents [28]. Dans le cadre de ce travail, la protéine mutante Y63V sera soumise à la méthode ESI pour pouvoir déterminer sa masse. Cette partie du projet a été réalisée au sein de la plateforme protéomique (LSM-ULiege).

#### 4.2.6. Caractérisation cinétique

Le profil d'activité de YEM-1 sauvage et du mutant Y63V a été étudié avec différentes familles de composés à noyau  $\beta$ -lactames comme les carbapénèmes, une pénicilline et des céphalosporines. Ils sont préparés dans du tampon MES 50 mM pH 6. Les expériences sont réalisées à 30 °C dans une cuvette en Quartz SUPRASIL® de trajet optique 1 cm. Les mesures d'activité sont effectuées grâce à un spectrophotomètre (Analytik Jena, Specord 50) à des longueurs d'ondes spécifiques du substrat utilisé (Tableau 7). Les valeurs de vitesses initiales d'hydrolyse des antibiotiques sont mesurées au moyen du programme WinAspect.

Sur base de la méthode des vitesses initiales, les résultats sont portés en graphique ([S] en fonction de v) formant la courbe de Michaelis-Menten. La linéarisation d'Hanes-Wolf permet ensuite d'extraire les valeurs  $k_{cat}$  (nombre de molécules de substrat hydrolysées par molécule d'enzyme par seconde) et  $K_m$  (concentration en substrat permettant d'obtenir une vitesse d'hydrolyse égale à la moitié de la vitesse maximum V) :

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{[S]}{V}$$

Où la représentation graphique de  $\frac{[S]}{v}$  en fonction de [S] est une droite de pente  $\frac{1}{V}$  et d'ordonnée à l'origine  $\frac{K_m}{V}$ . La constante catalytique  $k_{cat}$  est déterminée par la division de V par  $[E_0]$ .

Antibiotiques	$\lambda$ (nm)	$\Delta\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
Imipénème	300	9000
Biapénème	294	9960
Ertapénème	295	9970
Meropénème	298	6500
Doripénème	296	7540
Benzypénicilline	235	775
Céfotaxime	260	7500
Céphaloridine	260	10000

**Tableau 5 : antibiotiques pour la caractérisation cinétique de l'enzyme sauvage YEM-1 et des mutants.**  
Préparation des solutions dans du tampon MES 50mM pH 6.

#### 4.2.6.1. Test aux métaux

L'activité résiduelle des différentes enzymes est mesurée en présence de concentration croissante (0 à 4 mM) en métaux (zinc, cobalt, cadmium). Le substrat utilisé est l'imipénème 100  $\mu$ M.

#### 4.2.6.2. Inactivation par des agents chélatants

L'inactivation de l'activité résiduelle de l'enzyme en fonction de la concentration croissante (0 à 4 mM) en agents chélatants est mesurée au cours du temps. Le substrat utilisé est celui avec lequel l'enzyme possède la meilleure efficacité catalytique, l'imipénème (à une concentration de 100  $\mu$ M). Les agents chélatants utilisés sont l'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), l'acide dipicolinique et la phénantroline.

L'inactivation potentielle par des agents chélatants (EDTA 0 à 4 mM, acide dipicolinique 0 à 60  $\mu$ M et phénantroline 0 à 100  $\mu$ M) est suivie dans du tampon MES 50 mM pH 6.0.

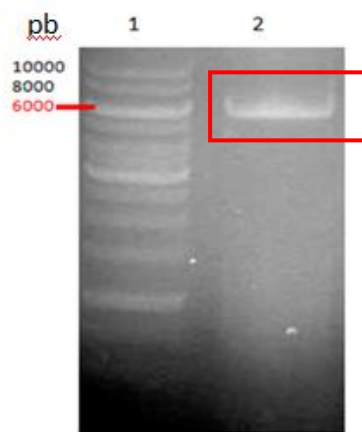
## 5. Résultats et discussion

### 5.1. Biologie moléculaire

- Mutagenèse dirigée

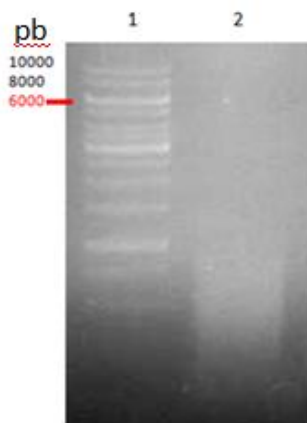
La mutagenèse dirigée est utilisée dans le cas de ce mémoire pour muter une à plusieurs bases du gène *yem-1* dans le but de produire des protéines mutées, respectivement en position 63 (Y63V) et 236 (S236F). Pour cela, des oligonucléotides synthétiques fournis par Eurogentec et portant la mutation souhaitée ont été utilisés afin de muter l'ADN matriciel pET26b-*yem-1* au moyen de plusieurs cycles PCR.

Une fois cette étape réalisée, les produits PCR sont séparés sur gel agarose 1% où le vecteur pET26b-*yem-1* est retrouvé grâce à sa taille se situant aux alentours de 6 kbp.

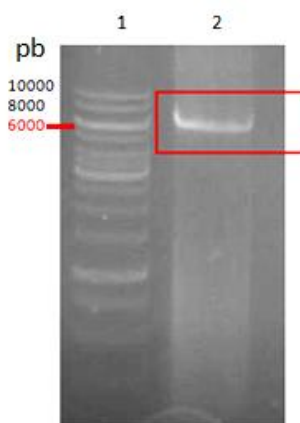


**Figure 21 : analyse par gel agarose 1% du mutant *y63v* (amplifié avec les amorces synthétiques *y63v reverse* et *forward*)**

1. marqueur de poids moléculaire
2. *y63v* amplifié



(a)



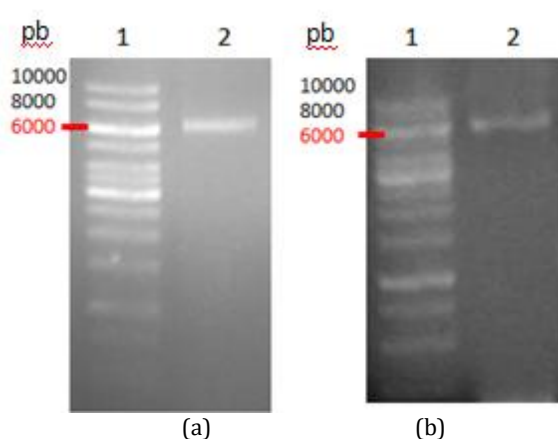
(b)

**Figure 22 : analyse par gel agarose 1% du mutant *s236f* (amplifié avec les amorces synthétiques *s236f reverse* et *forward*) (a) et en présence de DMSO (b).**

- (a)
3. marqueur de poids moléculaire
  4. *s236f* amplifié

- (b)
1. Marqueur de poids moléculaire
  2. *s236f* (DMSO 1%) amplifié

Les amplicons obtenus pour générer le mutant *y63f* sont de taille attendues (*Figure 21*). Afin de pouvoir obtenir un amplicon du gène codant pour le mutant *s236f*, du DMSO à une concentration finale de 1% a été ajouté au mélange réactionnel de la PCR (*Figure 22a et 22b*). Les produits amplifiés ayant la taille désirée (~ 6kpb) sont ensuite digérés avec l'enzyme de restriction *DpnI* afin d'éliminer le plasmide méthylé matriciel. L'échantillon digéré est à nouveau analysé sur gel agarose 1% afin de vérifier si la bande préalablement observée sur gel correspond au plasmide méthylé non digéré ou au produit amplifié. Si la bande a disparue après digestion, cela indique que l'amplification n'a pas fonctionné.



**Figure 23 : analyse par gel agarose 1% de la digestion par *DpnI* des produits amplifiés des mutants *y63v* (a) et *s236f* (b)**

- (a)
- 5. marqueur de poids moléculaire
  - 6. *y63v* digéré
- (b)
- 3. marqueur de poids moléculaire
  - 4. *s236f* (DMSO 1%) digéré

Les deux mutants digérés présentent toujours une bande à la taille souhaitée (*Figure 23*), indiquant que le vecteur pET26b-*yem-1* a bien été amplifié. Dès lors, des cellules compétentes d'*E. coli* DH5α sont transformées par les produits de digestion et les transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar contenant 50 µg/mL de kanamycine. En ce qui concerne le mutant *y63v*, trois clones ont été préparés pour être séquencés. Deux de ces clones possèdent la mutation voulue (*Figure 24a*). Pour le mutant *s236f*, deux clones seulement ont été envoyés au séquençage et un seul possède la mutation (*Figure 24b*). Une fois les mutants d'intérêts isolés, ils sont prêts pour la phase de production.

