
Étude structurale et dynamique de l'effet d'un nanoboc TEM-1 et TEM-121 par des techniques de modélisation

Auteur : Dragozis, Sarah

Promoteur(s) : Damblon, Christian

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9146>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Étude structurale et dynamique de l'effet d'un nanobody sur les β - lactamases TEM-1 et TEM-121 par des techniques de modélisation

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du grade de Master en
Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire à finalité approfondie



Sarah Dragozis

2^{ème} Master BBMC

Département des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences,
Université de Liège

Promoteur : Christian Damblon

Résumé

Du fait de la résistance qu'elles induisent à l'encontre des antibiotiques de type β -lactamine, les β -lactamases constituent un problème de santé mondial et récurrent depuis des décennies. Néanmoins, au cours de ces dernières années, les nanobodies, qui dérivent du domaine variable d'anticorps de Camélidés, sont apparus comme une perspective particulièrement prometteuse. Ainsi, en 2001, le nanobody cAb_{TEM-1} a été identifié comme inhibiteur de la β -lactamase de classe A TEM-1. Une caractérisation cinétique et structurale de cette inhibition a alors été initiée en vue de réaliser une démonstration de faisabilité de l'utilisation de nanobodies comme inhibiteurs de β -lactamases.

Pour commencer, il s'est avéré que le nanobody cAb_{TEM-1} était spécifique aux membres de la famille TEM, qu'ils soient de type classique, comme TEM-1, ou combinant les profils EBSL et IRT, comme TEM-121. Ensuite, bien que des études cinétiques aient montré que ce nanobody est un inhibiteur compétitif de TEM-1 et non-compétitif de TEM-121, les modèles cristallographiques des deux enzymes complexées (TEM-1_NB et TEM-121_NB) sont presque parfaitement superposables entre eux. Dans les deux cas, le nanobody ne se place pas dans site actif, mais entre les hélices α 10 et α 11, sur une boucle qui borde le site actif. La seule modification structurale majeure conséquente à la présence du nanobody est la réorientation de la chaîne latérale de la Val216 et sa pénétration dans le site actif. Une modélisation par docking comparant les conformations de diverses β -lactamines pour les modèles de TEM-1 seul et complexé a mis en évidence qu'orientée de la sorte, la chaîne latérale de la Val216 est à l'origine d'un important encombrement stérique totalement défavorable à leur fonction carboxylique en C3/C4 (respectivement pénicilline/céphalosporine) et à leur chaîne latérale en C2/C3, que ça soit lors de leur entrée ou lors de leur acylation, et que cet encombrement devient d'autant plus important avec la taille et la présence de charge(s) en C2/C3. La Val216 peut donc être considérée comme une barrière énergétique que le substrat doit franchir pour entrer dans le site actif, ce qui explique le profil d'inhibition compétitif. Ensuite, l'impact des mutations entre TEM-1 et TEM-121 sur la différence des profils d'inhibition a été étudiée, toujours par docking, en comparant les modèles de TEM-1_NB et de TEM-121_NB et en se concentrant sur la mutation Arg244Ser. Bien que les résultats ne soient pas véritablement concluants, les conformations des substrats chez TEM-121_NB rappellent celles de TEM-1, ce qui sous-entend que cette substitution, en libérant de la place dans le site actif et en le débarrassant d'une charge positive, faciliterait le positionnement correct des diverses fonctions, notamment de la fonction carboxylique en C3/C4, des substrats. Cette observation va dans le sens d'une inhibition non compétitive, pour laquelle seules l'acylation et la désacylation sont impactées.

En outre, la cristallographie a également mis en évidence que la séquence Glu212-Gly218 (dénommée boucle Val) se renforce et se rigidifie dans le site actif en présence du nanobody. Une modélisation par dynamique moléculaire (MD), qui sera complétée expérimentalement par des mesures de relaxation par RMN, a été réalisée afin de quantifier l'impact du nanobody sur la dynamique de cette boucle et de son rôle éventuel dans l'inhibition. En plus de confirmer une perte de la mobilité de la boucle Val, et uniquement de celle-ci, en présence du nanobody, les résultats soulignent le rôle essentiel et insoupçonné d'un résidu considéré comme quelconque jusqu'ici. Il s'avère en effet que l'Asp214, par l'établissement de diverses interactions, notamment avec la Val216 et l'Ala217, régule à lui seul la dynamique et la flexibilité de la boucle Val ainsi que l'orientation de la Val216 afin que ni cette boucle ni ce résidu ne gênent l'entrée du substrat. Ces interactions étant conservées entre diverses familles des β -lactamases de classe A, et les résultats du docking pouvant aisément être superposés avec ceux de la MD, l'Asp214 apparaît comme étant un résidu clé et essentiel à la régulation de la boucle Val et, de ce fait, indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme.

Si toutes ces découvertes, à savoir l'inhibition de β -lactamases par des nanobodies et le rôle insoupçonné de l'Asp214, venaient à être validées par des études ultérieures, elles pourraient constituer de toutes nouvelles approches en vue de l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de β -lactamases dérivés de nanobodies.

Remerciements

Les noms d'un grand nombre de personnes, membres de l'Université de Liège ou non, méritent d'être cités ici, de par leur contribution directe ou indirecte à ce travail.

Les deux premiers qui me viennent à l'esprit sont ceux de Moreno Galleni et de Christian Damblon. Je tiens particulièrement à les remercier pour leur présence, leur écoute, leur patience et leur accueil. En effet, alors que ma situation n'évolue pas favorablement, ils n'ont pas hésité à prêter une oreille attentive à mes problèmes et à me proposer une solution adéquate.

De manière plus précise, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers Mr Galleni qui a pris très rapidement toutes les choses en main lors de mon changement de mémoire. De plus, il a toujours compris et respecté mes affinités envers la RMN et n'a pas hésité à allier son laboratoire avec le CREMAN afin de satisfaire ma soif de connaissance. Grâce à ceci, j'ai pu aller de l'avant et prendre conscience de manière plus intime de mon affinité vis-à-vis de la biologie structurale et de la biochimie. Je lui dédie donc ce mémoire, auquel il n'aura malheureusement pas pu participer malgré toute sa bonne volonté.

Ma gratitude va également à Mr Damblon : toujours présent, toujours à l'écoute, toujours prêt à m'accueillir. Depuis 2018, une relation unique et enrichissante s'est tissée entre nos deux personnes, fruit des longues heures à discuter de sujets d'une grande diversité, d'agréables lunches et de rencontres instructives avec d'autres scientifiques. Néanmoins, il me faut avant tout le remercier pour les heures qu'il a passé à m'expliquer la RMN, technologie qui n'a cessé de m'étonner depuis, ainsi que pour sa confiance, lui qui n'a pas hésité à me confier sa machine dès qu'il m'en a jugée apte. A travers ceci, il m'a montrée ce qu'étaient l'autonomie, la responsabilité et surtout, la curiosité scientifique, avec cette envie de vouloir toujours aller plus loin dans la compréhension du monde qui nous entoure.

Un troisième nom important est bien évidemment celui de Frédéric Cawes, à qui je dois tous mes résultats et leur interprétation. Il me faut le remercier pour les heures considérables qu'il a passé au travers d'écrans à m'expliquer les différents outils bioinformatiques que nous allions utiliser, mais aussi pour sa patience et sa compréhension là où je faisais preuve d'un grand stress. Il m'a appris à toujours essayer de trouver une solution face à ce qui semblait être une impasse scientifique et à tout mettre en œuvre pour essayer de la réaliser.

Je tiens particulièrement à remercier ces trois personnes pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à la correction de l'ensemble de mes rapports, avec des remarques toujours plus constructives.

Je souhaitais ensuite citer les noms de Frédéric Kerff et de Maximiliano Figueroa, et remercier le premier pour ses explications et ses conseils avisés quant aux résultats des diverses modélisations ; le second pour la mise en place de toute la partie modélisation dynamique de ce projet, avec des documents toujours très bien expliqués et sa si grande disponibilité. Je tiens également à les remercier pour les corrections qu'ils ont apportées à certaines parties de ce mémoire.

Il ne me faut pas oublier les membres de la « team RMN ». Je désire donc remercier Marius Wanko pour le temps considérable qu'il a passé à l'attribution de la protéine TEM-1 et pour ses explications sur sa démarche, ainsi qu'André Joassin pour son immense gentillesse.

Pour terminer avec les personnes de l'ULiège, je voudrais remercier les membres de mon jury, à savoir Christian Damblon, André Matagne, Frédéric Kerff, Maximiliano Figueroa et Mireille Dumoulin, pour le temps et l'attention qu'ils ont tous portés à la lecture de ce mémoire (qu'ils auront, j'espère, trouvé intéressant) ainsi que pour leur contribution qui, je le sais, sera enrichissante.

Parmi les membres « hors ULiège », il me faut tout d'abord citer le nom de mon compagnon Vincent Gazzo. Il n'a en effet jamais faibli face à mes sautes d'humeur, mon stress et face au temps monumental que j'ai passé derrière mon ordinateur ces derniers mois. Au contraire, il a pris sur lui afin de toujours me soutenir, m'encourager et m'aider dans la mesure où ça lui était possible. Il me faut également remercier mes parents – Cathy Durieux, Eddy Delvaux et Georges Dragozis – pour les mêmes raisons, ainsi que pour leur soutien, leur présence et leur compréhension sans faille, surtout en cette période de confinement, de même que le reste de ma famille (trop conséquente que pour être citée nommément). J'espère les rendre tous fiers à travers ce travail. Je tiens ensuite à remercier particulièrement Hélène Saey pour ses corrections orthographiques et grammaticales, qui ont demandé beaucoup de son temps. Pour terminer, je désirais remercier mon amie de longue date Céline Greeven, pour son soutien ; Marine Leclercq, pour les nombreuses traductions qu'elle a effectuées pour moi ; Jérémie Malengreau pour les traitements d'images et manipulations d'Excel ; et les membres des « Survivors² » qui se reconnaîtront.

Table des matières

INTRODUCTION

1. <u>Avant l'histoire, la présentation des personnages</u>	1
1.1. <u>Les β-lactamines : cette vaste famille d'antibiotiques</u>	1
1.1.1. De la pénicilline aux β -lactamines.....	1
1.1.2. Les β -lactamines et les bactéries : le récit d'un antique combat.....	2
1.2. <u>La riposte bactérienne : les β-lactamases</u>	4
1.2.1. Les mécanismes de résistance bactérienne.....	4
1.2.2. Les β -lactamases, ces mangeuses de β -lactamines.....	5
1.2.2.1. Quelques généralités sur ces enzymes.....	5
1.2.2.2. Les deux grands systèmes de classification.....	5
1.2.2.3. La famille TEM.....	6
1.2.2.4. Structure des β -lactamases de classe A.....	6
1.2.2.5. Mécanisme réactionnel.....	9
1.3. <u>Les nanobodies</u>	10
1.3.1. La course à la recherche d'inhibiteurs des β -lactamases.....	10
1.3.2. Structure d'un nanobody.....	11
1.3.3. Caractéristiques des nanobodies.....	12
1.3.4. Quelques applications thérapeutiques des nanobodies.....	13
1.3.5. Les nanobody et les β -lactamases, le début d'une nouvelle histoire ?.....	13
2. <u>Et maintenant, passons à l'histoire</u>	14
2.1. <u>Le nanobody cAb_{TEM-1}</u>	14
2.2. <u>Étude de spécificité et cinétique du nanobody cAb_{TEM-1}</u>	14
2.3. <u>Études structurales de l'interaction entre cAb_{TEM-1} avec les enzymes TEM-1 et TEM-121</u>	15
2.4. <u>Objectifs ou comment compléter l'ébauche de ce schéma sur l'interaction entre les enzymes TEM-1 et TEM-121 et le nanobody cAb_{TEM-1}</u>	19
2.4.1. En bref, où en est-on ?.....	19
2.4.2. Approche structurale : modélisation par docking.....	19
2.4.3. Approche dynamique : modélisation dynamique et relaxation par RMN.....	21
2.4.3.1. Partie informatique : la modélisation dynamique (MD).....	21
2.4.3.2. Partie expérimentale : mesure de la relaxation par RMN.....	22

PARTIE I – UN PEU DE BIOLOGIE STRUCTURALE : MODÉLISATION PAR DOCKING

1. <u>Essais préliminaires de cinétique</u>	24
1.1. <u>Étude de la spécificité et de l'affinité du nanobody cAb_{TEM-1}</u>	24
1.2. <u>Détermination des profils d'inhibition</u>	24
1.2.1. Détermination du profil d'inhibition de cAb _{TEM-1} pour TEM-1.....	24
1.2.2. Détermination du profil d'inhibition de cAb _{TEM-1} pour TEM-121.....	25
1.3. <u>Étude de l'inhibition de TEM-1 par cAb_{TEM-1} sur un large panel de substrats</u>	26
2. <u>Objectifs de la modélisation par docking</u>	27

Table des matières

3. <u>Matériel et méthodes</u>	29
4. <u>Résultats</u>	32
4.1. <u>Comparaison entre TEM-1 et TEM-1 NB</u>	33
4.1.1. L'ampicilline.....	33
4.1.2. La céfalotine et la céfotaxime.....	34
4.1.3. La céphaloridine et la nitrocéfine.....	35
4.2. <u>Comparaison entre TEM-1 NB et TEM-121 NB</u>	37
4.2.1. L'ampicilline.....	37
4.2.2. La céfalotine et la céfotaxime.....	38
4.2.3. La céphaloridine et la nitrocéfine.....	39
4.2.4. La céfépime et la ceftazidime.....	40

PARTIE II – UN PEU DE DYNAMIQUE : MODÉLISATION DYNAMIQUE & RMN

1. <u>Partie informatique : la modélisation dynamique (MD)</u>	41
1.1. <u>Objectifs</u>	41
1.2. <u>Matériel et méthodes</u>	42
1.3. <u>Résultats</u>	43
1.3.1. Définitions : RMSF et RMSD.....	43
1.3.2. Contrôles de la modélisation.....	44
1.3.3. Étude dynamique des modèles protéiques.....	45
1.3.4. Étude de la dynamique de la boucle Val.....	47
1.3.4.1. Vue générale.....	47
1.3.4.2. Comparaison du facteur B et du RMSF de la boucle Val.....	49
1.3.4.3. Détermination des liaisons H.....	51
1.3.4.4. Mesures de distances.....	52
1.3.4.5. Mesures du RMSD.....	55
2. <u>Partie expérimentale : l'étude de relaxation par RMN</u>	56
2.1. <u>Pourquoi faire de la relaxation ?</u>	56
2.2. <u>Éléments de théorie</u>	57
2.2.1. La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	57
2.2.2. La relaxation du spin nucléaire (NSR).....	57
2.2.3. L'attribution : un préliminaire indispensable à la NSR.....	59
2.3. <u>Mise au point sur les avancées réalisées</u>	60
2.3.1. Revue de la littérature.....	60
2.3.1.1. L'attribution de TEM-1.....	60
2.3.1.2. La relaxation de TEM-1.....	61
2.3.2. Première étape : l'attribution de TEM-1.....	62
2.3.2.1. L'attribution par recherche d'un vecteur de translation.....	62
2.3.2.2. L'attribution par combinaison de ¹⁵ N-TOCSY et de ¹⁵ N-NOESY.....	63
2.3.2.3. L'attribution par utilisation d'expériences de type HNC.....	63
2.3.2.4. L'acidification du tampon, une étape pour une meilleure résolution/sensibilité ?.....	63

Table des matières

2.3.2.5. <i>Vers une alternative ingénieuse : le double marquage spécifique</i>	64
2.3.3. <i>Seconde étape : l'attribution de TEM-1_NB</i>	65
2.3.4. <i>Et TEM-121 dans tout ça ?</i>	65

CONCLUSION GÉNÉRALE, DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. <u>Remise en contexte et rappels des objectifs</u>	66
2. <u>Discussion et perspectives pour la modélisation par docking</u>	68
3. <u>Discussion et perspectives pour la modélisation dynamique</u>	73
4. <u>Vers l'établissement d'un nouveau modèle ?</u>	76

ANNEXES

INTRODUCTION.....	78
PARTIE I – UN PEU DE BIOLOGIE STRUCTURALE : MODÉLISATION PAR DOCKING.....	79
PARTIE II – UN PEU DE DYNAMIQUE : MODÉLISATION DYNAMIQUE & RMN.....	85
CONCLUSION GÉNÉRALE, DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	86

Liste des abréviations

- **2D** : deux dimensions
- **3D** : trois dimensions

- **AA** : acide aminé
- **ARB** : « *Antibiotic Resistance Breaker* »

- **B₀** : champ magnétique extérieur (RMN)
- **BLI** : inhibiteur de β -lactamases (« *β -Lactamases Inhibitor* »)
- **BLI** : interférométrie bio-couche (« *Bio-Layer Interferometry* »)
- **BMRB** : banque de données de la résonance magnétique nucléaire sur des échantillons biologiques (« *Biological Magnetic Resonance Data Bank* »)
- **Boucle Val** : extrémité N-terminale de la boucle H9 de TEM-1 ; séquence : Glu212 – Ala213 – Asp214 – Lys215 – Val216 – Ala217 – Gly218
- **BPTI** : « *Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor* »

- **C-A** : conformation A de la céfalotine et de la céfotaxime obtenue par docking
- **C-B** : conformation B de la céfalotine et de la céfotaxime obtenue par docking
- **C1G** : céphalosporine de première génération
- **C2G** : céphalosporine de deuxième génération
- **C3G** : céphalosporine de troisième génération
- **C4G** : céphalosporine de quatrième génération
- **CDR** : « *Complementary-Determining Regions* »
- **CH/CL** : domaine constant de la chaîne lourde (« *Heavy* »)/légère (« *Light* »)
- **CMI** : concentration minimale inhibitrice

- **DC** : dichroïsme circulaire

- **E. coli** : *Escherichia coli*
- **EPI** : inhibiteur de pompes à efflux (« *Efflux Pump Inhibitor* »)
- **EPR** : résonance paramagnétique électronique (« *Electronic Paramagnetic Resonance* »)
- **ES** : équilibration du système
- **ESBL** : β -lactamase à spectre élargi (« *Extended-Spectrum β -Lactamase* »)

- **Fab** : « *Smaller Antigen-Binding Fragment* »
- **FR** : « *Framework* »
- **FRET** : transfert d'énergie par résonance de type Förster (« *Förster Resonance Energy Transfer* »)

- **HcAb** : « *Heavy-chain Antibody* »
- **hnNOE** : « *heteronuclear Nuclear Overhauser Effect* »
- **HSQC** : expérience RMN de corrélation proton – azote
- **HSQC 6024** : spectre ¹⁵N-HSQC de TEM-1 réalisé par Savard *et al.*⁽⁵⁶⁾

- **IRT** : enzyme résistante aux inhibiteurs de TEM (« *Inhibitor-Resistant TEM* »)

- **k₂** : constante cinétique d'acylation
- **k₃** : constante cinétique de désacylation
- **k_{cat}** : constante (ou turnover) catalytique
- **K_D** : constante thermodynamique de dissociation
- **K_i** : constante d'inhibition
- **K_m** : constante de Michealis-Menten
- **k_{off}** : constante cinétique de dissociation

Liste des abréviations

- k_{on} : constante cinétique d'association
- **Liaison/pont/interaction H** : liaison/pont/interaction de type hydrogène
- **MβL** : métallo-β-lactamase
- **MD** : dynamique moléculaire (« *Molecular Dynamics* »)
- **ME** : minimisation d'énergie
- **MEI** : « *Modifying Enzyme Inhibitor* »
- **NB (= VHH)** : nanobody
- **NSR** : relaxation du spin nucléaire (« *Nuclear Spin Relaxation* »)
- ***P. notatum*** : *Penicillium notatum*
- **pbcc** : « *Periodic Boundary Conditions* »
- **PBP** : « *Penicillin Binding Proteins* »
- **PDB** : base de données de protéines (« *Protein Data Bank* »)
- **PMD** : maladies liées à un mauvais repliement protéique (« *Protein-Misfolding Diseases* »)
- **R_1** : taux de relaxation longitudinale
- **R_2** : taux de relaxation transversale
- **RMN** : résonance magnétique nucléaire
- **RMSD** : « *Root-Mean-Square Deviation* »
- **RMSF** : « *Root-Mean-Square Fluctuation* »
- **RX** : rayons X
- **S^2** : paramètre d'ordre
- **SβL** : β-lactamase à sérine active
- **scFv** : fragment variable d'un anticorps conventionnel composé des domaines VH et VL
- **τ_c** : temps de corrélation
- **T_1** : temps de relaxation longitudinale
- **T_2** : temps de relaxation transversale
- **TEM-1_A** : conformation A du modèle cristallographique 1M40 de TEM-1
- **TEM-1_B** : conformation B du modèle cristallographique 1M40 de TEM-1
- **TEM-1_C** : modèle de TEM-1 seul issu de la structure cristallographique de TEM-1_NB
- **TEM-1_NB** : modèle de TEM-1 complexé avec le nanobody cAb_{TEM-1}
- **TEM-1_témoin** : spectre ¹⁵N-HSQC de TEM-1 réalisé à l'ULiège
- **TEM-121_NB** : modèle de TEM-121 complexé avec le nanobody cAb_{TEM-1}
- **T_m** : température de demi-dénaturation thermique
- **VHH (= NB)** : nanobody
- **VH/VL** : domaine variable de la chaîne lourde (« *Heavy* »)/légère (« *Light* »)

Si ce document semble dépasser la limite des 50 pages de texte autorisées, c'est uniquement parce que figures, graphiques et tableaux ont régulièrement été insérés au sein de celui-ci pour illustrer les résultats et permettre leur compréhension tout en évitant au lecteur de constamment devoir aller rechercher les illustrations correspondantes dans les annexes. Néanmoins, lorsque ces figures, graphiques et tableaux sont retirés afin de n'obtenir que le texte principal, 49 pages sont obtenues et la limite imposée est de ce fait respectée.

Introduction

1. Avant l'histoire, la présentation des personnages

1.1. Les β -lactamines : cette vaste famille d'antibiotiques

1.1.1. De la pénicilline aux β -lactamines

Bien qu'il ne fut pas la personne qui conduisit au développement et à l'utilisation de la pénicilline, le nom d'Alexander Fleming (figure 1) demeure indubitablement associé à la découverte accidentelle de cet antibiotique en 1928, suite la contamination de ses cultures de Staphylocoques par un champignon qu'il appellera *Penicillium notatum*.⁽¹⁾⁽²⁾ Un tel antagonisme entre moisissures et bactéries avait néanmoins déjà préalablement été observé en 1897 par Ernest Duchesne (figure 2) mais dont les recherches tombèrent dans l'oubli.⁽³⁾ Par la suite, Fleming réussit à concentrer la substance bactériostatique excrétée par *P. notatum* qu'il nommera « pénicilline », et se rendit également compte qu'elle pouvait agir sur bien d'autres genres bactériens que les Staphylocoques.⁽¹⁾⁽²⁾

Cette découverte constitua l'une des plus grandes avancées dans la lutte contre les infections bactériennes et mena progressivement à l'ère des antibiotiques qui débuta une dizaine d'années plus tard, avec notamment les noms d'Howard Florey, Ernst Chain et Norman Heatley, respectivement pathologiste, biochimiste et biologiste.⁽¹⁾⁽²⁾ Les nombreuses recherches qui ont suivi ont permis d'en découvrir de nombreux autres et ont conduit à l'établissement de familles d'antibiotiques, incluant les β -lactamines. Ces dernières forment une très vaste classe d'antibiotiques parmi les plus efficaces et les plus utilisées actuellement, que ce soit suite à leur facilité d'administration, leur faible toxicité ou encore leur forte activité.⁽⁴⁾ Ces molécules peuvent, en effet, agir à l'encontre à la fois des Gram⁺ et Gram⁻ car elles inhibent les « *Penicillin Binding Proteins* » (PBPs), une superfamille d'enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, élément commun et indispensable à la survie de toutes les bactéries.⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Alexander Fleming

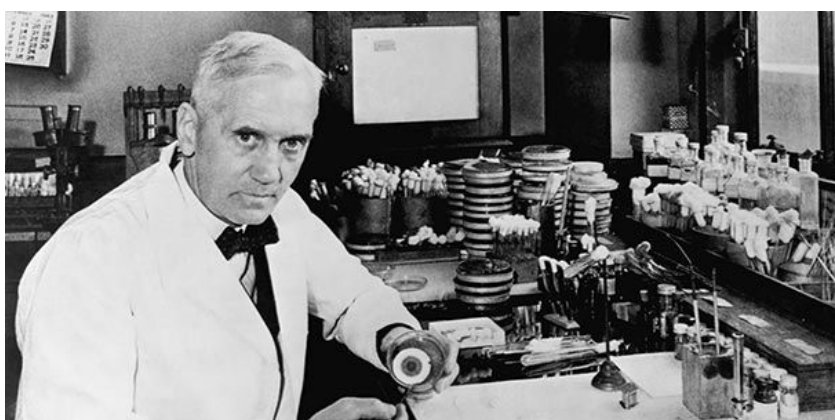


Figure 1. Photographie d'Alexander Fleming dans laboratoire où il découvrit la pénicilline.

Ernest Duchesne



Figure 2. Photographie d'Ernest Duchesne.

1.1.2. Les β -lactamines et les bactéries : le récit d'un antique combat

Les β -lactamines sont des molécules caractérisées par la présence d'un noyau β -lactame (figure 3) auquel est fusionné un hétérocycle azoté qui contient toujours une fonction carboxylique. Elles peuvent être scindées en quatre sous-familles sur base de la nature de cet hétérocycle : ce sont les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Le tableau 1 reprend la structure chimique de ces familles, ainsi que quelques exemples d'antibiotiques pour chacune.⁽⁵⁾⁽⁶⁾

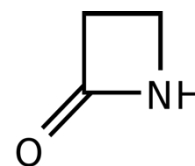


Figure 3. Structure chimique d'un noyau β -lactame.

Les pénicillines, pour lesquelles le noyau β -lactame est fusionné à un cycle thiazolidine (tableau 1), furent les premiers antibiotiques à être utilisés, dès les années 1940. Elles se scindent en pénicillines naturelles et artificielles. C'est à cette seconde classe qu'appartient la célèbre ampicilline, qui est généralement vue comme l'un des premiers succès en vue du développement de traitements efficaces face à un plus large spectre de bactéries.⁽⁶⁾⁽⁷⁾ Malgré ceci, des phénomènes de résistance par production d'enzymes capables d'hydrolyser les pénicillines chez les bactéries de type Gram⁺ ont commencé à apparaître après 20 ans d'utilisation de cette classe d'antibiotiques. Les Gram⁻ ont rapidement rejoint le mouvement initié par leurs consœurs, avec des conséquences bien plus dramatiques du fait du haut degré de mobilité inter-espèce de leurs enzymes, caractéristique non partagée avec les Gram⁺.⁽⁸⁾

Cette période fut l'une des plus intenses en termes de découverte et de développement d'antibiotiques et autres inhibiteurs, principalement à l'encontre des enzymes de type TEM.⁽⁸⁾ C'est ainsi que les céphalosporines, qui présentent un cycle dihydrothiazine fusionné au noyau β -lactame (tableau 1), commencèrent à être utilisées, avec d'abord les céphalosporines de première génération (C1G), incluant la céphaloridine et la céfalotine, et ensuite de deuxième génération (C2G), dont la céfoxitine fait partie, respectivement dans les années 1960 et 1970.⁽⁸⁾ Leur principale différence se situe au niveau de leur spectre d'action : les C1G ne sont, en effet, actives qu'à l'encontre des Gram⁺ alors que les C2G le sont à la fois contre les Gram⁺ et les Gram⁻.⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ Malheureusement, tout comme pour les pénicillines, les C1G et les C2G ont rapidement fait face à des problèmes de résistance.⁽⁸⁾ La famille des céphalosporines a alors continué à s'étendre avec l'arrivée, en 1980, des céphalosporines de troisième génération (C3G), incluant notamment la céfotaxime et la ceftazidime.⁽⁸⁾ Leurs caractéristiques sont améliorées de manière générale par rapport aux C2G : stabilité accrue, spectre d'action élargi, CMI réduites.⁽⁶⁾⁽⁷⁾ Les céphalosporines de quatrième génération (C4G), parmi lesquelles se trouve la céfépime, ont finalement été développées à partir des années 2000 afin de pouvoir répondre à des infections plus sévères.⁽⁶⁾⁽⁸⁾

Les carbapénèmes et les monobactames (tableau 1) ont été découverts et étudiés à partir des années 1980, soit en parallèle avec les C3G.⁽⁸⁾ Du fait de leur large spectre bactérien et de leur grande stabilité, ils sont plutôt utilisés en dernier recours face à des infections particulièrement sévères causées par des bactéries multi-résistantes.⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Néanmoins, l'utilisation de ces nouvelles classes d'antibiotiques, et particulièrement celle des C3G, a conduit, de manière prévisible, à l'émergence de nouvelles formes de résistance particulièrement puissantes, avec d'abord les ESBLs (« *Extended-Spectrum β -Lactamases* »), une famille d'enzymes très hétérogène dont la plupart dérivent des enzymes TEM-1, TEM-2 et SHV, et qui peuvent hydrolyser à la fois les céphalosporines de dernière génération et les monobactames.⁽⁸⁾ Comme si cela n'était pas suffisant, le phénomène s'est amplifié avec l'apparition des carbapénèmases, lesquelles constituent le mécanisme principal de résistance envers les carbapénèmes chez les Gram⁻ et ont conduit à une épidémie mondiale.⁽⁸⁾ La course pour la recherche de nouveaux antibiotiques et inhibiteurs continue donc, encore aujourd'hui...

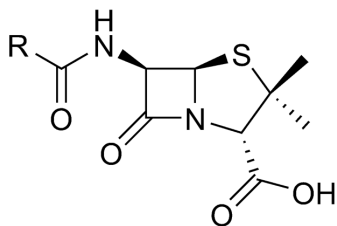
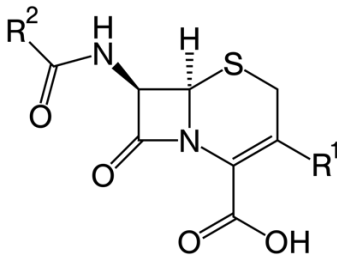
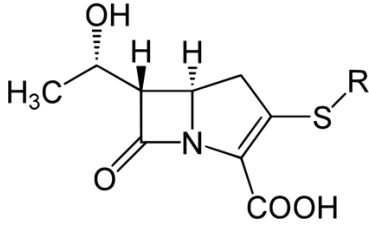
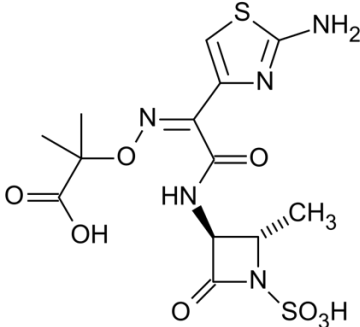
SOUS-FAMILLE	STRUCTURE CHIMIQUE	CLASSIFICATION & EXEMPLES
Pénicilline (cycle β -lactame + cycle thiazolidine)		<u>Pénicillines naturelles</u> <u>Pénicillines synthétiques</u> : ampicilline
Céphalosporine (cycle β -lactame + cycle dihydrothiazine)		<u>C1G</u> : céfalotine, céphaloridine <u>C2G</u> : céfoxitine <u>C3G</u> : céfotaxime, ceftazidime <u>C4G</u> : céfépime
Carbapénème		Imipénem Ertapénem Méropénem
Monobactame		Aztréonam (structure ci-contre)

Tableau 1. Récapitulatif des quatre sous-familles de β -lactamines et de leurs caractéristiques structurales. Pour chaque famille, quelques exemples typiques sont indiqués.