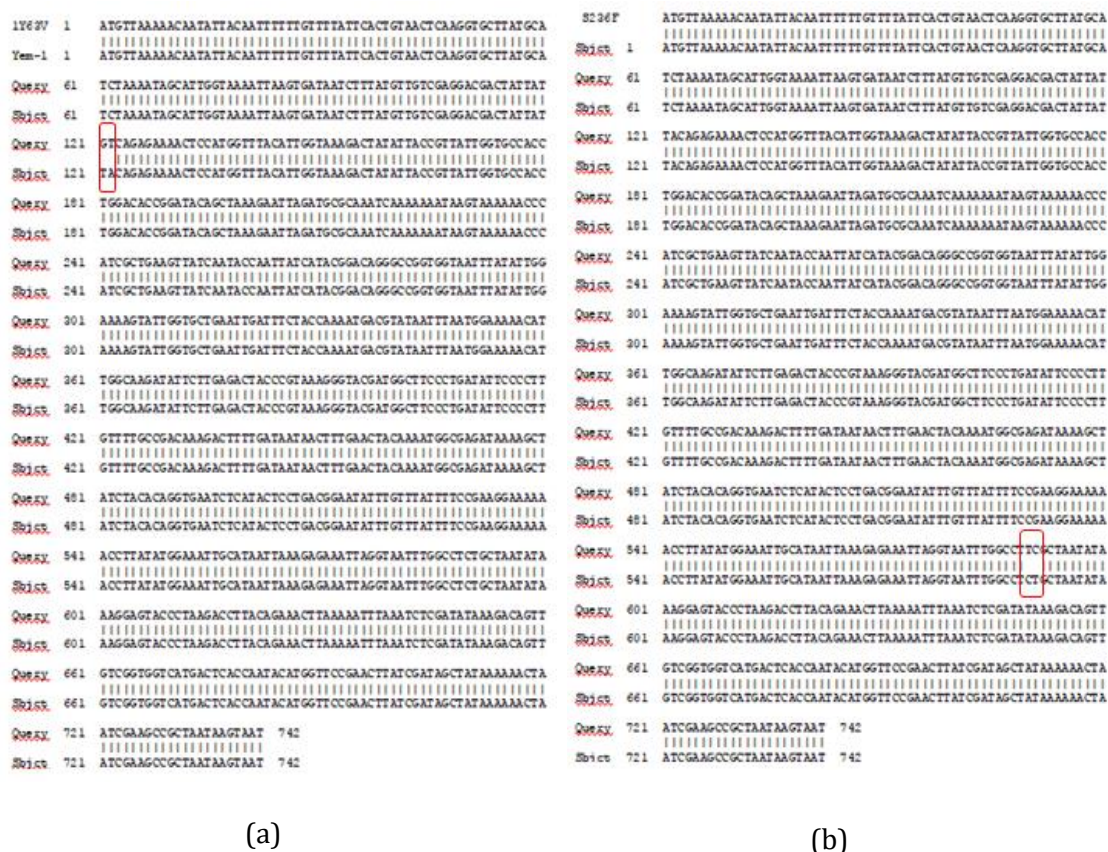


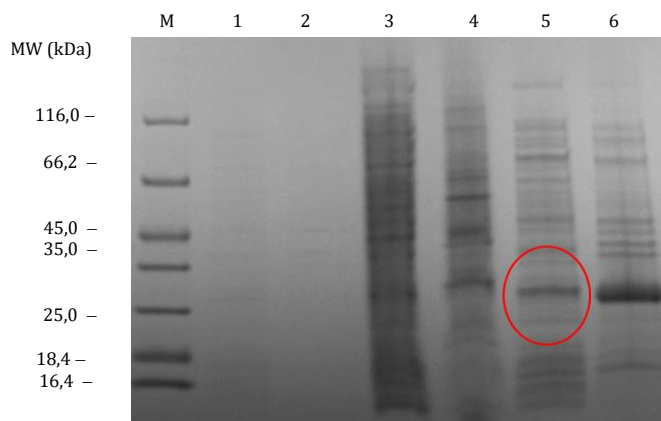
Figure 24 : alignement de séquences entre le mutant y63v clone 1 (query) (a) ou le mutant s236f clone 1 (query) et le sauvage yem-1 (subject) (b). La présence des mutations souhaitées est entourée en rouge.

## 5.2. Production et purification de la protéine YEM-1 et du mutant Y63V

### 5.2.1. Test de production du mutant Y63V

Sur base des conditions utilisées pour l'enzyme sauvage YEM-1, le plasmide codant pour la protéine mutante Y63V a été transformé dans *E.coli* Rosetta(DE3) et sélectionné sur milieu LBA additionné d'antibiotiques (kanamycine/chloramphénicol). L'utilisation d'*E.coli* Rosetta(DE3) s'explique par la présence de codons rares retrouvés dans la séquence nucléotidique (cf. §3.2). Cette souche possède un plasmide lui permettant de produire des tRNAs à anticodons rares, favorisant une surproduction de la protéine. L'un des clones récupérés sur boîte de Petry est ensuite cultivé en milieu TB, à deux températures différentes (37 °C avant induction, 18 °C après induction). La production de la protéine d'intérêt est induite après l'ajout d'1 mM d'IPTG lorsqu'une turbidité recommandée est atteinte ( $A_{600nm} = 0,6$  à  $0,9$ ). Les bactéries sont ensuite lysées au disrupteur. La fraction soluble, isolée après centrifugation, est soumise à trois étapes de purification.





**Figure 25 : analyse par SDS-PAGE (gel pré-coulé 4-20%) du test de production de la protéine Y63V par *E. coli* Rosetta.**

M : marqueur de poids moléculaire  
 1 : T0 soluble (surnageant)  
 2 : T0 insoluble (culot resuspendu)  
 3 : non induit soluble  
 4 : non induit insoluble  
 5 : induit soluble (18h)  
 6 : induit insoluble (18h)

La Figure 25 indique que la protéine s'est bien produite sous forme soluble. Toutefois, une large bande est aussi présente dans la fraction insoluble après induction. Afin de confirmer cette observation, l'activité enzymatique de la fraction soluble a été mesurée. Nous pouvons ainsi confirmer la présence de YEM-1 au sein de la fraction soluble de *E. coli* ( $v = 0,45 \Delta A/min$ ).

### 5.2.2. Production

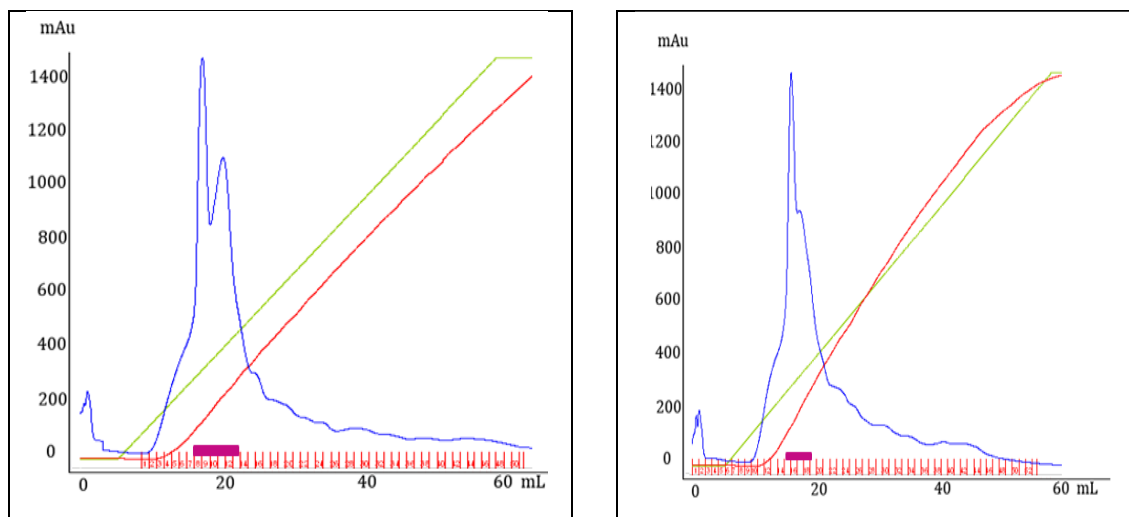
Sur base de ces résultats, 1 L de culture est réalisé pour la production de l'enzyme sauvage YEM-1 et un second litre pour le mutant Y63V. La production suit les conditions utilisées pour le test de production (cf. § 4.2.2.1.) du sauvage et du mutant.

### 5.2.3. Purification

La purification de ces protéines se fait en trois étapes : chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie d'affinité et tamis moléculaire. La protéine obtenue après les deux premières étapes de purification est cependant suffisamment pure pour être utilisée dans la caractérisation cinétique. La dernière étape est réalisée pour les besoins d'expériences futures (cristallisation,...)

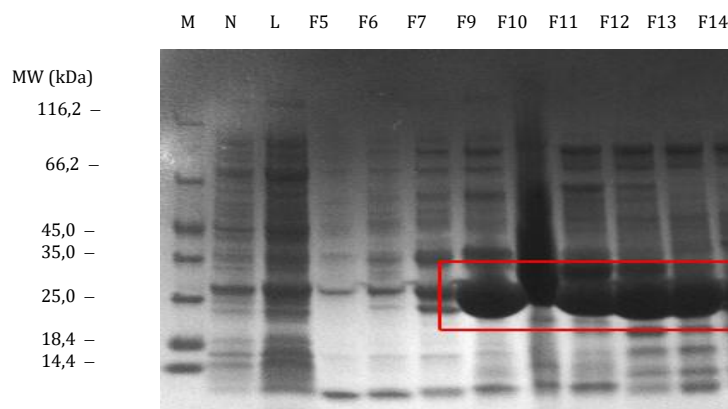
#### • Chromatographie échangeuse d'ions

La fraction soluble obtenue lors de la production est d'abord purifiée par chromatographie échangeuse d'ions Hitrap™ SP-HP. Dans les conditions de travail, la protéine d'intérêt est chargée négativement et retenue sur la colonne le temps du transfert et du lavage. Les chromatogrammes relatifs à la purification de YEM-1 et YEM-1 Y63V sont représentés par la Figure 26.



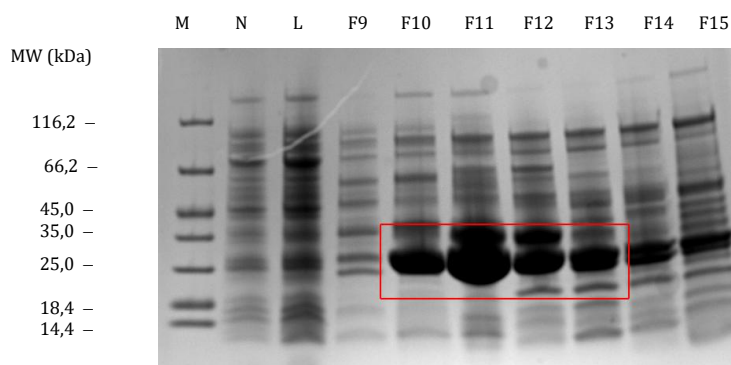
**Figure 26: profils d'élution sur Hitrap™ SP-HP. de la protéine sauvage YEM-1 (gauche) et de la protéine mutante Y63V (droite).** Un gradient salin de 0 à 1 M en NaCl est appliqué sur 10 volumes de colonne. La courbe UV est représentée en bleue, la conductivité en rouge et le gradient salin en vert. Les fractions purifiées sont numérotées en rouge et celles récupérées sont soulignées en mauve.

Cette première étape de purification a permis d'éliminer certains contaminants, comme l'attestent les gels de polyacrylamide (*Figures 27 et 28*) sur lesquels ont été déposés les échantillons.



**Figure 27: analyse par SDS-PAGE (gel pré-coulé 4%-20%) des fractions récupérées après purification de la protéine sauvage YEM-1 sur Hitrap™ SP HP.**

M : marqueur de poids moléculaire  
N : échantillon non retenu  
L : lavage  
F : fractions purifiées



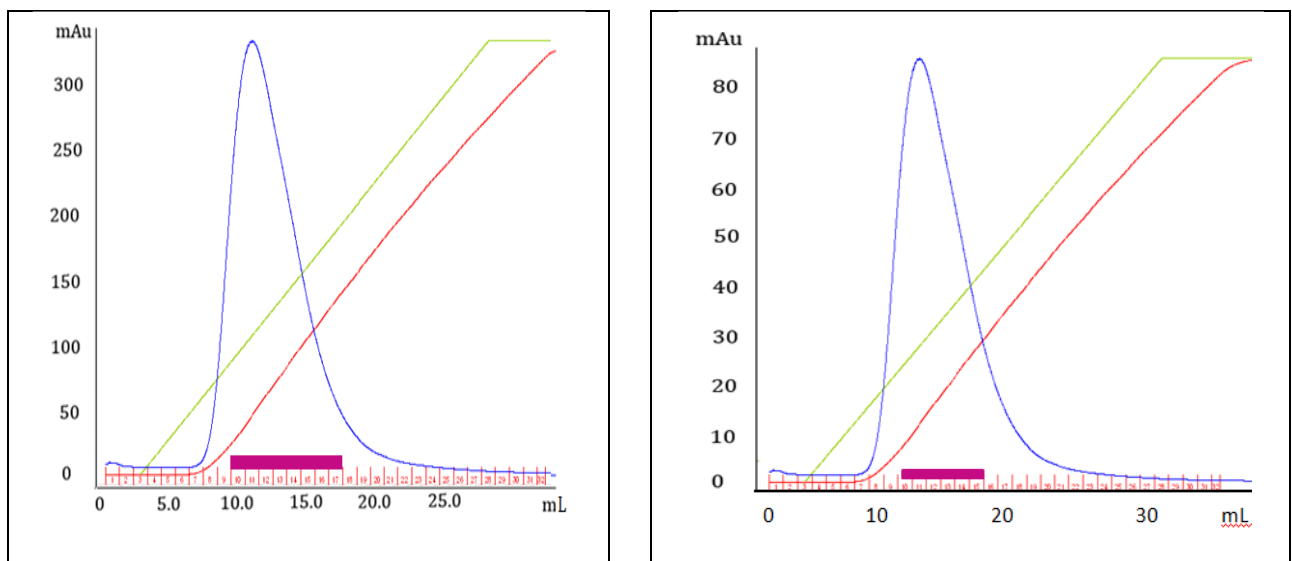
**Figure 28: analyse par SDS-PAGE (gel pré-coulé 4%-20%) des fractions récupérées après purification du mutant Y63V sur Hitrap™ SP HP.**

M : marqueur de poids moléculaire  
N : échantillon non retenu  
L : lavage  
F : fractions purifiées

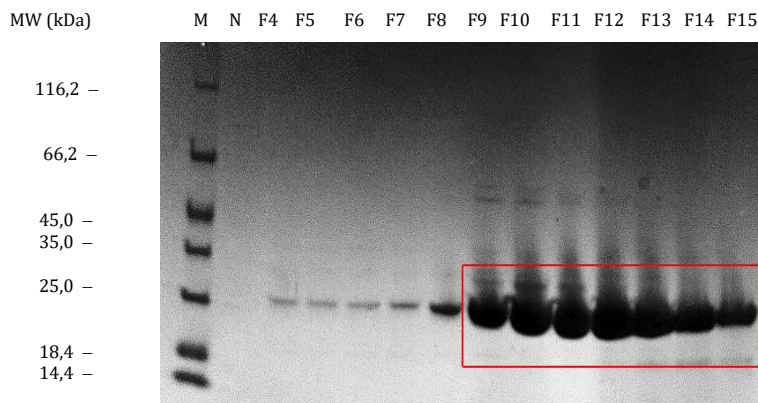
Une seconde étape de purification est nécessaire pour atteindre un degré de pureté suffisant.

- **Chromatographie d'affinité**

Les fractions d'intérêt purifiées correspondant au pic d'élution (*Figure 26*) sont rassemblées pour être soumises à une seconde étape de purification par chromatographie d'affinité. Dans les conditions de travail et selon une affinité ligand – cation, la protéine d'intérêt sera retenue sur la colonne le temps du transfert et du lavage. Les chromatogrammes d'élution des protéines YEM-1 et YEM-1 Y63V sont représentés sur la figure 29.