1.2. La riposte bactérienne : les β -lactamases

1.2.1. Les mécanismes de résistance bactérienne

Face au développement de tous ces antibiotiques, les bactéries se sont rapidement « défendues » en mettant en place divers systèmes de résistance qui peuvent se subdiviser en trois types selon leur effet : le blindage ; le camouflage et l'esquive ; et, finalement, le brouillage (figure 4).⁽⁹⁾

Le principe du blindage consiste à réduire l'accès de l'antibiotique à ses cibles. Ceci peut se faire de deux façons : soit par la modification de la perméabilité de la membrane externe, principalement chez les Gram⁻, notamment en diminuant la quantité de porines, ce qui empêche l'entrée de l'antibiotique ; soit par la production de pompes à efflux, expulsant ce dernier à l'extérieur de la cellule.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

Le camouflage et l'esquive sont des techniques de défense basées sur la modification de la sensibilité des cibles des antibiotiques. Si la première rend la cible insensible à l'action de l'antibiotique, la seconde, quant à elle, consiste en sa substitution par une autre molécule non vulnérable sur laquelle l'antibiotique se fixe. Il est à noter que la production de PBPs supplémentaires a également été observée.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

Le troisième et dernier système de défense mis en place par les bactéries est le brouillage. Il s'agit du mécanisme le plus répandu car le plus dévastateur et le plus efficace. Il repose en effet sur l'inactivation directe de l'action de l'antibiotique par synthèse d'enzymes qui sont capables de l'hydrolyser et qui induisent ainsi un phénotype résistant chez la bactérie : ces enzymes sont les β -lactamases.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

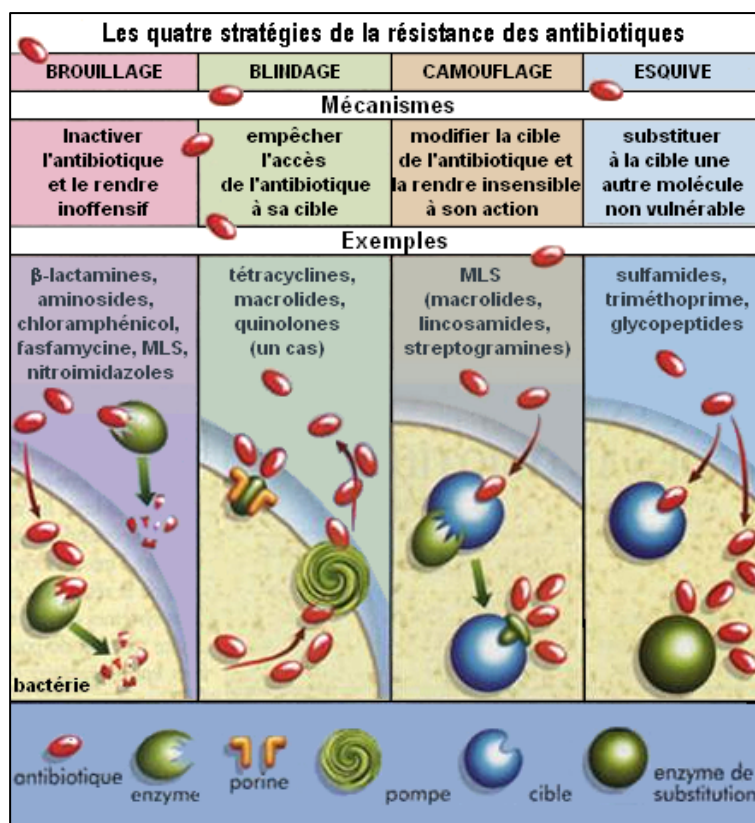


Figure 4. Représentation schématique des différents mécanismes de résistance bactérienne. Le principe de chaque mécanisme est brièvement décrit et quelques exemples typiques de molécules sont donnés.⁽⁹⁾

1.2.2. Les β -lactamases, ces mangeuses de β -lactamines

1.2.2.1. *Quelques généralités sur ces enzymes*

Les β -lactamases forment une importante famille d'enzymes capables d'hydrolyser la liaison amide du noyau β -lactame de presque l'entièreté des β -lactamines, avec pour conséquence leur inactivation.⁽⁴⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ Ce sont donc elles les principales responsables des ravages (mentionnés au point 1.1.2) observés depuis 1960 sur l'utilisation de ces antibiotiques.⁽⁸⁾ L'apparition des premières souches résistantes chez les Gram⁺ a entraîné la mise en place d'un grand nombre d'études biochimiques sur les β -lactamases provenant d'isolats cliniques, faisant de la plupart d'entre elles des exemples représentatifs d'enzymes et fournissant des outils pour de futures études.⁽⁸⁾

Ainsi, il s'est notamment avéré que, bien qu'elles soient extrêmement répandues à travers le monde bactérien (et plus particulièrement chez les Gram⁻), la structure des β -lactamases ne varie que très peu entre les différentes espèces bactériennes.⁽⁴⁾⁽¹¹⁾ En outre, si la première observation laborantine de l'existence d'une enzyme d'origine bactérienne capable de détruire la pénicilline date de 1940, des analyses phylogénétiques ont estimé que certaines β -lactamases auraient plus de deux milliards d'années.⁽⁸⁾ Leur apparition ne peut donc pas être vue comme une conséquence à la pression exercée par l'utilisation thérapeutique des antibiotiques.⁽⁸⁾ Finalement, leur analogie avec les PBPs a été étudiée en détail ; et certaines analyses structurales ont montré qu'un même ancêtre commun a donné naissance aux différents types de PBPs et de β -lactamases de manière indépendante.⁽⁸⁾⁽¹³⁾

1.2.2.2. *Les deux grands systèmes de classification*

Différents systèmes de classification des β -lactamases ont été développés, mais les deux principaux sont ceux de Bush et d'Ambler.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

La classification de Bush, également appelée classification fonctionnelle, fut la première mise en place, dès 1995. La définition de ses différents groupes fonctionnels se base sur différents critères : bactériologique, profil des substrats, type d'inhibition, point isoélectrique et séquence nucléo-peptidique à partir de 2010.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ De cette manière, ces groupes rassemblent des enzymes unies entre elles selon leur phénotype dans des isolats cliniques.⁽¹⁴⁾ Les principaux sont les suivants : le groupe 1 des céphalosporinases ; le 2a des pénicillinases ; le 2b des β -lactamases à large spectre, auquel appartient l'enzyme TEM-1 ; le 2be des β -lactamases à large spectre étendu ; le 2c des carbénicillinases ; le 2f, 3a et 3b des carbapénémases.⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

La classification fonctionnelle est généralement complétée par la classification moléculaire ou d'Ambler, qui se base sur la taille moléculaire et l'analogie des séquences des enzymes.⁽¹⁵⁾ Ce dernier critère avait déjà été proposé dès les années 1980, mais les technologies nécessaires à sa mise en place, notamment celles de séquençage, n'étaient pas encore disponibles à cette époque.⁽¹⁵⁾ Quatre classes moléculaires ont été définies : les classes A, B, C et D.⁽¹⁶⁾ Les enzymes des classes A, C et D sont des β -

lactamases à sérine active (SβLs) alors que celles de la classe B sont des métallo-β-lactamases (MβLs).⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ Pour rappel, les premières utilisent une sérine présente au sein de leur site actif pour hydrolyser le noyau β-lactame, alors que l'activité des secondes dépend de la présence d'un ou deux ion(s) zinc.⁽¹¹⁾

1.2.2.3. La famille TEM

Une des familles de β-lactamases parmi les plus communes et les plus redoutables est la famille TEM, qui appartient aux β-lactamases de classe A.⁽¹²⁾ Ces enzymes sont retrouvées chez une très grande diversité d'espèces bactériennes : Entérobactéries, Neisseriacées, Pseudomonas, Haemophilus, Klebsiella pour ne citer que celles-ci.⁽¹²⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾ Ceci est dû à leur caractère plasmidique qui facilite grandement leur dissémination à travers le monde bactérien, principalement chez les Gram⁻.⁽⁴⁾⁽¹²⁾

A l'heure actuelle, plus de 200 TEM ont déjà été recensées⁽¹³⁾, mais la première qui fut découverte est TEM-1, en 1963. Cette dernière fut isolée d'une souche d'*Escherichia coli* chez un patient grec nommé Temoneira (d'où le nom TEM).⁽⁴⁾⁽¹⁸⁾ TEM-1 se retrouve chez toutes les bactéries Gram⁻ et est une β-lactamase dite « classique », c'est-à-dire capable de cliver les pénicillines comme l'ampicilline, ainsi que les C1G et les C2G.⁽⁴⁾⁽¹⁷⁾ C'est son émergence qui est la principale responsable du développement des céphalosporines de dernière génération (C3G et C4G).⁽¹²⁾

Finalement, la famille TEM possède un haut taux de mutations ponctuelles.⁽²⁰⁾ Grâce à ceci, de nombreuses enzymes ont pu acquérir un phénotype ESBL, les rendant actives contre pratiquement l'entièreté des β-lactamines, exception faite des carbapénèmes.⁽⁴⁾ Les deux substitutions les plus fréquemment retrouvées chez les TEM-ESBL sont l'Arg164Ser et la Gly238Ser et sont responsables d'une résistance accrue envers la céfotaxime et la ceftazidime.⁽¹¹⁾ De plus, certains variants ont également acquis un caractère IRT (« *Inhibitor-Resistant TEM* »), ce qui leur permet d'être résistants contre des inhibiteurs de β-lactamases tels que l'acide clavulanique. Finalement, certaines enzymes TEM, comme TEM-121⁽¹⁹⁾, combinent à la fois un caractère ESBL et IRT, ce qui les rend particulièrement dangereuses. Il est intéressant de noter que ces mutations moduleraient le réseau d'interactions qui s'établit à proximité du site actif et, de cette manière, sa dynamique, avec pour conséquence la capacité à pouvoir hydrolyser de nouveaux substrats. De ce fait, elles sont généralement observées dans des régions présentant une certaine flexibilité et un haut couplage dynamique avec le site actif.⁽²⁰⁾

1.2.2.4. Structure des β-lactamases de classe A

Bien que leur séquence primaire varie considérablement, les β-lactamases de classe A présentent une structure tertiaire relativement bien conservée. Elle consiste en deux domaines intimement connectés : un premier domaine α contenant huit hélices (H2 – H9) et un second domaine αβ composé de cinq feuillets β antiparallèles (S1 – S5) sur lesquels trois hélices (H1, H10 et H11) sont placées face au solvant.⁽⁴⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾ Une large dépression sépare les deux domaines et forme le site actif, qui peut être vu comme sillon étroit au

sein duquel un grand nombre de substrats peuvent être reconnus.⁽²¹⁾⁽²²⁾ En outre, quatre éléments situés au voisinage de la sérine active sont conservés chez l'ensemble des membres des β -lactamases de classe A, dont les TEM, et semblent directement ou indirectement impliqués dans la reconnaissance du substrat et/ou dans le mécanisme réactionnel (figure 5). De plus, les données cristallographiques suggèrent que les résidus composant ces éléments sont impliqués dans la formation d'un réseau de liaisons H au sein du site actif (figure 5).⁽⁴⁾⁽¹¹⁾⁽²¹⁾

Le premier motif est le motif Ser70-X-X-Lys73. La Ser70 est la sérine active, impliquée dans l'étape d'acylation de l'antibiotique.⁽⁴⁾⁽¹¹⁾⁽²¹⁾ Les chaînes latérales de la Ser70 et de la Lys73 sont très proches et reliées par un pont hydrogène (H).⁽¹¹⁾ La Lys73, à l'aide de la Glu166 et d'une molécule d'eau, active la Ser70, même si le mécanisme reste controversé.⁽¹²⁾

Le deuxième élément correspond à la séquence Ser130-X-Asn132, où X est presque toujours un acide aspartique.⁽⁴⁾⁽¹¹⁾ Il s'agit de la boucle SDN, qui est située dans le domaine α et qui entoure le site actif.⁽¹¹⁾ La Ser130, avec une molécule d'eau, est impliquée dans la formation d'un réseau de liaisons H important pour la désacylation.⁽⁴⁾ L'Asn132, quant à elle, effectue une liaison H avec les pénicillines et les céphalosporines afin de les fixer et de les positionner correctement dans le site actif.⁽¹²⁾ Du fait de leur rôle, les chaînes latérales de ces deux résidus sont dirigées vers l'intérieur du site actif.⁽¹¹⁾

La séquence Lys234-Thr/Ser235-Gly236 constitue le troisième motif.⁽⁴⁾⁽¹¹⁾⁽²¹⁾ Il se retrouve sur un feuillet β du domaine $\alpha\beta$ et forme un mur à l'opposé de la cavité catalytique.⁽¹¹⁾ La Lys234 et la Ser/Thr235, qui sont reliées entre elles par le biais d'une liaison H, interagissent avec l'ensemble des pénicillines, des céphalosporines et des carbapénèmes.⁽¹²⁾ Elles contribuent non seulement à la liaison du substrat, mais aussi à la stabilisation des formes de transition apparaissant lors des étapes d'acylation et de désacylation.⁽¹²⁾ Il est indispensable que le troisième résidu soit une glycine, c'est-à-dire un résidu sans chaîne latérale, faute de quoi l'approche du substrat serait fortement compromise.⁽¹¹⁾

Le quatrième et dernier élément conservé correspond à la boucle Ω (Arg164 – Asp179).⁽⁴⁾⁽¹¹⁾ Avec la boucle SDN, elle termine de fermer le site actif.⁽¹²⁾ Elle contient notamment la base générale Glu166 et l'Asn170 qui interviennent tous deux lors de la désacylation de l'antibiotique.⁽¹³⁾ En outre, l'Arg164 forme un pont salin avec l'Asp179 qui est responsable de la forme en « Ω » de cette loupe, qui lui a donné son nom, et qui permet le positionnement correct de la Glu166 et de l'Asn170.⁽¹³⁾

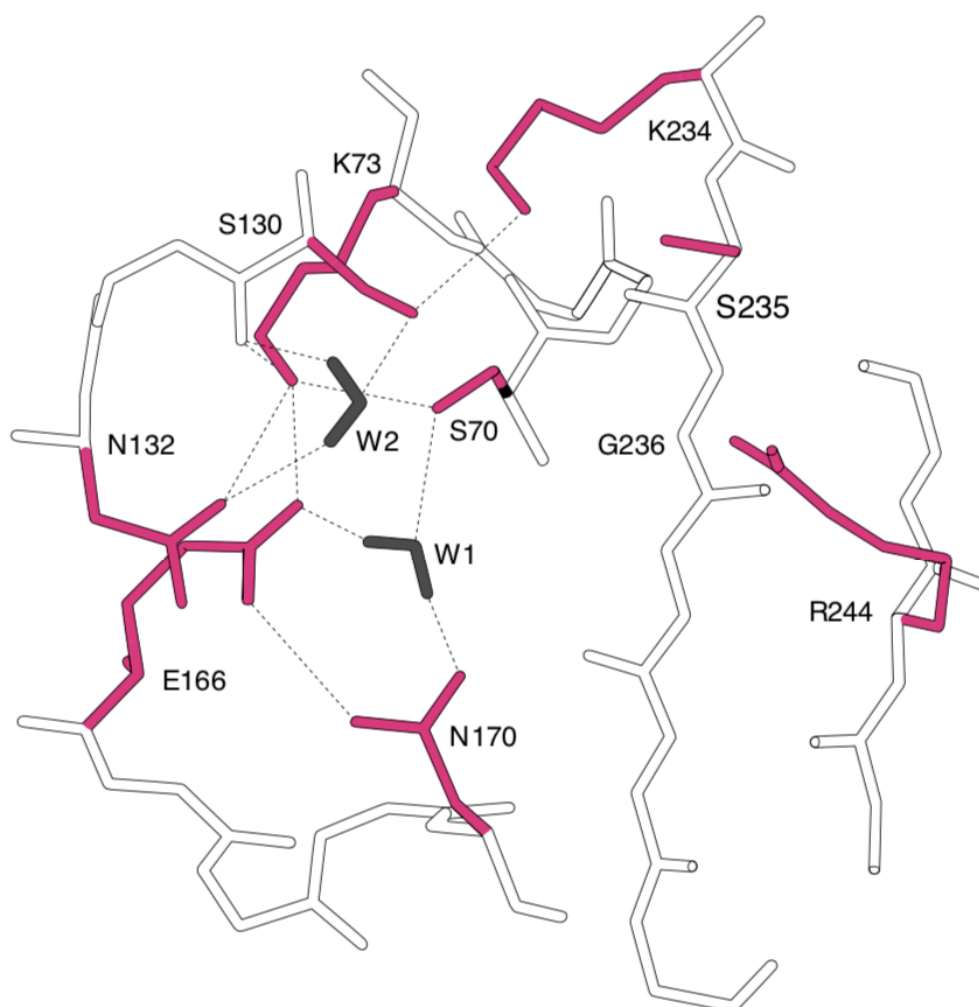


Figure 5. Représentation des résidus composant les quatre éléments conservés et du réseau de liaisons H (lignes en pointillé) dans le site actif des β -lactamases de type TEM. Les résidus identifiés et représentés en rose sont ceux qui participent au processus catalytique. Les deux molécules d'eau (W1 et W2, en gris) sont également supposées prendre part à ce processus.⁽¹¹⁾

1.2.2.5. Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel (figure 6) des enzymes TEM suit le mécanisme général des β -lactamases de classe A, lui-même relativement similaire à celui observé chez les PBPs. Il commence par la formation d'un premier complexe, le complexe d'Henri-Michaelis, résultant d'une association non covalente entre la cavité de l'enzyme et le substrat. La sérine active (Ser70) effectue ensuite une attaque nucléophile par le biais de son groupement hydroxyle sur la fonction carbonyle du noyau β -lactame de l'antibiotique, avec une ouverture concomitante de ce cycle. Cette réaction forme un ester covalent appelé l'acyl-enzyme. Ces deux étapes constituent la phase d'acylation du substrat. Finalement, une molécule d'eau, activée par une base générale⁽¹⁸⁾ (Glu166 dans le cas de TEM) provoque l'hydrolyse rapide de l'acyl-enzyme, permettant de reformer la β -lactamase de départ et générant un produit inactif du fait de son cycle β -lactame ouvert. L'ensemble forme la phase de désacylation.⁽¹¹⁾⁽²¹⁾

Cette réaction peut être représentée sous la forme de l'équation chimique suivante : $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow ES^* \rightarrow E + P$, où E représente l'enzyme ; S , le substrat (une β -lactamine) ; ES , le complexe d'Henri-Michaelis ; ES^* , l'acyl-enzyme et P , le produit de dégradation inactif du substrat.⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

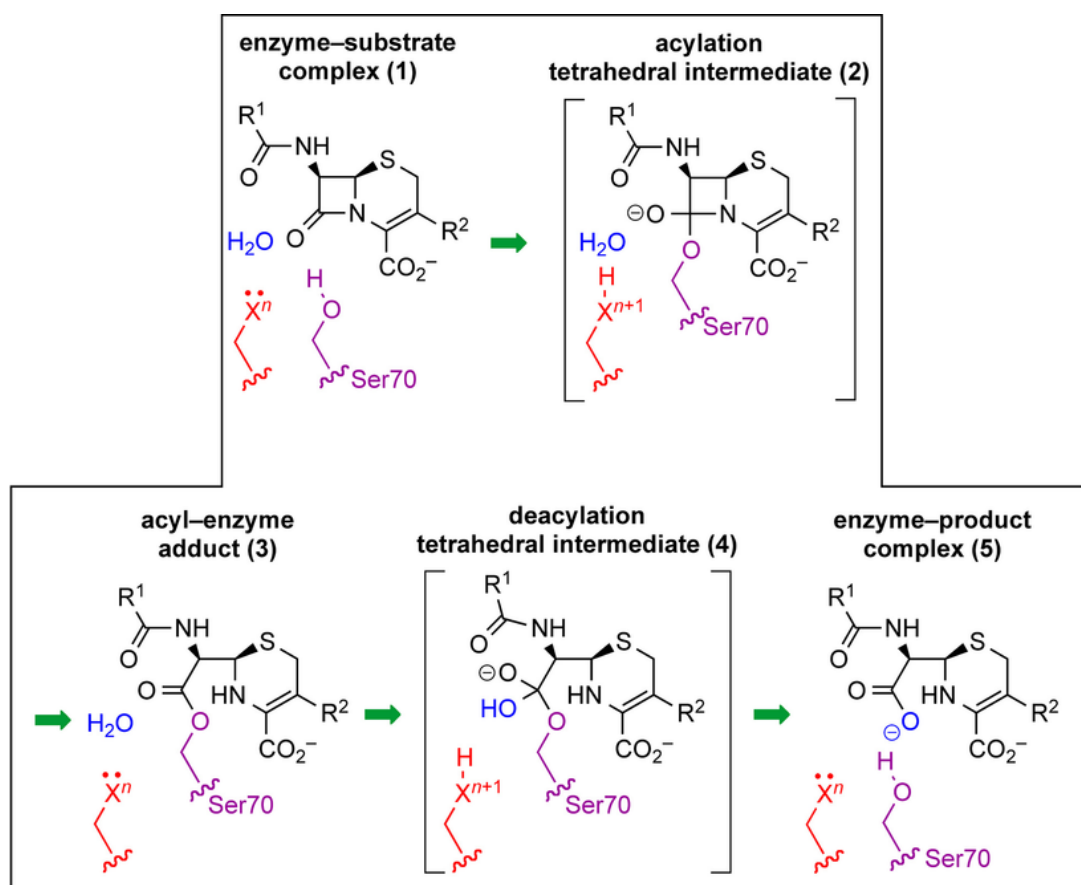


Figure 6. Représentation schématique du mécanisme catalytique d'une β -lactamase de classe A illustré pour un substrat appartenant à la famille des céphalosporines. Le complexe (2) correspond au complexe d'Henri-Michaelis et le complexe (3) correspond à l'acyl-enzyme.

Outre la sérine active (Ser70) et la base générale (Glu166), qui sont particulièrement importantes pour les étapes d'acylation et de désacylation, un certain nombre de résidus est impliqué dans l'établissement d'un vaste réseau de liens H qui intervient lors de la stabilisation du substrat et/ou du mécanisme catalytique. Certains ont déjà été cités au point 1.2.2.4. : Lys73, Ser130, Asn132, Lys234, Ser/Thr235, Asn70. S'ajoutent à cette liste l'Ala237 qui, avec la Ser70, forme le trou de l'oxyanion⁽¹²⁾ ; ou encore l'Arg244 qui, avec la Val216, sert « d'ancre électrostatique » pour une molécule d'eau conservée qui serait une source de protons essentielle pour l'inactivation de l'antibiotique.⁽¹¹⁾⁽¹⁷⁾

1.3. Les nanobodies

1.3.1. La course à la recherche d'inhibiteurs des β -lactamases

Les β -lactamases constituent donc un problème virulent et récurrent pour les mondes médicaux et vétérinaires où les β -lactamines sont fortement utilisées depuis des décennies. Malgré le nombre considérable d'antibiotiques disponibles et de recherches en cours, le monde scientifique peine à trouver des solutions puisque l'apparition de nouvelles résistances entraîne très rapidement une inefficacité des antibiotiques, parfois même avant leur commercialisation.⁽²³⁾⁽²⁴⁾ Différentes approches ont alors été envisagées pour lutter face à la réponse bactérienne.⁽²³⁾ La solution la plus évidente consiste en la recherche de nouveaux antibiotiques de type β -lactamine face auxquels les bactéries ne sont pas résistantes.⁽⁴⁾⁽²³⁾ Néanmoins, cette approche a déjà montré ses limites et, de plus, aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a été identifiée depuis 1984.⁽⁴⁾

Une seconde possibilité consiste en l'association entre un « *Antibiotic Resistance Breaker* » (ARB) avec une β -lactamine. Les ARBs sont des composés capables d'accroître l'efficacité de cette dernière en agissant contre les mécanismes de résistance développés par les bactéries à leur rencontre. Ils peuvent être subdivisés en trois catégories différentes : (1) les « *Modifying Enzyme Inhibitors* » (MEIs), (2) les perméabilisants membranaires et (3) les inhibiteurs des pompes à efflux (EPIs).⁽²³⁾ Les inhibiteurs de β -lactamases (BLIs) appartiennent à la première catégorie et forment de manière générale la classe la plus performante. Comme les β -lactamines, ils présentent un noyau β -lactame, mais le reste de leur structure chimique ne correspond pas à celle de ces antibiotiques. Le premier BLI découvert fut l'acide clavulanique. Il est capable d'acyler de manière irréversible la sérine active de SBLs produites à la fois chez les Gram⁺ et les Gram⁻. Il est généralement administré avec des pénicillines afin de combler son effet antibactérien qui est insuffisant.⁽⁴⁾⁽²³⁾ Les polymyxines, notamment la B et la E, sont les principaux perméabilisants membranaires utilisés. Ce sont des antibiotiques qui rompent la membrane externe des Gram⁻. Pour terminer, les EPI agissent contre les pompes à efflux qui expulsent la β -lactamine à l'extérieur de la bactérie. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucun EPI n'a encore été validé en vue d'une utilisation clinique.⁽²³⁾

Malheureusement, des formes de résistance à la thérapie combinée ont déjà été reportées.⁽⁴⁾⁽²³⁾ Ainsi, aussi innovant que soit ce concept, il n'est pas suffisant et la découverte de nouvelles formes

d'inhibiteurs est véritablement nécessaire. Une perspective prometteuse semble être celle formée par l'utilisation d'inhibiteurs dont la structure est complètement différente de celle des β -lactamines (c'est-à-dire sans noyau β -lactame).⁽²⁴⁾ C'est dans cette optique que de plus en plus d'études se penchent sur le développement d'anticorps monoclonaux de Camélidés, nommés nanobodies, capables d'inhiber l'activité catalytique d'enzymes.⁽²⁴⁾

1.3.2. Structure d'un nanobody

Les nanobodies dérivent d'anticorps particuliers retrouvés chez les Camélidés, appelés HcAbs (« *Heavy-chain Antibody* »). Pour rappel, un anticorps « conventionnel » est formé de deux chaînes lourdes H (« *Heavy* ») et de deux chaînes légères L (« *Light* »), reliées entre elles par l'intermédiaire de ponts disulfures (figure 7, A). Chaque chaîne H possède trois domaines constants CH1, CH2 et CH3, ainsi qu'un domaine variable VH qui est situé en N-terminal. La chaîne L, quant à elle, ne contient qu'un seul domaine constant CL et un seul domaine variable VL, également situé en N-terminal. Le double domaine VH-VL constitue le fragment variable scFv de l'anticorps (figure 7, B), qui est responsable de la reconnaissance de l'antigène.⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾

Bien que ce type d'anticorps soit déjà fortement utilisé par l'industrie pharmaceutique, la recherche tend à les écarter du fait de leur taille volumineuse et de leur immunogénicité, au profit de fragments d'anticorps ou, en tout cas, d'anticorps plus petits. C'est ainsi que les HcAbs se sont retrouvés au cœur de l'attention puisqu'ils sont caractérisés par l'absence du domaine CH1 au niveau des deux chaînes H et par l'absence des deux chaînes L (figure 7, D). Ce faisant, le domaine de liaison à l'antigène est constitué d'un seul domaine variable, appelé VHH, situé à l'extrémité N-terminale de la chaîne H (figure 7, E). C'est ce domaine VHH qui constitue un nanobody (NB). Autrement dit, les nanobodies correspondent aux plus petits fragments d'anticorps monomériques qui puissent reconnaître et lier un antigène.⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾

D'un point de vue structural, tout comme les domaines VH, un nanobody comprend neuf feuillets β (1, 2, 3, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7) connectés entre eux par des boucles et par un pont disulfure intracaténaire (figure 7, F). Son extrémité N-terminale contient trois boucles CDRs (« *Complementary-Determining Regions* »), CDR1, CDR-2 et CDR-3 (figure 7, F), qui présentent une hypervariabilité de séquence, laquelle est complémentaire à celle de l'antigène, faisant des CDRs les responsables de l'interaction avec ce dernier. Entre les boucles CDRs s'intercalent des régions appelées FR (« *Framework* ») dont la séquence est conservée et qui sont au nombre de quatre (figure 7, F).⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾

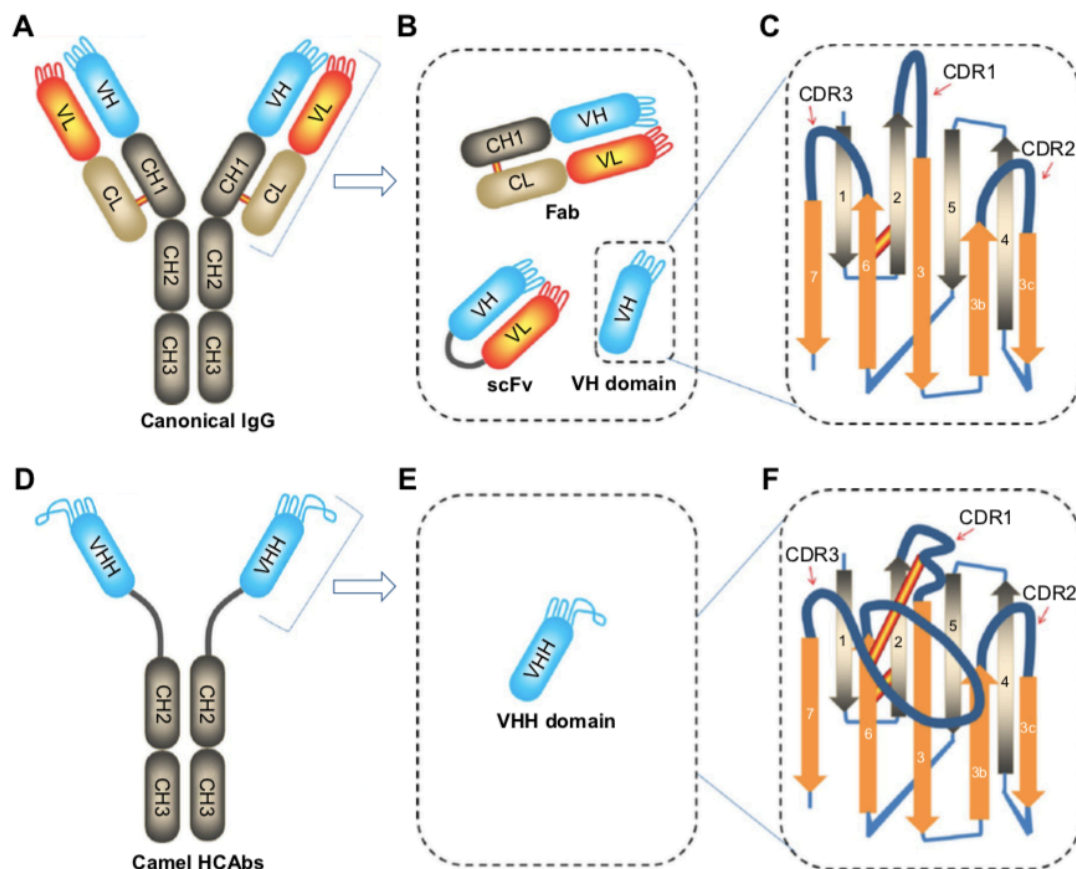


Figure 7. Représentation schématique d'un anticorps conventionnel de type IgG et d'un anticorps de Camélidé HcAb.⁽²⁸⁾

(A) Représentation d'un anticorps conventionnel humain de type IgG. (B) Représentation des domaines Fab, scFv et VH d'un anticorps conventionnel. (C) Structure du domaine VH d'un anticorps conventionnel.