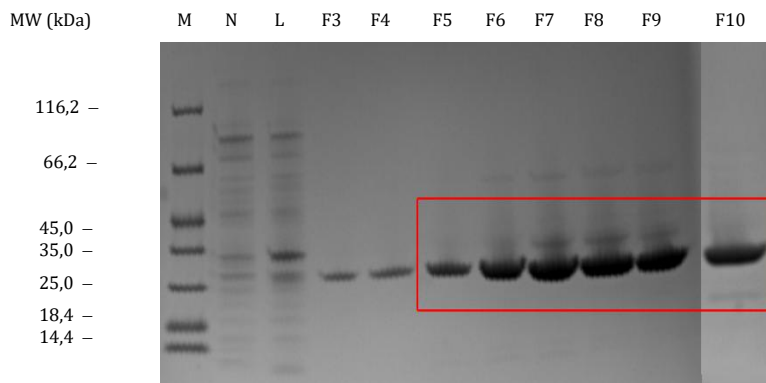


**Figure 29 : profils d'élution sur colonne Zn-PDC-4FF de la protéine sauvage YEM-1 (gauche) et du mutant Y63V (droite).** Un gradient salin de 0 à 1 M en NaCl est appliqué sur 10 volumes de colonne. La courbe UV est représentée en bleue, la conductivité en rouge et le gradient salin en vert. Les fractions purifiées sont numérotées en rouge et celles récupérées sont soulignées en mauve.



**Figure 30 : analyse par SDS-PAGE (gel pré-coulé 4%-20%) des fractions récupérées après purification de la protéine sauvage YEM-1 sur Zn-PDC-4FF.**

M : Marqueur de poids moléculaire  
N : échantillon non retenu  
F : fractions purifiées



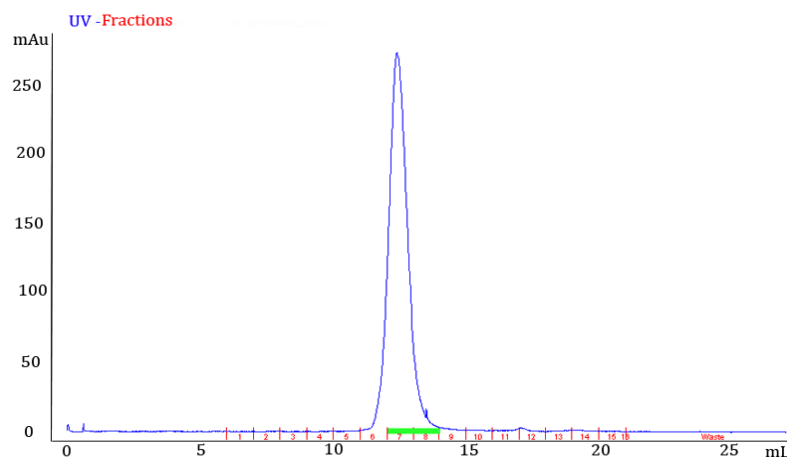
**Figure 31 : analyse par SDS-PAGE (gel pré-coulé 4%-20%) des fractions récupérées après purification du mutant Y63V sur Zn-PDC-4FF.**

M : marqueur de poids moléculaire  
N : échantillon non retenu  
L : lavage  
F : fractions purifiées

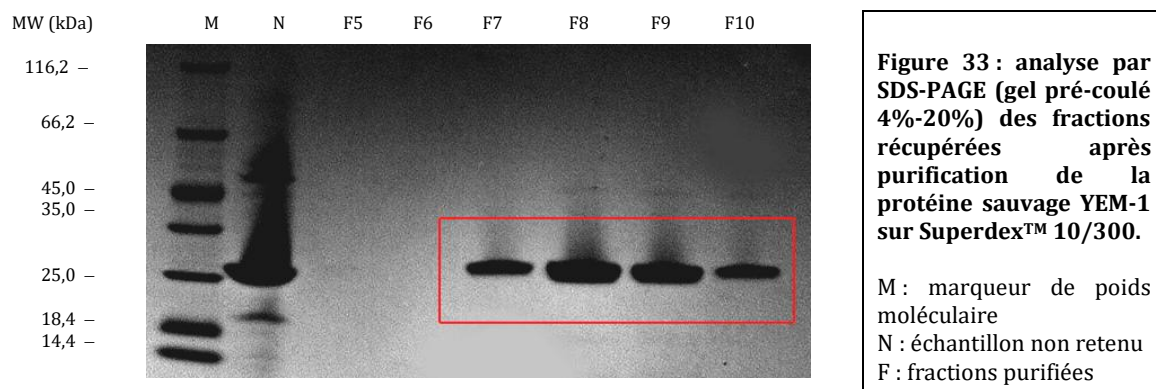
Comme le montre les profils électrophorétiques des différentes fractions actives, une partie importante des contaminants a été éliminée à travers cette seconde étape de purification (*Figure 30 et 31*). La protéine affiche déjà un degré de pureté suffisant pour être utilisée dans des tests de cinétique. Cependant, il est possible et préférable d'améliorer sa pureté avec une dernière étape de purification, le tamis moléculaire.

- **Tamis moléculaire**

La purification par tamis moléculaire est réalisée sur une colonne de 75 mL Superdex™ 10/300 préalablement équilibrée avec du tampon MES 50mM pH 6. Les protéines les plus grosses vont être éluées en première selon le principe d'exclusion (cf. méthodes §4.2.3.3).



**Figure 32 : profil d'élution sur colonne Superdex™ 75 10/300 de la protéine sauvage YEM-1.**  
Les fractions retenues après purification sont indiquées en vert sur ce chromatogramme.



Le tamis moléculaire a permis d'éliminer les contaminants résiduels. Il reste cependant une infime contamination à proximité de la bande d'intérêt (*Figure 33*). Le contaminant ayant un poids moléculaire très proche de la protéine étudiée serait difficile à éliminer par tamis moléculaire.

#### 5.2.4. Dosage des protéines

La concentration des solutions protéiques est évaluée après purification afin d'estimer si la protéine a été produite en quantité suffisante pour la suite du projet. La concentration est déterminée selon la loi de Beer-Lambert :  $A = l \times \epsilon \times c$

L'absorbance à 280 nm est mesurée au spectrophotomètre. La concentration, étant la seule inconnue, peut ainsi être estimée (longueur de trajet optique  $l = 1\text{cm}$  ; coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 38850$  ; Poids moléculaire = 25547). Le coefficient d'extinction molaire a été calculé grâce à la relation de Cantor et Schimmel ( $\epsilon^{280} = nY \times 1300 + nW \times 5600$  où  $nY$  et  $nW$  représentent respectivement le nombre de tyrosine et de tryptophane au sein de la séquence de YEM-1 et YEM-1 Y63V).

Protéine	$A_{280}$ (nm)	Concentration (mg/mL)	Volume total (mL)	Quantité de protéine (mg)
YEM-1	1,16	0,76	8,5	6,5
Y63V	1,17	0,76	6	4,5

**Tableau 6 : dosage de la protéine sauvage YEM-1 et du mutant Y63V après purification sur Zn-PDC-4FF.** La quantité totale de protéines produites est déterminée grâce à l'équation de Beer-Lambert en tenant compte de l'absorbance à 280nm mesurée pour l'échantillon purifié.

Les deux protéines ont un rendement de production similaire et satisfaisant pour effectuer la suite du travail (*Tableau 6*).

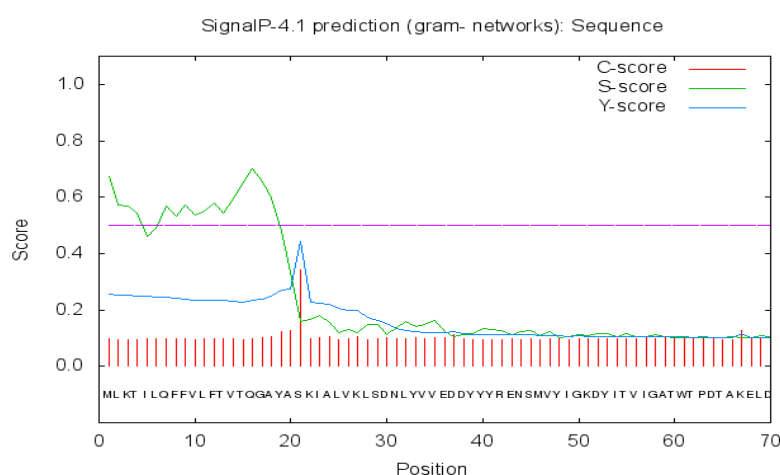
### 5.2.5. Spectrométrie de masse d'Y63V

La spectrométrie de masse va permettre de faire une analyse qualitative du mutant Y63V préalablement produit et purifié. La masse moléculaire du mutant Y63V est déterminée par la plateforme CART du GIGA (CHU).



**Figure 34: spectre de masse de l'échantillon du mutant Y63V (GIGA, CART).** Pour se situer dans les conditions requises de cette technique, la protéine a été soumise au préalable à une étape de dessalage puis transférée dans du tampon acétate d'ammonium 25mM comme solvant final.

La masse moléculaire du mutant Y63V correspond au pic majeur (*Figure 34*) et est estimée à 25570 Da.



**Figure 35: prédiction du profil de clivage du peptide signal (Expasy, ProtParam).** Le clivage aurait lieu après une sérine.

Sur base de la séquence de la pré-protéine (ProtParam Expasy), nous pouvons en déduire que le clivage du peptide signal se déroule entre l'alanine en position 20 et la sérine en position 21 (*Figure 35*). Si l'on compare la masse moléculaire calculée de la protéine mature (25570,1 Da) à celle déterminée par spectrométrie de masse (25570 Da), les valeurs obtenues sont identiques.

### 5.3. Tests cinétiques de la protéine YEM-1 et du mutant Y63V

Le profil d'activité de YEM-1 sauvage et du mutant Y63V a été déterminé (Tableau 7). Par ailleurs, les paramètres cinétiques de ces deux protéines ont été comparés au profil cinétique de CphA. [12].

Protéine	Antibiotiques		$k_{cat}$	$K_m$	$k_{cat}/K_m$
	Classe	Molécule	( $s^{-1}$ )	( $\mu M$ )	( $s^{-1} \mu M^{-1}$ )
YEM-1	Carbapénèmes	Imipénème	$480 \pm 25$	$160 \pm 15$	3
		Ertapénème	$> 375$	$> 2500$	0,15
		Méropénème	$> 84$	$> 2000$	0,042
		Doripénème	$> 85$	$> 2500$	0,034
		Biapénème	$> 16$	$> 2500$	0,0064
	Pénicilline	Benzylpénicilline	NH	NH	NH
	Céphalosporines	Céfotaxime	NH	NH	NH
		Céphaloridine	NH	NH	NH
Y63V	Carbapénèmes	Imipénème	$1770 \pm 40$	$270 \pm 7$	6,48
		Ertapénème	$1630 \pm 10$	$110 \pm 8$	14,80
		Meropénème	$770 \pm 30$	$350 \pm 30$	1,46
		Doripénème	$> 1317$	$> 2500$	0,53
		Biapénème	$> 1008$	$> 2500$	0,40
	Pénicilline	Benzylpénicilline	NH	NH	NH
	Céphalosporines	Céfotaxime	NH	NH	NH
		Céphaloridine	NH	NH	NH
CphA	Carbapénèmes	Imipénème	$1220 \pm 60$	$310 \pm 20$	3,9
		Ertapénème	$1410 \pm 10$	$210 \pm 10$	6,83
		Meropénème	$1440 \pm 90$	$630 \pm 30$	2,23
		Doripénème	$940 \pm 80$	$580 \pm 50$	1,58
		Biapénème	$1460 \pm 120$	$1510 \pm 130$	0,96
	Pénicilline	Benzylpénicilline	NH	NH	NH
	Céphalosporine	Céfotaxime	NH	NH	NH
		Céphaloridine	NH	NH	NH

**Tableau 7 : paramètres cinétiques déterminés pour la protéine sauvage YEM-1 et le mutant Y63V.** Les mesures ont été réalisées à 30°C dans du tampon MES 50mM pH 6.

- **Protéine sauvage YEM-1**

Les valeurs de  $K_m$  et de  $k_{cat}$ , pour la majorité des substrats testés avec la protéine sauvage YEM-1, ne sont pas mesurables (*Tableau 7*). Pour les carbapénèmes, à l'exception de l'imipénème, les valeurs de  $K_m$  sont très largement supérieures aux concentrations en substrats utilisées les plus élevées (2,5 à 5mM). Dès lors, l'ordre de réaction est de pseudo-ordre 1. Dans ces conditions, il ne nous a pas été possible de déterminer les valeurs individuelles de  $k_{cat}$  et  $K_m$ . Seule la valeur du rapport  $k_{cat}/K_m$  a pu être calculée. Le meilleur substrat de YEM-1 est l'imipénème. L'efficacité catalytique de YEM-1 envers les autres carbapénèmes testés diminue au moins d'un facteur 100 par rapport à l'efficacité catalytique envers l'imipénème. Aucune hydrolyse n'est observée pour les substrats appartenant aux autres classes d'antibiotiques (pénicillines et céphalosporines). Ces observations confirment l'appartenance de la protéine sauvage YEM-1 à la sous-classe B2 des MBLs, dont le spectre d'action spécifique fait de ces  $\beta$ -lactamases des carbapénèmes strictes. Cependant les valeurs du rapport  $k_{cat}/K_m$  montrent une efficacité catalytique réduite chez YEM-1 par rapport à CphA. La protéine sauvage YEM-1 serait donc une enzyme moins efficace que CphA envers les carbapénèmes.

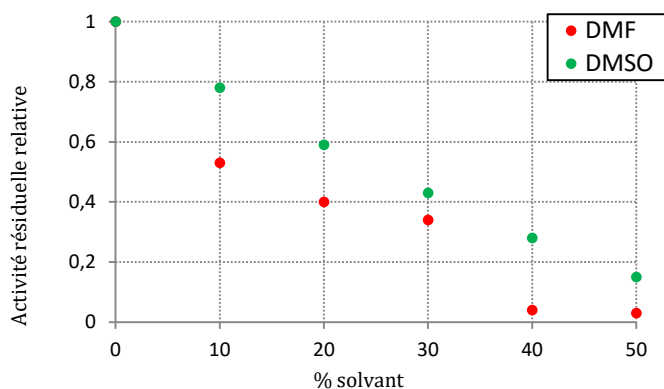
- **Mutant Y63V**

A la différence de l'enzyme sauvage YEM-1, les valeurs de constantes cinétiques  $K_m$  et de  $k_{cat}$  ont pu être mesurées pour la majorité des carbapénèmes testés. On remarque que les valeurs du rapport  $k_{cat}/K_m$  augmentent globalement pour l'ensemble des carbapénèmes et atteignent une efficacité catalytique comparable à CphA (*Tableau 7*). Ces valeurs cinétiques démontrent l'importance du résidu tyrosine en position 63 quant à l'accessibilité au site actif, induisant une augmentation du pouvoir catalytique. La substitution de la tyrosine en une valine (situation chez CphA) semble montrer la restauration d'une partie de l'activité perdue entre CphA et YEM-1. Le mutant Y63V affiche meilleure efficacité catalytique contre les carbapénèmes que le sauvage YEM-1.

### **5.3.1. Effet du DMF et du DMSO**

Ces deux solvants peuvent être utilisés pour préparer des solutions d'antibiotiques. Par exemple, ces solvants aprotiques polaires sont utilisés notamment dans la préparation de la nitrocéfine, une céphalosporine chromogène utilisée dans la détection de l'activité  $\beta$ -lactamase. Il était donc intéressant de déterminer la stabilité de notre enzyme en présence de concentration croissante de ces deux solvants. Nos études indiquent que YEM-1 est particulièrement sensible à la présence de DMF. L'activité résiduelle mesurée en présence de DMF 10 % chute de 46 % par rapport à l'activité de l'enzyme en absence de ce solvant.





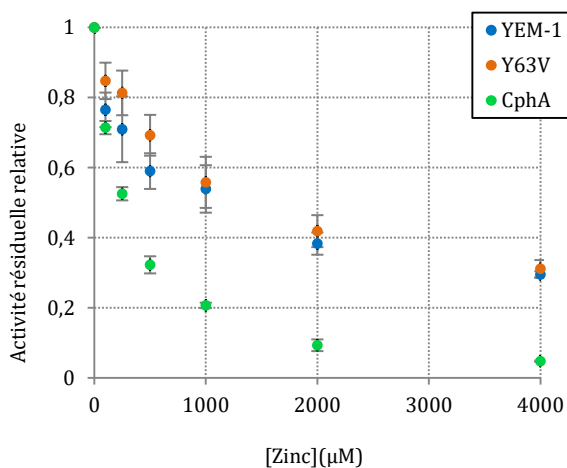
**Figure 36: activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction du pourcentage en DMF et DMSO pour la protéine sauvage YEM-1.** La concentration en imipénème est de 100  $\mu$ M.

L'activité de l'enzyme YEM-1 (Figure 36) décroît en fonction de la concentration croissante en DMF ou en DMSO. Ces deux solvants se comportent soit comme des agents inhibiteurs, soit comme des agents dénaturants, envers la protéine étudiée. Pour définir le mode d'action de ces composés, des études complémentaires sur l'évolution des structures secondaires et tridimensionnelles de YEM-1 sont nécessaires.