(D) Représentation d'un anticorps de Camélidé de type HcAb ; (E) Représentation du domaine VHH d'un HcAb (nanobody). (F) Structure du VHH.

1.3.3. Caractéristiques des nanobodies

Les nanobodies présentent des propriétés biophysiques, biochimiques et structurales qui sont particulièrement intéressantes. Les principales sont leur taille (12 à 15 kDa), bien inférieure à celle des anticorps conventionnels (150 kDa), leur nature monomérique et leur structure globulaire qui les rend plus adaptés pour l'accès à certaines cibles cachées ou enfouies ainsi que pour la pénétration des tissus.⁽²⁷⁾ Ils sont également caractérisés par une solubilité accrue et une tendance à l'agrégation réduite. Ceci s'explique principalement par la présence d'un nombre beaucoup plus important de résidus hydrophiles sur les régions FR par rapport aux anticorps humains.⁽²⁶⁾

Ces caractéristiques ne modifient en rien l'affinité relativement élevée avec laquelle les nanobodies peuvent lier un antigène. Leur constante d'équilibre de dissociation K_D est en effet de l'ordre du nanomolaire, voire du picomolaire, tout comme celle des anticorps conventionnels. Leurs paramètres cinétiques d'association k_{on} et de dissociation k_{off} , quant à eux, varient respectivement de 10^5 à 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ et de 10^{-3} à 10^{-4} s^{-1} , témoignant de la formation rapide d'un complexe qui se dissocie lentement.⁽²⁷⁾

Finalement, ces composés sont généralement non immunogènes une fois injectés chez l'homme.⁽²⁷⁾ Ils présentent un repliement rapide, une haute stabilité chimique (pH extrême), physique (T_m situé entre 60 et 80°C) et biologique (protéases), ainsi qu'une bonne expression recombinante dans divers systèmes (bactérien, fongique, mammalien, végétal) et, ce, à des coûts réduits.⁽²⁷⁾⁽²⁹⁾

1.3.4. Quelques applications thérapeutiques des nanobodies

Ce sont tous ces atouts qui expliquent l'intérêt particulier que les nanobodies reçoivent depuis quelques décennies, puisqu'ils font d'eux des composés idéaux pour le screening de nouveaux types de molécules liantes pouvant être utilisées dans différents domaines.⁽²⁸⁾ De nombreux outils de biotechnologie dérivés de VHH ont ainsi été développés pour la recherche fondamentale, que ce soit pour l'immuno-précipitation, la dégradation protéique ou la purification d'affinité.⁽²⁸⁾ Les nanobodies se sont également révélés particulièrement utiles pour l'imagerie moléculaire, notamment en formant des nano-traceurs versatiles utilisables dans les cellules vivantes.⁽²⁸⁾ Des études plus récentes cherchent à les utiliser pour réaliser de l'imagerie vasculaire des tumeurs cérébrales ou pour développer des « *targeted molecular imaging* » agents, qui sont des agents auxquels est reliée une sonde et qui ciblent un biomarqueur spécifique d'un intérêt clinique.⁽²⁹⁾

Cependant, c'est principalement en vue de créer de nouveaux agents thérapeutiques et de diagnostic qu'ils sont étudiés.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾ En ce qui concerne l'aspect diagnostic, ils ont notamment permis de concevoir des sondes de détection pour diverses maladies, telles le cancer, les lésions athérosclérotiques ou la réponse inflammatoire.⁽²⁸⁾ Le développement des nanobodies en vue de fournir des agents thérapeutiques est, quant à lui, beaucoup plus récent.⁽²⁹⁾ Certaines études ont montré qu'ils pourraient notamment servir d'agents de distribution à travers la barrière hémato-encéphalique, permettant ainsi le développement de nouvelles thérapies face aux maladies neurodégénératives, comme celles causées par un mauvais repliement protéique (« *Protein-Misfolding Diseases* », PMDs), incluant notamment les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington ou encore les maladies à prions.⁽²⁹⁾

1.3.5. Les nanobody et les β -lactamases, le début d'une nouvelle histoire ?

Les nanobodies sont donc des composés de choix pour le ciblage d'épitopes protéiques ancrés, comme les sites actifs, généralement non accessibles aux anticorps conventionnels.⁽²⁹⁾ Ceci additionné aux nombreuses applications pour lesquelles ils servent déjà actuellement justifie l'idée selon laquelle ils peuvent être utilisés comme inhibiteurs d'enzymes telles les β -lactamases, ce qui a d'ailleurs déjà été rapporté par diverses études. Le groupe de Conrath *et al.* a en effet réussi à produire en 2001 deux nanobodies qui se sont avérés être des inhibiteurs des enzymes TEM-1 et BclI, respectivement des β -lactamases de classe A et B.⁽²⁴⁾ En 2013, un autre nanobody inhibant l'action de la métallo- β -lactamase VIM-4 en se fixant sur sa surface a été identifié par Sohier *et al.*⁽³⁰⁾

2. Et maintenant, passons à l'histoire

2.1. Le nanobody cAb_{TEM-1}

L'utilisation de nanobodies en vue de former des inhibiteurs de β -lactamases semble donc une approche prometteuse qu'il faut investiguer plus en détails. C'est pourquoi une vaste étude permettant de caractériser l'inhibition de TEM-1 par le nanobody cAb_{TEM-1} identifié en 2001 par le groupe de Conrath *et al.* a été initiée. Ce nanobody est en effet particulièrement intéressant pour l'élaboration de tests de diagnostic et d'essais de neutralisation. Cette étude porte sur deux aspects de l'inhibition : cinétique et structural.

Chose importante : l'objectif n'est pas d'identifier un nouvel inhibiteur de TEM-1, qui est une enzyme aujourd'hui facilement prise en charge. Il s'agit plutôt de réaliser une démonstration de faisabilité du développement et de l'utilisation de nanobodies comme inhibiteurs de β -lactamases de manière générale avec, pour objectif final, de pouvoir les appliquer contre celles qui posent plus de problèmes, comme les M β Ls. C'est avec ceci en tête que TEM-1, enzyme de référence, a été choisie.

2.2. Étude de spécificité et cinétique du nanobody cAb_{TEM-1}

Afin de comprendre l'interaction entre le nanobody cAb_{TEM-1} et TEM-1, une étude de spécificité et d'affinité a été réalisée par interférométrie bio-couche (BLI). Elle a montré que le nanobody était capable d'interagir avec différents membres de la famille TEM, notamment TEM-1 et TEM-121 et ce, avec une forte affinité. Le complexe formé est caractérisé par une association rapide et une dissociation lente. Ceci a été confirmé par des études cinétiques ultérieures.

D'autres études cinétiques ont montré que le profil d'inhibition de ce nanobody varierait entre les deux enzymes. En effet, il s'agirait d'un inhibiteur compétitif de TEM-1, ce qui sous-entend qu'il pourrait se fixer dans le site actif de l'enzyme. Par contre, il agirait comme inhibiteur non-compétitif de TEM-121. Cette dernière observation laisse sous-entendre que l'interface d'interaction entre le nanobody et les enzymes TEM-1 et TEM-121 diffèrerait avec celles-ci.

2.3. Études structurales de l'interaction entre cAb_{TEM-1} avec les enzymes TEM-1 et TEM-121

Les structures des complexes TEM-1_cAb_{TEM-1} (ci-après dénommé TEM-1_NB) et TEM-121_cAb_{TEM-1} (ci-après dénommé TEM-121_NB) ont été obtenues par cristallographie aux rayons X (RX).

Le modèle du complexe TEM-1_NB a montré qu'étonnement, malgré une inhibition de type compétitif, le nanobody ne se place pas dans le site actif de TEM-1, mais entre les boucles $\alpha 10$ et $\alpha 11$ (figure 8). L'interaction se fait principalement par trois liaisons hydrogènes (H) et une électrostatique. Ces interactions sont responsables de la formation de trois poches au sein de TEM-1 qui entourent le nanobody. On en note une première autour de la Tyr52 située sur le CDR2 du nanobody. Une seconde se forme autour du de la Tyr56 du CDR2, et la troisième entoure la Trp100 du CDR3 (figure 8). Ces trois résidus sont impliqués dans l'interaction entre les deux protéines (figure 8). En outre, le CDR3 du nanobody, qui est plutôt caractérisé par la présence de résidus polaires outre le Trp100, se retrouve en contact avec l'extrémité N-terminale de la boucle H9 (ci-après dénommée boucle Val) suite à l'établissement de liaisons entre le CDR3 avec des résidus qui entourent et composent la boucle Val (figure 9). Cette boucle Val est située entre l'hélice $\alpha 10$ (N-terminal) et le feuillet $\beta 3$ (C-terminal) et présente la séquence Glu212 – Ala213 – Asp214 – Lys215 – Val216 – Ala217 – Gly218.

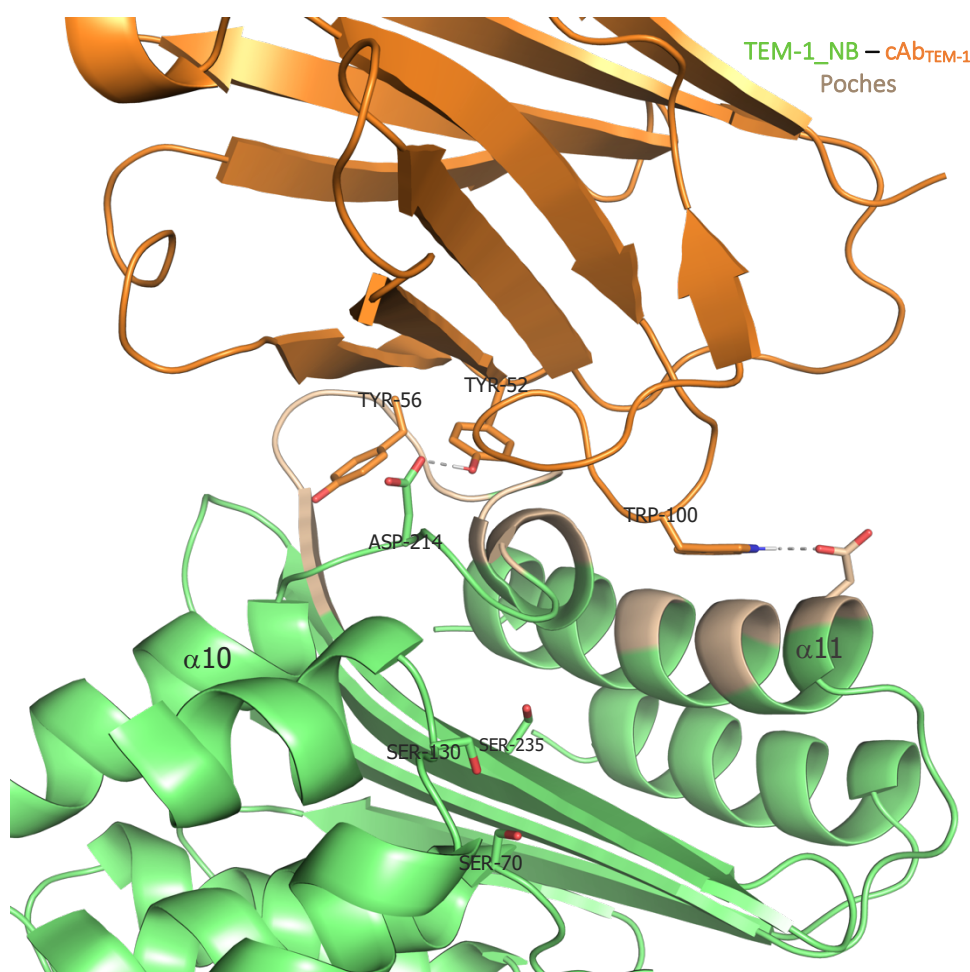
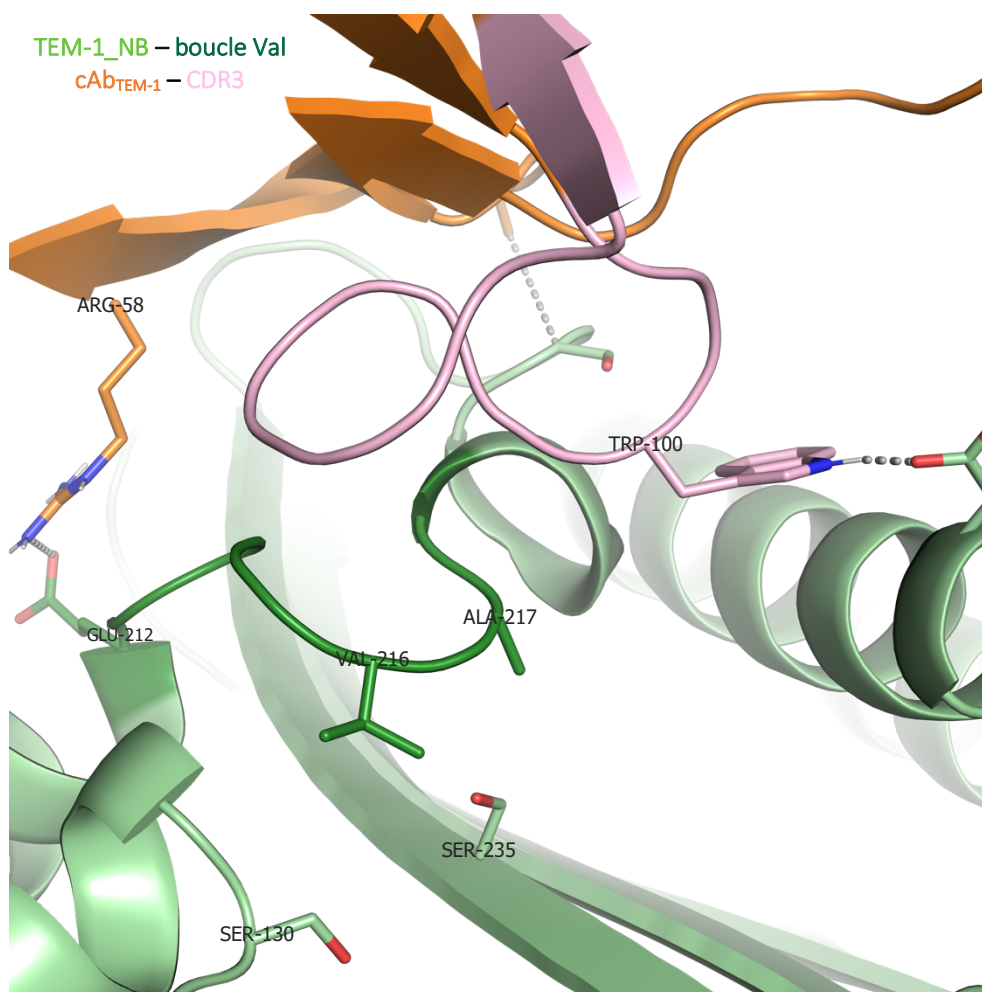


Figure 8. Vue générale de l'interaction entre l'enzyme TEM-1 (vert) et le nanobody cAb_{TEM-1} (orange). Les résidus Ser70, Ser130 et Ser235 ont été représentés en stick. Le nanobody se place entre les hélices $\alpha 10$ et $\alpha 11$. Trois poches (beige) se forment autour des résidus Tyr52 (CDR2), Tyr56 (CDR2) et Trp100 (CDR3).

Interface d'interaction



Nanobody cAb_{TEM-1}

Boucle Val de TEM-1

```

1      10      20      30      40
QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYDYSTNCMAWFRQA
←----- FR1 ----- CDR1 ----->
50      60      70      80
PGKEREWVATIYTAGYTRYADSVKGRFTISQESAKNTVYL
FR2 ----- CDR2 ----- FR3 ----->
90      100     110     119
QMNILKPEDTAMYYCAEGRWDCSSAPNHWGQGTQVTSS
----- CDR3 ----- FR4 ----->
  
```

```

212      220      230
EADKVAGPLLRSA LPAGWFIAD
  
```

Résidus polaires – Résidus hydrophobes

Figure 9. Dessus : interface d'interaction entre l'enzyme TEM-1 (vert clair) et le nanobody cAb_{TEM-1} (orange). Le CDR3 (rose) se retrouve à proximité de la boucle Val (Glu212-Gly218 ; vert foncé).

Dessous : séquences en AA du nanobody cAb_{TEM-1} et de la boucle Val. Les résidus polaires sont représentés en bleu clair et les résidus hydrophobes, en bleu foncé.

Chez l'enzyme seule, dont le modèle cristallographique a été obtenu à très haute résolution (PDB : 1M40), la boucle Val présente une double conformation (figure 10), ce qui témoigne d'une certaine dynamique de sa part. Cette dynamique a également été reportée par Savard *et al.* lors d'études de relaxation par RMN.⁽⁴²⁾ Cependant, seule une conformation est observée au sein du modèle cristallographique de TEM-1_NB, ce qui peut s'expliquer par l'établissement de liaisons entre le nanobody et des résidus situés de part et d'autre et au sein de la boucle Val. Autrement dit, ces interactions pourraient entraîner une rigidification de la structure de TEM-1, notamment au niveau de la boucle Val, et cette rigidification pourrait éventuellement mener à l'inhibition observée. En outre, chez le complexe, cette boucle rentre davantage au niveau du site actif (figure 11). Ceci peut s'expliquer par la proximité de la boucle CDR3 à tendance plutôt polaire (à l'exception du Trp100), alors que la boucle Val est plutôt hydrophobe. Le renforcement de la boucle Val, notamment de la Val216 et de l'Ala217, au sein du site actif résulterait donc de phénomènes de répulsion entre les résidus polaires du CDR3 et les résidus hydrophobes de la boucle Val. Pour terminer, la chaîne latérale de la Val216 ainsi que celle de l'Ala217 se retournent en présence du nanobody pour faire face au site actif (figure 11). Ce repositionnement de la Val216 pourrait fortement compliquer l'entrée de l'antibiotique par des effets d'encombrement stérique et hydrophobe et, éventuellement, expliquer l'inhibition compétitive observée chez TEM-1.

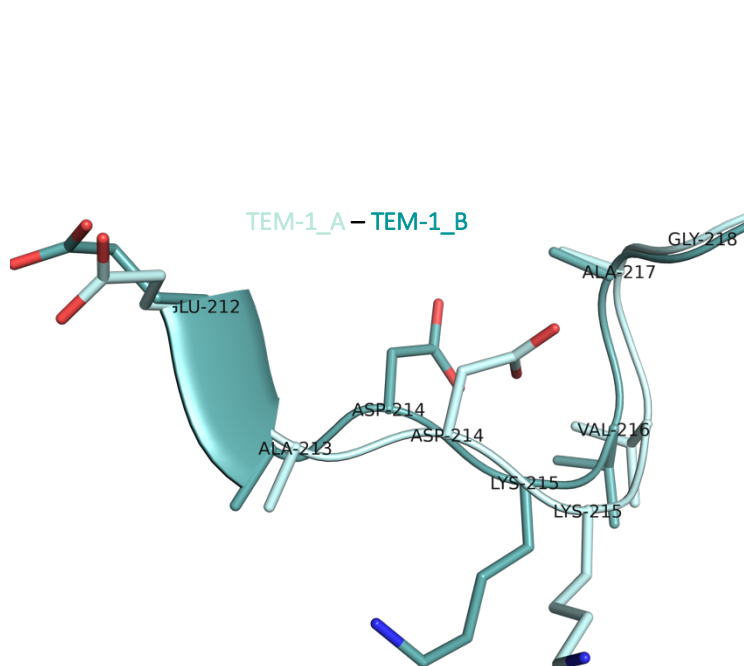


Figure 10. Représentation des deux conformations de la boucle Val du modèle cristallographique de TEM-1 1M40 avec, en cyan clair, la conformation A (TEM-1_A) de TEM-1 et, en cyan foncé, la conformation B (TEM-1_B)

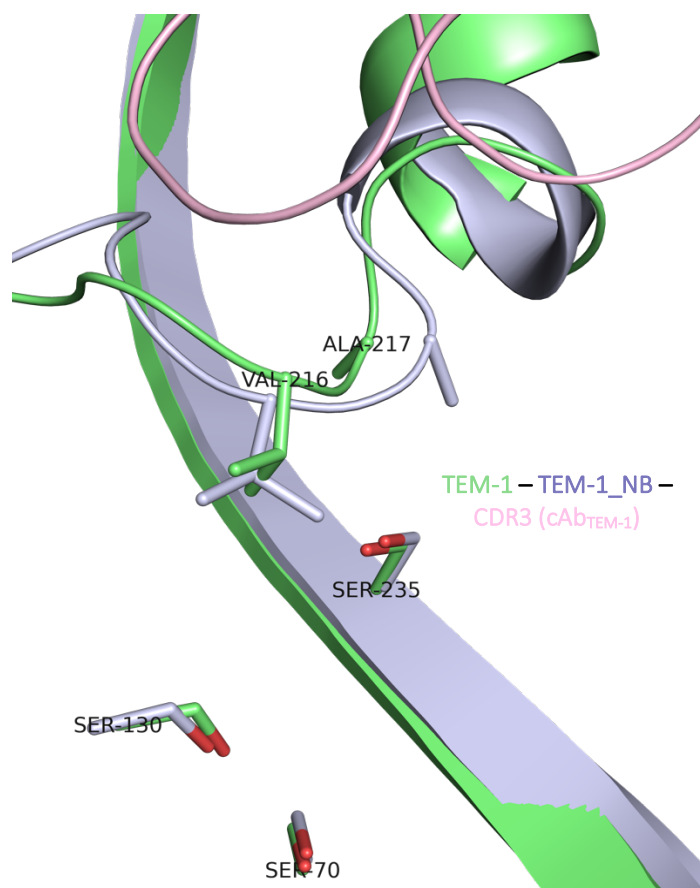


Figure 11. Comparaison des structures entre TEM-1 seul (vert) et TEM-1_NB (TEM-1 en bleu, CDR3 en rose). Les résidus Ser70, Ser130, Ser235 (site actif), Val216 et Ala217 (boucle Val) ont été représentés en stick.

Second fait (encore plus étonnant) : la superposition entre les structures de TEM-1_NB et de TEM-121_NB montre qu'elles sont quasiment identiques (figure 12). Les résidus du site actif se superposent relativement bien entre les deux. Il en est de même pour la Val216 et l'Ala217, qui rentrent tous deux dans le site actif. Les liaisons établies entre TEM-1 et le nanobody ainsi que les différentes poches observées chez TEM-1_NB sont toutes retrouvées chez TEM-121_NB et sont identiques à celles du premier complexe.

La question quant à la différence entre les profils d'inhibition entre les enzymes demeure donc. En effet, bien que TEM-121 présente un double caractère ESBL et IRT, seules six mutations la séparent de TEM-1 (l'alignement de leur séquence (figure 13) est située en annexe). La première, Gln39Lys, se trouve en tout début de séquence. Les cinq autres sont les suivantes : Glu104Lys, Arg164Ser, Arg237Thr, Glu240Lys et Arg244Ser.⁽¹⁹⁾ Les quatre premières sont à l'origine du profil ESBL, alors que la cinquième, bien qu'elle conduise à une diminution de la résistance envers les pénicillines, est responsable de son profil IRT.⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾

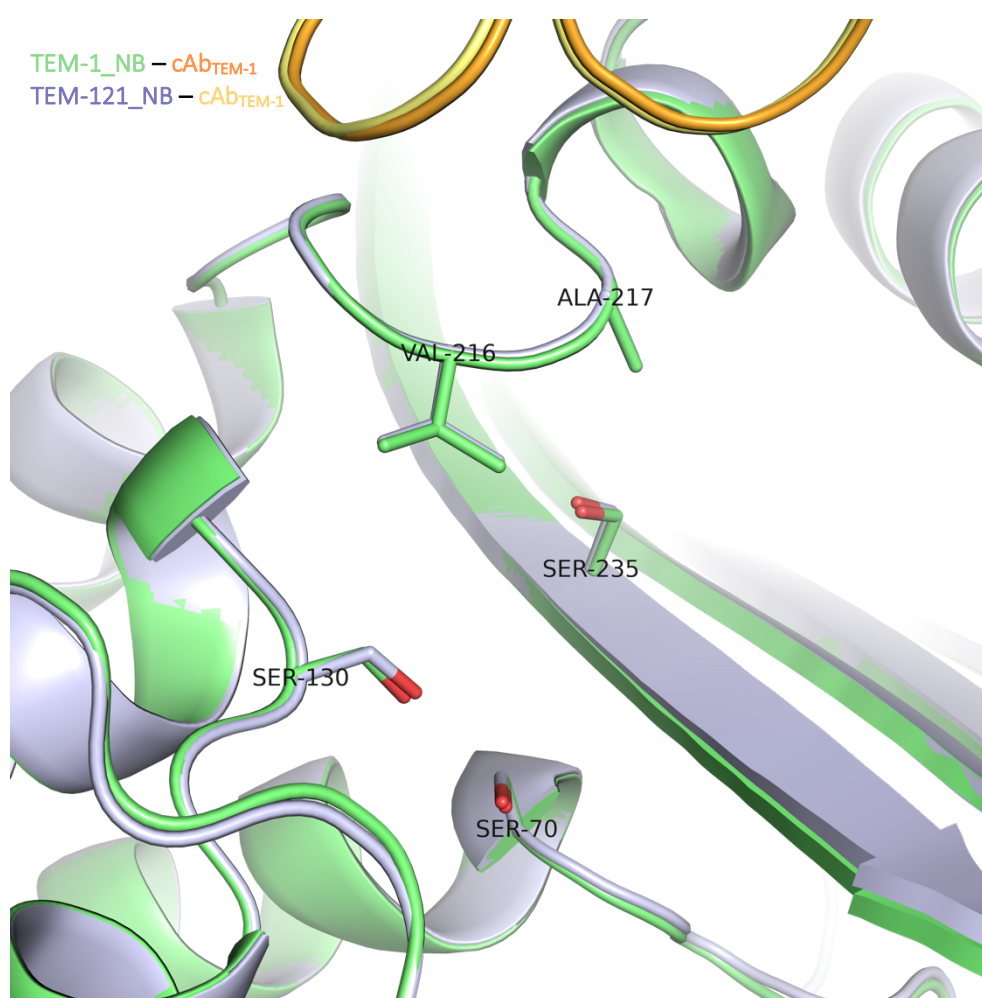


Figure 12. Comparaison des structures entre les complexes TEM-1_NB (TEM-1 en vert et cAb_{TEM-1} en orange) et TEM-121_NB (TEM-121 en bleu et cAb_{TEM-1} en jaune). Les résidus Ser70, Ser130, Ser235 (site actif) et Val216 et Ala217 (boucle Val) ont été représentés en stick.

2.4. Objectifs ou comment compléter l'ébauche de ce schéma sur l'interaction entre les enzymes

TEM-1 et TEM-121 et le nanobody cAb_{TEM-1}

2.4.1. En bref, où en est-on ?

Trois phénomènes différents ont été mis en évidence par les études décrites dans les pages précédentes. Le premier est plutôt d'ordre structural. En effet, la cristallographie a mis en évidence le repositionnement de la Val216 au sein du site actif des enzymes. Ce faisant, elle pourrait être responsable d'un environnement défavorable pour l'entrée de l'antibiotique par encombrement stérique et/ou par effet hydrophobe. Une étude par docking moléculaire, en lien avec des mesures cinétiques, a été effectuée afin d'investiguer cette piste plus en détails.

Cette étude par docking permet également d'approfondir la seconde interrogation, à savoir l'impact des mutations sur les profils d'inhibition. La mutation Arg244Ser semble particulièrement intéressante. En effet, la fonction guanidinium de l'Arg244 de TEM-1 pointe dans la cavité de l'enzyme et l'encombre par sa taille et par sa charge positive. Elle pourrait donc être responsable d'un environnement défavorable qui viendrait se superposer à celui de la Val216. La cavité de TEM-121 est, quant à elle, débarrassée de ces contraintes. Le substrat aurait ainsi peut-être plus de facilités à s'écarter de la Val216 et à se positionner correctement en vue de son acylation.

Le troisième phénomène touche plutôt la dynamique de la protéine, la cristallographie aux RX ayant montrée une tendance à la stabilité de TEM-1 suite à son interaction avec cAb_{TEM-1}, notamment au niveau de la boucle Val. Une étude par dichroïsme circulaire (DC) a également démontré cet effet stabilisateur du nanobody sur l'enzyme puisque la valeur de T_m^{app} s'accroît de 8°C chez le complexe par rapport à l'enzyme seule ($T_m^{app} = 52.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ chez TEM-1 et $T_m^{app} = 60.2 \pm 0.4^\circ\text{C}$ chez TEM-1_NB). Une étude par dynamique moléculaire (MD), complétée par des mesures de relaxation par RMN, permettront de vérifier cette hypothèse et de déterminer son impact sur l'inhibition observée.

2.4.2. Approche structurale : modélisation par docking

Le docking moléculaire est une méthode informatique qui se base sur des structures *in silico*, RMN ou cristallographiques afin de prédire l'orientation d'une molécule par rapport à une autre à un niveau atomique et moléculaire, en vue de l'obtention du complexe le plus stable entre les deux.⁽³²⁾⁽⁴⁴⁾ Pour utiliser cette technique, il est donc nécessaire que la structure des composés d'intérêt soit connue. Ceci ne pose néanmoins pas de problème dans le cadre de ce projet étant donné que les modèles cristallographiques de TEM-1, TEM-1_NB et de TEM-121_NB ont déjà été obtenus.