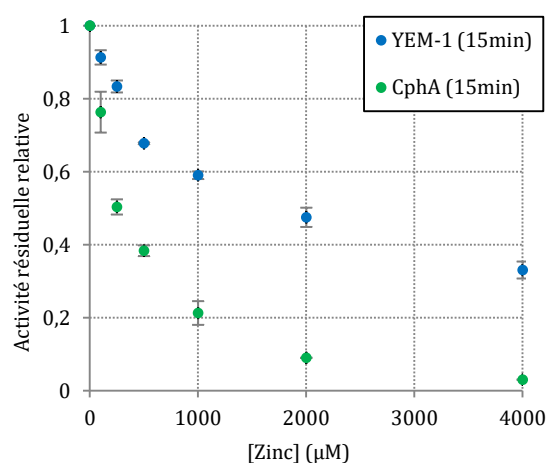
### 5.3.2. Influence des métaux

L'activité catalytique des métallo-enzymes dépend en grande partie des ions métalliques présents au sein de leur site actif. Les MBLs de sous-classe B2 nécessitent un ion zinc pour être actives. La substitution de ce métal par d'autres métaux peut conduire à une diminution ou une augmentation de l'activité catalytique par rapport à l'enzyme à zinc native. Trois métaux vont être testés ici : les ions  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ .

#### • Zinc



(a)



(b)

**Figure 37 : activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction de la concentration en zinc pour l'enzyme sauvage YEM-1 (bleu), le mutant Y63V (orange) et l'enzyme sauvage CphA (vert) sans temps d'incubation à température ambiante (a) et après 15 minutes d'incubation à température ambiante (b).** La concentration en imipénème est de 100  $\mu$ M.

L'efficacité catalytique des trois protéines étudiées est inhibée en présence de concentration croissante en zinc (*Figure 37*). Un profil d'inhibition comparable entre la protéine sauvage YEM-1 et le mutant Y63V est observé alors que CphA présente une inhibition accrue en présence d'une quantité égale en zinc. L'activité résiduelle de YEM-1 sauvage et du mutant Y63V est de l'ordre 35 % en présence d'une concentration en  $Zn^{2+}$  de 4 mM alors que l'activité résiduelle de CphA est de 5%.

Nous avons aussi étudié si l'inhibition des protéines YEM-1 et CphA par les ions zinc pouvait évoluer en fonction du temps d'incubation (*Figure 37b*). Nos résultats indiquent que l'inhibition obtenue après une pré-incubation de 15 minutes des protéines en présence des différentes concentrations en zinc est identique à celle mesurée sans étape de pré-incubation. Enfin, sur base des données obtenues, nous avons déterminé une valeur de la constante de dissociation apparente de liaison d'un second ion zinc.

Protéine	Kd ( $\mu$ M)
YEM-1	363
Y63V	329
CphA	155

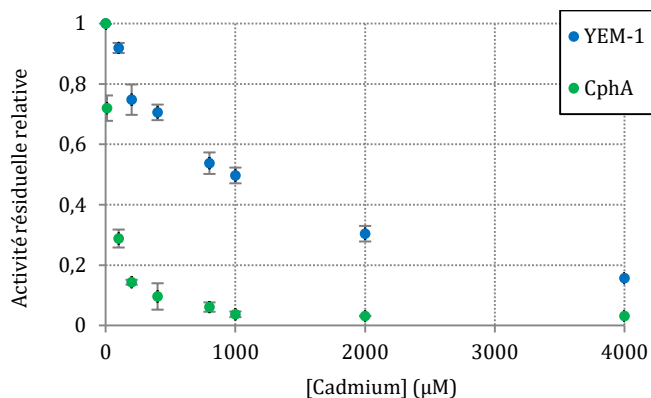
**Tableau 8 : valeurs de la constante de dissociation du zinc pour l'enzyme sauvage YEM-1, le mutant Y63V et CphA en présence de concentration croissante en Zinc (0 à 4mM).**

Les constantes de dissociation apparente de la forme dizinc de YEM-1 et de son mutant Y63V sont supérieures à celle de la protéine CphA (*Tableau 8*).

Sur base de ces résultats, nous avons aussi testé l'effet d'autres ions métalliques comme le cadmium et le cobalt.

- **Cadmium**

L'efficacité catalytique de la protéine sauvage YEM-1 et de CphA sont inhibées en présence de concentration croissante en cadmium (*Figure 38*). Une inhibition totale est atteinte plus rapidement avec CphA qu'avec le sauvage YEM-1. Selon la courbe d'inhibition, les deux protéines sont globalement plus sensibles au cadmium qu'au zinc.



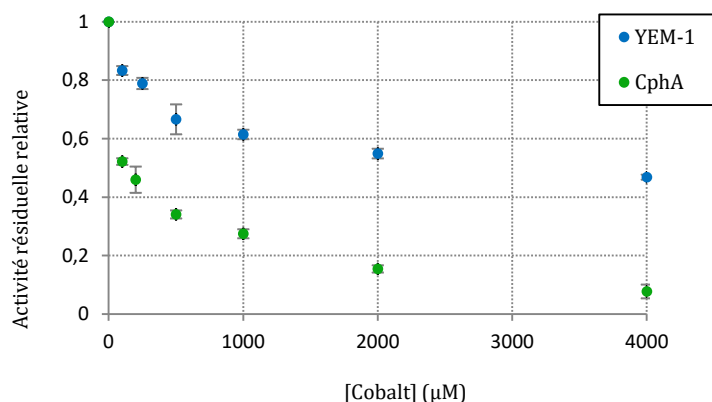
**Figure 38 : activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction de la concentration en cadmium pour l'enzyme YEM-1 (bleu) et l'enzyme CphA (vert).** La concentration en imipénème est de 100  $\mu$ M.

Protéine	Kd ( $\mu$ M)
YEM-1	675
CphA	39

**Tableau 9 : valeurs de la constante de dissociation du zinc pour l'enzyme sauvage YEM-1, le mutant Y63V et CphA en présence de concentration croissante en Cadmium (0 à 4mM).**

Les constantes de dissociation apparente de la forme dizinc de YEM-1 est supérieure à celle de la protéine CphA (*Tableau 9*).

### • Cobalt



**Figure 39 : activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction de la concentration en cobalt pour l'enzyme YEM-1 (bleu) et l'enzyme CphA (vert).** La concentration en imipénème est de 100  $\mu$ M.

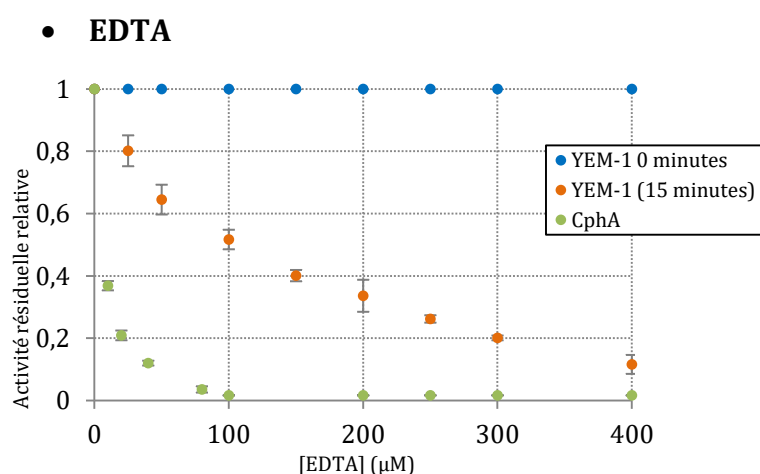
L'efficacité catalytique de la protéine sauvage YEM-1 et de CphA est inhibée en présence de cobalt (*Figure 39*). Une inhibition totale est atteinte plus rapidement avec CphA qu'avec le sauvage YEM-1. Selon la courbe d'inhibition, les deux protéines sont globalement plus sensibles au cobalt qu'au zinc, mais moins sensibles qu'au cadmium.

Protéine	Kd ( $\mu\text{M}$ )
YEM-1	385
CphA	71

**Tableau 10 : valeurs de la constante de dissociation du zinc pour l'enzyme sauvage YEM-1, le mutant Y63V et CphA en présence de concentration croissante en Cobalt (0 à 4mM).**

La constante de dissociation apparente de la forme dizinc de YEM-1 est supérieure à celle de la protéine CphA (*Tableau 10*).