Parmi les premières études employant le docking se trouve celle de Kuntz *et al.* (1982) qui a décrit une méthode informatique permettant d'explorer des alignements géométriquement plausibles entre un ligand et un récepteur et l'a notamment appliquée à l'interaction hème – hémoglobine.⁽⁴⁵⁾ Depuis, le

docking n'a cessé de se développer et, avec les algorithmes actuels, il permet notamment de mesurer l'affinité d'une interaction potentielle.⁽⁴⁴⁾

Actuellement, le docking est très fortement utilisé pour l'identification des cibles de nouveaux médicaments, notamment pour diminuer la lourdeur des essais expérimentaux, ainsi que pour prédire les effets secondaires d'un médicament potentiel suite à son interaction avec des molécules autres que ses cibles.⁽⁴⁴⁾ C'est ainsi que Ji *et al.* ont pu identifier les effets secondaires potentiels d'une série de composés thérapeutiques anti-HIV, et plus de 85% de leurs prédictions ont pu être reliées avec des preuves cliniques rapportées dans la littérature !⁽⁴⁶⁾ Néanmoins, puisqu'il permet d'identifier de nouvelles cibles de ligands connus sur base d'une complémentarité structurale, le docking est aujourd'hui particulièrement employé pour des études de repositionnement des médicaments.⁽⁴⁵⁾ Il s'agit d'une approche qui consiste à tester un médicament déjà approuvé ou en cours d'étude pour de nouvelles utilisations thérapeutiques, c'est-à-dire pour une maladie autre que celle pour laquelle il avait été initialement développé.⁽⁴⁵⁾ C'est ainsi que, par l'intermédiaire du docking, l'entacapone, déjà utilisé pour traiter la maladie de Parkinson, s'est avéré être un candidat prometteur pour lutter contre la tuberculose.⁽⁴⁷⁾

Le docking a connu une certaine notoriété à travers la recherche de nouvelles thérapies anticancéreuses. Celles-ci doivent être caractérisées par une bonne efficacité à faible concentration et par un nombre minime de réactions secondaires indésirables.⁽⁴⁸⁾ Pour s'aider dans la recherche (lourde d'un point de vue expérimental) de nouveaux inhibiteurs de protéines connues pour leur rôle dans le cancer, comme le protéasome, les chercheurs se sont tournés vers des méthodes *in silico*, incluant le docking.⁽⁴⁸⁾ Ainsi, non seulement ce dernier a permis d'identifier un nouvel inhibiteur potentiel (pour lequel des études cliniques ont été initiées) du protéasome, mais il a également servi à la compréhension des mécanismes de liaison entre ses inhibiteurs et celui-ci.⁽⁴⁸⁾ Les kinases constituent une seconde cible d'intérêt des thérapies anticancéreuses.⁽⁴⁸⁾ A titre d'exemple, en combinant le docking avec d'autres techniques, dont des expérimentales, l'équipe de Ren *et al.* a rapporté la découverte de 47 inhibiteurs potentiels de la kinase proto-oncogène Pim-1 par le screening de 20 millions de molécules. Parmi ceux-ci, 15 présentaient une inhibition de l'ordre du nanomolaire envers Pim-1.⁽⁴⁹⁾ Il ne s'agit ici que d'un exemple parmi des centaines, mais qui montre tout le potentiel du docking s'il est correctement utilisé – c'est-à-dire, en combinaison avec des résultats expérimentaux.

Il est finalement intéressant de noter que les études par docking, notamment pour le design de nouveaux médicaments, sont généralement combinées à des études de dynamique par MD. Une telle association permet en effet de passer d'une conception statique de l'interaction entre deux composés à une vue dynamique de celle-ci.⁽³²⁾

2.4.3. Approche dynamique : modélisation dynamique et relaxation par RMN

2.4.3.1. *Partie informatique : la modélisation dynamique (MD)*

La dynamique est définie comme l'ensemble des mouvements internes de la structure protéique, reflétant l'existence de diverses conformations, et ce, à des échelles de temps différentes, qui peuvent aller de la psec à la sec, voire en heures/jours.⁽³⁷⁾⁽⁴¹⁾ Toutes les protéines arborent à température ambiante une certaine flexibilité, plus ou moins marquée selon les cas et dont la caractérisation s'avère essentielle pour la prédiction du comportement de ces protéines, ainsi que pour effectuer l'inventaire de leurs fonctions. En effet, du fait de cette dynamique, les protéines peuvent arborer un nombre important de conformations au cours du temps, et chacune d'entre elles présente des fonctions qui lui sont propres. À travers leur caractérisation – et donc, indirectement, celle de la dynamique – il est possible de déterminer les diverses fonctions qu'elles exercent individuellement.⁽³¹⁾ Ceci n'est pas négligeable au vu du nombre de phénomènes qui peuvent être impactés par la dynamique : thermostabilité, repliement et agrégation, efficacité de petits inhibiteurs, liaison d'un substrat s'il s'agit d'enzymes, ou encore leur catalyse et leur allostérie. Autrement dit, se contenter de décrire une protéine comme « étant dynamique » est totalement insuffisant.⁽³⁷⁾

Malheureusement, les outils traditionnellement utilisés en biologie structurale, tels la cristallographie aux RX ou la cryo-microscopie électronique figent la molécule étudiée et ne fournissent ainsi qu'une représentation fixe de celle-ci.⁽³¹⁾⁽³³⁾ Ils peuvent tout de même donner une idée de sa dynamique notamment par la fixation de différentes conformations de cette molécule, mais ils ne permettent pas de la décrire au cours du temps. Ceci explique pourquoi nous nous sommes tournés vers de la modélisation dynamique (MD) pour caractériser la stabilisation de la boucle Val par le nanobody cAb_{TEM-1}. La MD est en effet une technique calculatoire qui permet de comprendre le comportement dynamique d'un système et de son environnement en fonction du temps en étudiant le mouvement de molécules biologiques à un niveau atomique.⁽³²⁾

La dynamique de TEM-1 a déjà été caractérisée par MD à de nombreuses reprises et généralement avec succès. En 2005, le groupe de Roccatano *et al.* a montré, par l'intermédiaire de simulations de MD de 5 nsec, qu'en solution, TEM-1 se relaxe d'abord avant d'opter pour une conformation d'équilibre caractérisée par une mobilité accrue.⁽²²⁾ L'impact de la liaison du substrat sur la dynamique de TEM-1 a également été étudié par MD peu après. Il s'est avéré que la fixation du substrat (ici, la benzyl-pénicilline) restructure et rigidifie globalement TEM-1, à l'exception de la région C-terminale de la boucle Ω qui présente une mobilité accrue chez la forme complexée.⁽³³⁾

En plus de fournir une description précise de la dynamique protéique à un niveau atomique, les simulations par MD bénéficient d'une excellente résolution spatio-temporelle, faisant d'elles un outil judicieux pour identifier des états excités et des changements conformationnels. En outre, de récentes avancées au niveau de leurs algorithmes permettent de capturer un plus large panel de processus, se

déroulant à diverses échelles de temps physiologiquement importantes pour un grand nombre de protéines.⁽³¹⁾

Il est à noter que, dans le cadre de cette étude, seuls les mouvements de l'ordre de la sub- μ sec seront considérés. En effet, elle ne s'intéresse qu'à la dynamique de la boucle Val et le mouvement des boucles ainsi que les rotations des chaînes latérales se déroulent à cette échelle de temps. Autrement dit, il ne sera pas possible d'observer les mouvements au niveau des domaines structurés, comme les hélices α et les feuillets β , qui s'effectuent à des échelles de temps plus élevées.

2.4.3.2. Partie expérimentale : la relaxation par RMN

En dépit de ces atouts, la MD demeure une méthode informatique. L'idéal serait donc de combiner les données *in silico* obtenues par celle-ci avec des résultats expérimentaux. Il existe plusieurs méthodes biophysiques et/ou spectroscopiques qui permettent de visualiser la dynamique protéique, comme la fluorescence, la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore la résonance paramagnétique électronique (EPR) et les méthodes de diffractions des RX ou des neutrons.⁽³⁴⁾

La fluorescence est fréquemment utilisée pour caractériser la dynamique protéique par l'intermédiaire de diverses techniques.⁽³⁴⁾ À titre d'exemple, le « *single-molecule* » FRET (« *Förster Resonance Energy Transfer* ») mesure des variations de distance à l'intérieur d'un même peptide en marquant un fragment de celui-ci avec une sonde donneur et un second fragment, avec une sonde accepteur. C'est notamment en utilisant cette technique en association avec de la MD que le groupe de Borgia *et al.* a mis en évidence que la formation d'un complexe entre deux protéines sans structure et avec caractère hautement dynamique ne changeait pas les caractéristiques de ces dernières.⁽³⁵⁾ L'analyse du temps de vie de fluorescence, temps nécessaire pour qu'une molécule passe de son état excité à son état relaxé, est une seconde approche permettant d'analyser la mobilité au sein d'une même molécule, notamment par la mise en évidence de changements conformationnels. Elle a notamment été utilisée pour étudier des polypeptides contenant des résidus tryptophane.⁽³⁶⁾

Néanmoins, la combinaison entre MD et RMN est extrêmement utilisée pour caractériser des changements dans la dynamique rapide des protéines, notamment à la suite d'une interaction de type protéine – ligand. Par RMN, on entend relaxation du spin nucléaire (NSR) : il s'agit d'une méthode permettant de construire un modèle de la dynamique d'une protéine à l'échelle de temps allant de la psec à la nsec.⁽³⁷⁾ Les mouvements se déroulant à cette échelle de temps sont divers : vibrations des liaisons, interconversions des chaînes latérales des rotamères, mouvements des boucles ou encore rotations des angles de torsion du backbone.⁽³⁷⁾ De plus, la caractérisation de la dynamique protéique par RMN est utilisée depuis longtemps. En effet, la toute première étude de ce genre date de 1974 et a mis en évidence la présence de mouvements rotationnels internes au niveau des résidus aromatiques sur le BPTI (« *Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor* »).⁽⁴³⁾ Depuis, ces études n'ont cessé de se développer, s'accompagnant d'une amélioration de la

technique et conduisant à une importante quantité de données dynamiques obtenues par NSR, souvent combinée avec la MD. À titre d'exemple, une telle combinaison a permis de rendre compte de l'amplitude des mouvements se déroulant au sein de l'*arabinose binding-protein* suite à son interaction avec le D-galactose⁽³⁸⁾ ou encore d'étudier plus en profondeur la dynamique du lysozyme, avec ou sans inhibiteurs.⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾ Les travaux de Fiset et *al.* méritent également d'être cités, rien que pour la contribution qu'ils pourraient apporter à cette étude : ils caractérisent par MD et par NSR la dynamique du backbone de TEM-1 en solution, ainsi que l'effet du substrat sur celle-ci.⁽³³⁾⁽⁴¹⁾

En outre, plusieurs éléments justifient de privilégier l'approche par RMN. Il y a tout d'abord le fait que ce type de spectroscopie fournit des informations détaillées sur la dynamique interne des protéines à différents niveaux de temps : de la psec à la nsec ; de la μ sec à la msec ; et de la sec à l'heure.⁽⁴²⁾ À noter que seule la première échelle de temps est étudiée par NSR. En outre, la RMN permet d'accéder à des sondes spécifiques non-perturbatrices, qui correspondent des atomes observables (H, C, N), ce qui permet de caractériser la dynamique de l'endroit où se trouve lesdites sondes.⁽³⁷⁾ La quantité de sondes disponibles est également bien plus importante pour la RMN que pour la spectroscopie de fluorescence. La première technique peut, en effet, détecter simultanément une dizaine, voire une centaine, de sondes (qui correspondent aux NHs peptidiques) de manière simultanée alors que la seconde est limitée de une à trois sondes.⁽³⁷⁾ Des changements minimes au sein de la structure, de la dynamique et/ou de la fonction de la molécule étudiée peuvent également être détectés. Cette technique ne modifie pas non plus la nature de la protéine étudiée.⁽³⁷⁾ Ces atouts prennent le pas sur ses principales limitations, qui sont la faible sensibilité ainsi que la résolution fortement dépendante de la taille des protéines.⁽³⁷⁾

En outre, la combinaison entre RMN et MD permet de pallier le fait que des données structurales précises des mouvements internes ne peuvent pas toujours être obtenues par RMN, limitant l'aperçu du lien structure – dynamique – fonction. De son côté, la MD permet de déterminer les positions tridimensionnelles de chaque atome d'une protéine en utilisant des forces d'interaction déterminées empiriquement. Elle fournit ainsi des descriptions atomiques très précises – bien que pas forcément exactes (d'où l'intérêt de la RMN) – de la dynamique.⁽³⁷⁾⁽⁴¹⁾

Partie I

Un peu de biologie structurale :
modélisation par docking

1. Essais préliminaires de cinétique

Toutes ces études cinétiques ont été réalisées par Frédéric Cawez antérieurement à ce mémoire. Leurs résultats sont brièvement décrits afin de mieux comprendre le cadre dans lequel la modélisation par docking a été envisagée et quels étaient ses objectifs.

1.1. Étude de la spécificité et de l'affinité du nanobody cAb_{TEM-1}

Pour commencer, des tests d'interaction entre le nanobody cAb_{TEM-1} et des représentants des différentes classes de β -lactamases (TEM-1, TEM-121 et CTX-M-1 pour la classe A ; VIM-4 pour la classe B ; CMY-2 pour la classe C ; OXA-48 pour la classe D) ont permis de montrer que le nanobody ne reconnaît que les membres de la famille TEM, que ce soit des TEM classiques, à caractère ESBL ou IRT, et semble ainsi spécifique à cette famille. Ensuite, les constantes cinétiques d'association k_{on} et de dissociation k_{off} ainsi que la constante de dissociation K_D de l'interaction entre le nanobody cAb_{TEM-1} et les enzymes TEM-1 et TEM-121 ont été mesurées par interférométrie bio-couche (BLI). Les résultats (tableau 2) témoignent d'une forte affinité du nanobody pour les deux enzymes, de l'ordre de **10 nM**, ainsi que d'une association rapide et une dissociation lente du complexe formé, ce qui est couramment observé pour les nanobodies.

	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (M)$
TEM-1	$1.7 \cdot 10^5 \pm 1.4 \cdot 10^4$	$2.2 \cdot 10^{-3} \pm 2.1 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-8} \pm 2.1 \cdot 10^{-9}$
TEM-121	$6.1 \cdot 10^5 \pm 2.2 \cdot 10^5$	$3.2 \cdot 10^{-3} \pm 9.8 \cdot 10^{-5}$	$5.6 \cdot 10^{-9} \pm 1.5 \cdot 10^{-9}$

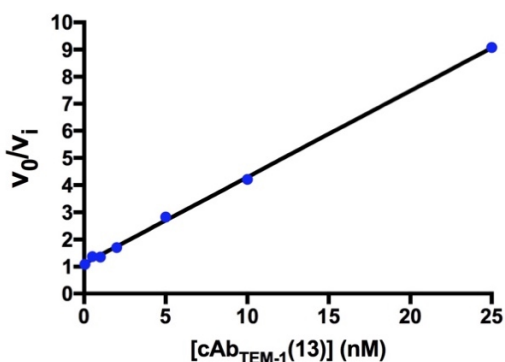
Tableau 2. Valeurs de k_{on} , k_{off} et K_D mesurées par BLI.

1.2. Détermination des profils d'inhibition

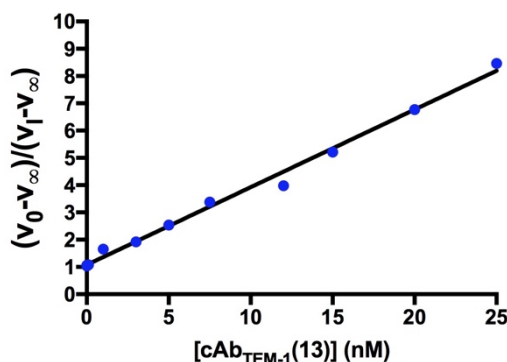
1.2.1. Détermination du profil d'inhibition de cAb_{TEM-1} pour TEM-1

Afin de déterminer le profil d'inhibition de TEM-1 en présence de cAb_{TEM-1}, un graphique de $\frac{v_0}{v_i}$ en fonction de la concentration en inhibiteur a été réalisé avec cette enzyme pour la nitrocéfine (graphique 1) et pour la céfalotine (graphique 2). Dans les deux cas, une droite qui intercepte l'axe des Y à 1 est obtenue, ce qui est caractéristique d'une inhibition compétitive (équation 1). Une linéarisation de Hanes a été ensuite réalisée avec la céfalotine (graphique 3) afin de valider ces résultats. Toutes les droites sont parallèles entre elles, ce qui, en considérant l'équation de Hanes (équation 2), signifie que la valeur de K_m s'accroît avec la concentration en inhibiteur (cAb_{TEM-1}), alors que la valeur de k_{cat} reste constante. Ces résultats terminent de confirmer le profil d'inhibition compétitif.