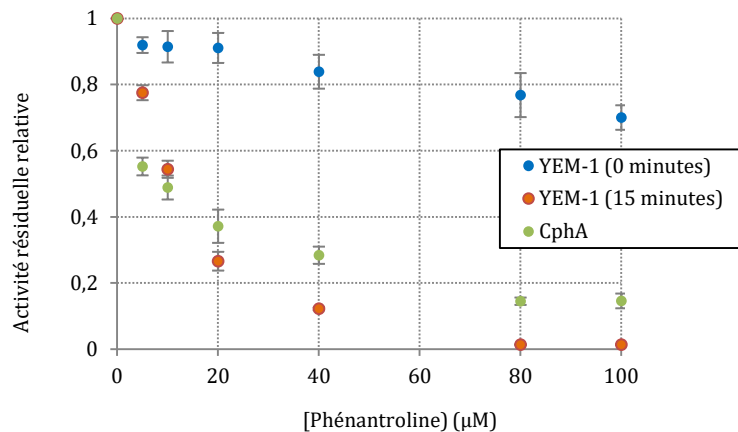
Dans un premier temps, ces observations montrent une sensibilité de la protéine sauvage YEM-1 aux métaux puisqu'une diminution de l'activité de l'enzyme est observée avec chacun des trois métaux testés (*Figure 37-39*). Néanmoins, cette sensibilité est réduite chez YEM-1 sauvage par rapport à CphA, qui démontre donc une meilleure affinité aux métaux. Le profil d'inhibition au zinc du mutant Y63V est comparable à celui de l'enzyme sauvage YEM-1. La mutation ne semble pas affecter l'influence des métaux sur l'activité de YEM-1 ni sur son affinité apparente pour la fixation du second ion zinc.



**Figure 40: activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction de la concentration en EDTA pour l'enzyme YEM-1 (bleu) et l'enzyme CphA (vert).** La concentration en imipénème est de 100  $\mu\text{M}$ .

L'influence de l'EDTA sur l'activité enzymatique de YEM-1 évolue en fonction du temps d'incubation. Une incubation préalable de l'enzyme, 15 minutes à température ambiante, a été nécessaire pour observer une diminution de l'activité catalytique pour des concentrations en EDTA variant de 0 à 400  $\mu\text{M}$ . Par ailleurs, YEM-1 est moins sensible à la présence de cet agent chélatant que CphA (*Figure 40*). Sur base de nos résultats, les IC50 pour l'EDTA sont respectivement égales à 100  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  pour YEM-1 et CphA.

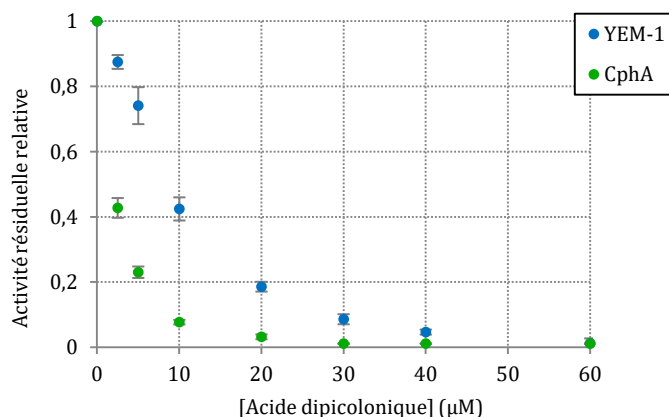
- **Phénantroline**



**Figure 41 : activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction de la concentration en phénantroline pour l'enzyme YEM-1 (bleu et orange) et l'enzyme CphA (vert). La concentration en imipénème est de 100μM.**

Comme pour l'EDTA, l'enzyme sauvage YEM-1 affiche une sensibilité accrue à la phénantroline après une incubation de 15 minutes à température ambiante, non retrouvée sans incubation préalable. Elle montre alors un profil d'inhibition similaire à celui de CphA (Figure 41). L'inhibition totale des deux protéines nécessite une concentration inférieure en phénantroline (80 – 200μM) qu'en EDTA.

- **Acide dipicolinique**



**Figure 42 : activité résiduelle relative de l'imipénème en fonction de la concentration en acide dipicolinique pour l'enzyme YEM-1 (bleu et orange) et l'enzyme CphA (vert). La concentration en imipénème est de 100 μM.**

L'acide dipicolinique se dévoile sans doute comme l'agent chélateur le plus efficace des trois produits testés. L'enzyme sauvage YEM-1 ne nécessite pas d'incubation préalable à température ambiante pour être inhibée par cet agent chélateur. De plus, la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition totale représente 1/3 de la concentration nécessaire en phénantroline et 1/10 de la concentration nécessaire en EDTA. Comme déjà observé pour les deux autres agents chélatants, CphA reste toujours plus sensible à l'agent chélateur que l'enzyme sauvage YEM-1 (Figure 42). Sur base de nos résultats, on observe une inhibition de 50% de l'activité enzymatique de YEM-1 et CphA pour des concentrations respectives en acide dipicolinique de 10 et 1 μM.

De ces observations, il en ressort que l'enzyme sauvage YEM-1 est inhibée dans des gammes de concentrations différentes selon l'agent chélateur. L'acide dipicolinique inhibe efficacement l'enzyme à de faibles concentrations ( $< 30\mu\text{M}$ ) tandis que la phénantroline et l'EDTA nécessitent une incubation préalable de l'enzyme pour pouvoir l'inhiber à des concentrations raisonnables (entre 100 à  $400\mu\text{M}$ ). De plus, YEM-1 a montré une sensibilité globalement moins importante aux agents chélateurs comparée à la protéine CphA.

## 6. Conclusions et perspectives

- **Caractérisation de YEM-1**

Le premier objectif de ce travail était de produire, purifier et caractériser la protéine YEM-1. Cet objectif a été atteint. Nous avons développé un protocole de production et de purification qui nous a permis d'obtenir 6,5 mg de protéine pour 1 L de culture, avec une pureté supérieure à 95 %. L'étude cinétique confirme l'hypothèse que YEM-1 appartient à la sous-classe B2 des MBLs. L'enzyme hydrolyse de manière spécifique les carbapénèmes. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé d'activité enzymatique envers les pénicillines et céphalosporines. Si l'on compare son profil d'activité à CphA, on note que YEM-1 est moins efficace que CphA contre les carbapénèmes, malgré leur grande similarité de séquence (57% d'identité). A l'exception de l'imipénème, l'efficacité enzymatique de YEM-1 chute d'au moins un facteur 10. Par ailleurs, pour la majorité des carbapénèmes, il ne nous a pas été possible de déterminer les constantes cinétiques individuelles car les valeurs de  $K_m$  sont largement plus élevées que les concentrations en substrat testées. Comme pour l'enzyme modèle, YEM-1 est sensible à la présence de concentration importante en ion métalliques bivalents comme  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Co^{2+}$ . Néanmoins, les valeurs des constantes de dissociation apparente de la forme di-zinc sont plus élevées pour YEM-1 que CphA. Ce résultat indique que YEM-1 aurait une affinité moins importante pour la fixation d'un second ion zinc. Cette enzyme pourrait donc fonctionner sous sa forme la plus active (la forme monozinc) même en présence de concentration élevée en ion métallique. Le même phénomène s'observe pour les ions cadmium et cobalt.

Notre travail montre aussi que YEM-1 est moins sensible à l'effet des agents chélatants que CphA. Tout d'abord, l'inhibition de YEM-1 par l'EDTA et l'ortho-phénanthroline est influencée par le temps d'incubation de l'enzyme en présence de ces composés. D'autre part, les valeurs des constantes d'inhibition apparente sont supérieures d'un facteur 10 pour YEM-1 par rapport à CphA. Il est possible que l'affinité de l'enzyme pour le premier ion zinc soit supérieure pour YEM-1 par rapport à CphA. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de confirmer cette hypothèse. Afin de réaliser cet objectif, il sera nécessaire de produire la forme apoenzyme et de déterminer la constante d'affinité pour la fixation d'un ion zinc soit par spectrométrie de masse soit par étude de compétition de fixation d'ion par l'apoenzyme en présence d'agents chélatants chromogéniques comme le Mag-Fura [29].

- **Etude des résidus de YEM-1**

Pour comprendre la différence d'efficacité catalytique entre YEM-1 et CphA, nous avons, grâce au travail du Dr Kerff, comparé la structure tridimensionnelle de CphA au modèle de la structure de YEM-1. Il a notamment identifié trois résidus présents dans le voisinage du site actif de YEM-1, Y63, S236 et T158, qui pourraient influencer l'interaction entre cette enzyme et les substrats. Ces résidus sont respectivement remplacés par V63, F236 et F158 chez CphA. La présence de ces trois substitutions pourrait générer un encombrement stérique différent du site actif des enzymes et donc, influencer leur interaction avec les carbapénèmes. Grâce à un protocole de mutagenèse dirigée [26], les mutants *y63v* et *s236f* de *yem-1* ont pu être générés. Par manque de temps, seul la protéine mutante Y63V a été produite, purifiée et caractérisée. La phase de production et de purification ont été réalisées dans les mêmes conditions que l'enzyme sauvage YEM-1. Les résultats cinétiques (cf. §5.3, tableau 7) montrent une augmentation globale de l'efficacité catalytique envers les carbapénèmes, à l'exception de l'imipénème, contre lequel le sauvage YEM-1 et CphA démontraient déjà une activité comparable et contre lequel le mutant Y63V montre aussi un même profil. Il est intéressant de noter que le mutant Y63V a une efficacité catalytique accrue par rapport à YEM-1 et qu'il a une activité similaire à CphA. Pour l'ertapénème et le méropénème, les valeurs de  $K_m$  sont inférieures à celle de YEM-1 et sont comparables à celle de CphA. Par contre, la mutation n'a pas élargi le spectre d'activité vis-à-vis des antibiotiques des autres classes. Le mutant Y63V reste inefficace contre les pénicillines et céphalosporines. Ces résultats montrent l'importance du résidu Y63 dans l'accessibilité du site actif de l'enzyme YEM-1 pour les carbapénèmes.

- **Perspectives**

Afin de compléter ce travail, nous compléterons l'étude de YEM-1 par mutagenèse dirigée. Nous étudierons deux autres mutants comme S236F et T158F. De plus, nous combinerons les différentes mutations au sein de YEM-1.

Dans un second temps, nous essayerons de produire la forme apoenzyme de YEM-1 afin de déterminer les constantes d'affinité de cet enzyme pour la fixation des ions zinc, qui pourraient apporter de nouveaux éléments de réponse sur la différence d'activité entre YEM-1 et CphA contre les carbapénèmes.



## 7. Références bibliographiques

1. A. Fleming (1929). **On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*.** *British Journal of Experimental Pathology* 10:226–236.
2. E. Chain, H.W. Florey, M.A. Jennings, J. Orr-Ewing and A.G. Sanders (1940). **Penicillin as a Chemotherapeutic Agent.** *The Lancet* : 226–228.
3. T. Palzkill (2014). **Metallo- $\beta$ -lactamases : structure and function.** *Annal of the New-York Academy of Sciences*, 1277: 91–104.
4. P. Charlier, J. Coyette, D. Dehareng, G. Dive, C. Duez, J. Dusart, E. Fonzé, C. Fraipont, J-M. Frère, M. Galleni, C. Coffin, B. Joris, J. Lamotte-Brasseur and M. Nguyen-Distèche (1998). **Résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines.** *Médecine/sciences*, 14 : 544-55.
5. E.P. Abraham and E. Chain (1940). **An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.** *Nature*, 146 :837.
6. M.R. Pollock (1960). **The enzymes**, in : *Bayer, P.D., H. Lardy and Mirbach (Eds)*, vol.1, Academic Press, 619.
7. A. Matagne, A. Dubus, M. Galleni and J. Frère (1998). **The  $\beta$ -lactamase cycle : a tale of selective pressure and bacterial ingenuity.** *Natural Product Report*, 16 : 1-19.
8. S.G. Waley (1992).  **$\beta$ -lactamase : Mechanism of action.** *In the Chemistry of  $\beta$ -lactams*, M.I.Page (ed) : p. 198-228.
9. K. Bush, G. Jacoby and A. Meideros (1995). **A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* : p. 1211–1233.
10. B. Joris, J.M. Ghuysen, G. Dive, A. Renard, O. Dideberg, P. Charlier, J.M. Frère, J.A. Kelly, J.C. Boyington, P. C. Moew and J.R. Know (1998). **The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the Streptomyces R61 DD-peptidase family.** *Biochemical Journal*, 250 : 313-324.
11. A. Matagne, M-F Ghuysen, J-M Frère (1993). **Interactions between active-site-serine  $\beta$ -lactamases and mechanism-based inactivators : a kinetic study and overview.** *Biochemical Journal*, 295, 705-711.
12. Carine Bebrone (2007). **Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily.** *Biochemical Pharmacology*, 74 : 1686 – 1701.

13. A. Karsisiotis, C. Damblon and G. Roberts (2014) **A variety of roles for versatile zinc in metallo- $\beta$ -lactamase.** *The Royal Society of Chemistry*, DOI : 10.1039/c4mt00066h.
14. J.-H. Jeon, J.H. Lee, J.J. Lee, K.S. Park, A.M. Karim, C.-R. Lee, B.C. Jeong and S.H. Lee (2015) **Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance.** *International Journal of Molecular Sciences*, 16 : 9654-9692
15. C. Debrone, H. Delbru, M. Kupper, P. Schlo, C. Willmann, J.-M. Frère, R. Fischer, M. Galleni and K. Hoffmann (2009). **The Structure of the Dizinc Subclass B2 Metallo--Lactamase CphA Reveals that the Second Inhibitory Zinc Ion Binds in the Histidine Site.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol 53. no 10 : p. 4464–4471
16. C. Bebrone, C. Anne, F. Kerff, G. Garau, K. De Vriendt, R. Lanti, B. Devreese, J. Van Beeumen, O. Dideberg, J.-M. Frère and M. Galleni (2008). **Mutational analysis of the zinc- and substrate binding sites in the CphA metallo- $\beta$ -lactamase from *Aeromonas hydrophila*.** *Biochemical Journal*, 414 : 151-159.
17. G. Garau, C. Bebrone, C. Anne, M. Galleni, J.-M. Frère and O. Dideberg (2005). **A metallo- $\beta$ -lactamase enzyme in action : Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem.** *Journal of Molecular Biology*, 34 5 : 785-795.
18. C. Bottoni, M. Perilli, F. Marcoccia, A. Piccirilli, C. Pellegrini, M. Colapietro, A. Sabatini, G. Celenza, F. Kerff, G. Amicosante, M. Galleni and P. Mercuri (2016). **Kinetic Studies on CphA Mutants Reveal the Role of the P158-P172 Loop in Activity versus Carbapenems.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol60 no.5: 3123-3126;
19. Truls Nesbakken (2006) **Yersinia infections.** *Foodborne Infections and Intoxications 3<sup>e</sup>*. ISBN -10 : 0-12-588365-X.
20. Steve Atkinson and Paul Williams (2016) **Yersinia virulence factors – a sophisticated arsenal for combating host defences.** F1000Research : 1270.
21. G. Wauters, M. Janssens, A. Steigerwalt and D. Brenner (1988). **Yersinia mollaretii sp. Nov. and Yersinia bercovieri sp. Nov., formerly called Yersinia enterocolitica biogroups 3A and 3B.** *International journal of systematic bacteriology*, vol38 no.4: 424-429.
22. H. Linde, H. Neubauer, H. Meyer, S. Alkeksic and N. Lehn (1999). **Identification of Yersinia Species by the Vitek GNI Card.** *Journal of Clinical Microbiology*, vol37 no.1: p211-214.
23. I. Stock, B. Henrichfreise and B. Wiedemann (2002) **Natural antibiotic susceptibility and biochemical profiles of Yersinia enterocolitica-like strains: Y. Bercovieri, Y. Mollaretii, Y. Aldovae and Y. Ruckeri.** *Journal of Medical Microbiology*, vol51: 56-59.
24. Carine Bebrone (2005). **Caractérisation des résidus impliqués dans le mécanisme d'action et la spécificité de la  $\beta$ -lactamase de classe B CphA** (thèse).
25. G. Garau, I. Garcia-Saez, C. Bebrone, C. Anne, P. Mercuri, M. Galleni, J.M. Frère and O. Dideberg (2004). **Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 : 1973-181

26. J. Kane (1995) **Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coil.** *Current Opinion in Biotechnology*. 6:494-500.
27. **Protein purification Handbooks.** GE Healthcare Life Sciences
28. **Principe de la spectrométrie selon la méthode ESI** (<http://masse-spec.fr/electrospray>)
29. K.E. Dineley, L. Malayandi and I. Reynolds (2002). **A reevaluation of Neuronal zinc measurements: artifacts associated with high intracellular dye concentration.** *Molecular pharmacology*, Vol 62 no.3 : 618-627.