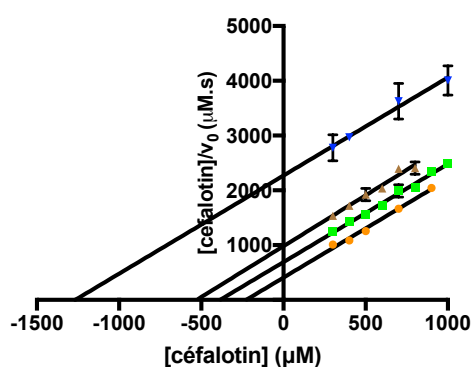
Le nanobody cAb_{TEM-1} est donc un inhibiteur compétitif de TEM-1. Selon ce modèle (figure 14), l'inhibiteur se place au sein du site actif, ce qui entraîne une compétition directe entre celui-ci et le substrat. Néanmoins, les résultats cristallographiques ont montré que, dans le cas de l'inhibition de TEM-1 par cAb_{TEM-1}, ce dernier ne semble pas effectuer d'interactions au niveau du site actif de l'enzyme.



Graphique 1. Évolution de v_0/v_i de TEM-1 en fonction de la concentration en inhibiteur (nM) pour la nitrocéfine.



Graphique 2. Évolution de v_0/v_i de TEM-1 en fonction de la concentration en inhibiteur (nM) pour la céfalotine.



— (Nb 13) = 0 nM — (Nb 13) = 5 nM
— (Nb 13) = 10 nM — (Nb 13) = 100 nM

Graphique 3. Linéarisation de Hanes de l'enzyme TEM-1 en présence du nanobody cAbTEM-1 pour la céfalotine.

$$Pente = \frac{K_m}{K_m + S} * \frac{1}{K_i}$$

Équation 1. Équation de la pente de la droite d'un graphique de v_0/v_i en fonction de la concentration en inhibiteur pour une inhibition compétitive.

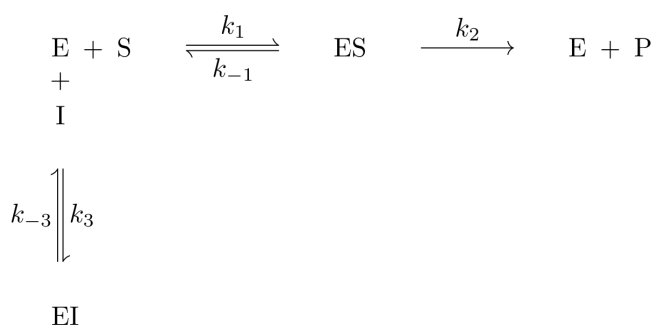


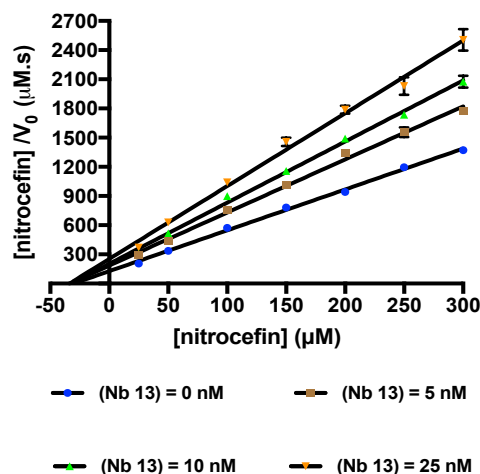
Figure 14. Équation chimique caractéristique d'une inhibition compétitive.

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

Équation 2. Équation de la linéarisation de Hanes dérivée de l'équation de Michaelis-Menten.

1.2.2. Détermination du profil d'inhibition de cAbTEM-1 pour TEM-121

En ce qui concerne TEM-121, le graphique de $\frac{v_0}{v_i}$ en fonction de la concentration en inhibiteur ne donnait pas une droite pour la nitrocéfine, ce qui ne permet pas de se fixer sur le profil d'inhibition, et l'inhibition avec la céfalotine est trop faible pour que ce substrat soit utilisé pour la détermination du profil d'inhibition. Une linéarisation de Hanes donc a été réalisée uniquement pour la nitrocéfine (graphique 4). Les droites convergent toutes vers un même point sur l'axe des X, ce qui, en considérant l'équation de Hanes (équation 1) signifie que la concentration en inhibiteur (cAbTEM-1) n'influence nullement la valeur de K_m mais que, lorsqu'elle s'accroît, la valeur de k_{cat} diminue. Ces observations sont typiques d'une inhibition de type non-compétitif, où l'enzyme peut emprunter deux cinétiques différentes, l'une comprenant un intermédiaire ES et la seconde, un intermédiaire ESI (figure 15).



Graphique 4. Linéarisation de Hanes de l'enzyme TEM-121 en présence du nanobody cAb_{TEM-1} pour la nitrocéfine.

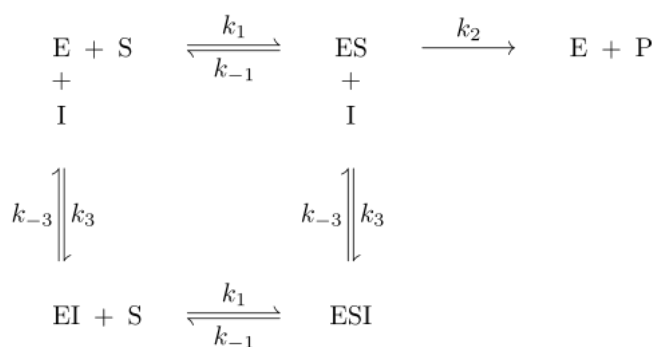


Figure 15. Équation chimique caractéristique d'une inhibition non compétitive.

1.3. Étude de l'inhibition de TEM-1 par cAb_{TEM-1} sur un large panel de substrats

L'activité résiduelle de l'enzyme TEM-1 en présence du nanobody cAb_{TEM-1} a été déterminée pour différents substrats : l'ampicilline, la céfalotine, la céfotaxime, la céphaloridine et la nitrocéfine. Les résultats (tableau 3) indiquent que le pourcentage d'inhibition diffère selon le substrat et semble dépendre de la taille de ce dernier, notamment de celle de la chaîne latérale en C2/C3 (respectivement pénicilline/céphalosporine). A titre d'exemple, le pourcentage d'inhibition va en augmentant si l'on suit l'ordre ampicilline → céfalotine → nitrocéfine, ordre pour lequel la taille du substrat augmente et où des charges positives apparaissent (nitrocéfine). Outre cette influence de la taille, des études parallèles ont démontré que les charges portées par la chaîne latérale en C2/C3 de certains antibiotiques, comme la nitrocéfine et la céphaloridine, semblent accentuer le phénomène d'inhibition.

	[substrat] (µM)	Activité résiduelle (%)
Ampicilline	90	70
Céfalotine	210	33
Céfotaxime	286	11
Céphaloridine	167	2
Nitrocéfine	114	4

Tableau 3. Récapitulatif des pourcentages d'activité résiduelle obtenus lors de l'étude d'inhibition de TEM-1 par cAb_{TEM-1} sur l'ampicilline, la céfalotine, la céfotaxime, la céphaloridine et la nitrocéfine. L'expérience a été réalisée avec une concentration en substrat équivalent au K_m de l'enzyme pour le substrat.

2. Objectifs de la modélisation par docking

Le docking est une méthode prédictive qui permet de visualiser l'orientation d'une molécule par rapport à une autre. Dans ce cas-ci, il s'agit de représenter la conformation de diverses β -lactamines lors de leur entrée dans le site actif de TEM-1 seule ou complexée et de TEM-121 complexée.

Les résultats de cinétique témoignent d'une inhibition toujours plus importante avec la taille de l'antibiotique et en présence d'une charge positive au niveau de sa chaîne latérale en C2/C3 (respectivement pénicilline/céphalosporine). Le premier objectif de cette modélisation est de déterminer, par la comparaison des conformations des substrats entre les structures de TEM-1 et de TEM-1_NB, si l'inhibition observée pour le complexe pourrait être une conséquence d'un encombrement stérique engendré par la Val216. En effet, les modèles cristallographiques ont montré que les fonctions méthyles Cy de ce résidu pénètrent dans le site actif de l'enzyme en présence du nanobody. Elles pourraient ainsi être à l'origine d'un encombrement à la fois stérique et hydrophobe pour l'antibiotique, notamment pour sa fonction carboxylique en C3/C4 et pour sa chaîne latérale en C2/C3.

Le second objectif est de déterminer l'impact éventuel des mutations sur la différence des profils d'inhibition en comparant les conformations des substrats entre la structure de TEM-1_NB avec celle de TEM-121_NB. La mutation Arg244Ser (figure 16) est particulièrement intéressante. Chez TEM-1, la chaîne latérale de l'Arg244 réduit l'espace disponible dans le site actif et pourrait ajouter des contraintes de charge à l'encombrement stérique hypothétique généré par la Val216, ce qui compliquerait davantage l'entrée du substrat. Ces contraintes n'existeraient par contre pas chez TEM-121_NB. En effet, suite à cette mutation Arg244Ser, le site actif est plus dégagé en termes de place et de charge, ce qui pourrait éventuellement se traduire par une inhibition plus faible et une entrée plus aisée de l'antibiotique. De plus, étant donné que le nanobody cAb_{TEM-1} est un inhibiteur non compétitif de TEM-121 et que l'entrée du substrat n'est pas impactée pour ce profil, il est possible que la modélisation par docking de TEM-121_NB ne donne aucun résultat concluant.

Le docking présente quelques limitations dont il faut tenir compte pour la compréhension des résultats. Pour commencer, il ne fournit qu'une vision générale et hypothétique de l'entrée de l'antibiotique au sein du site actif. Ainsi, des méthodes expérimentales devront venir corroborer les modèles obtenus. Ensuite, comme indiqué juste avant, le docking permet de ne visualiser que la conformation de l'antibiotique lors de son entrée dans le site actif, sans tenir compte des modifications structurales apportées lors de l'acylation et de la désacylation. De ce fait, comme déjà indiqué, en ce qui concerne l'étude structurale de TEM-121_NB, enzyme pour laquelle le nanobody est un inhibiteur non compétitif, aucun changement de configuration n'est vraiment attendu par rapport à ce qui est observé chez l'enzyme sauvage étant donné que seules les étapes ultérieures à l'entrée du substrat sont impactées. Enfin, ce travail se base sur des modèles cristallographiques qui représentent des structures figées, ce qui veut dire que les

notions de dynamique discutées au préalable ne sont pas prises en compte. Néanmoins, cette étude par docking, aussi hypothétique soit-elle, devrait nous en apprendre davantage sur les phénomènes d'inhibition observés dans le cadre des expériences de cinétique, ainsi qu'éventuellement sur la différence entre les profils d'inhibition.

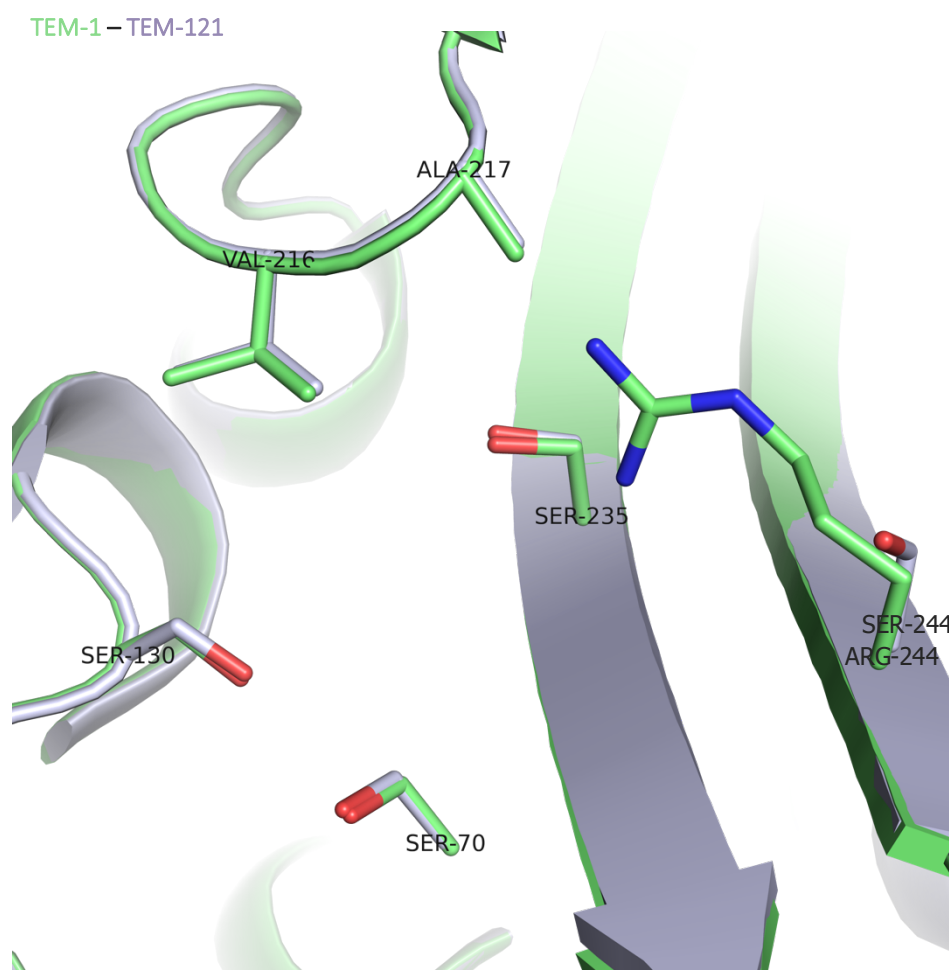


Figure 16. Comparaison du site actif de TEM-1 (vert), encombré par la taille et la charge de l'Arg244, et de celui de TEM-121 (bleu), qui présente la mutation Arg244Ser.

3. Matériel et méthodes

Les modélisations de docking ont été réalisées avec le programme Autodock Vina en utilisant Yasara comme interface. Les données générées ont été analysées par les logiciels Yasara et PyMol. Pour chaque antibiotique, 25 simulations sont effectuées dans un cube de 25 Å de côté et à 298 K (25°C). Aucun champ de force n'a été appliqué car Autodock Vina génère lui-même ses propres champs.

Afin d'atteindre les objectifs fixés, cinq substrats variant au niveau de la taille et de la charge portée par la chaîne latérale en C2/C3 ont été sélectionnés : l'ampicilline, la céfalotine, la céfotaxime, la céphaloridine et la nitrocéfine (tableau 5).

Sur les 25 conformations obtenues par antibiotique, seule une est conservée sur base de différents critères. Le premier (et principal) est que l'oxygène du carbonyle du noyau β -lactame doit obligatoirement être dirigé vers la fonction hydroxyle de la Ser70 de l'enzyme.⁽⁵⁰⁾ En outre, l'oxygène de la fonction amide en C6/C7 doit être dirigé vers la partie centrale de la boucle Ω (Arg164 – Asp179).⁽⁵⁰⁾ Si ces deux conditions sont d'ores et déjà respectées, cela signifie que l'antibiotique est correctement orienté dans la cavité, avec sa fonction carboxylique positionnée entre les hélices α 10 et α 11.

Ensuite, des mesures de distances ont été réalisées afin de s'assurer qu'elles étaient compatibles avec l'établissement du réseau de liaisons H nécessaire au bon déroulement du mécanisme réactionnel. Les distances mesurées entre la fonction carbonyle du noyau β -lactame et (1) la fonction hydroxyle de la Ser70 (CO-^OS70), (2) l'azote de la fonction peptidique de la Ser70 (CO-^NS70) et (3) l'azote de la fonction peptidique de l'Ala/Thr237 (CO-^NA/T237, respectivement TEM-1/TEM-121) permettent de s'assurer que cette fonction carbonyle est correctement positionnée dans le trou de l'oxyanion (tableau 4).⁽¹²⁾ Par ailleurs, différents liens polaires sont toujours observés peu importe le substrat. Il s'agit des liaisons entre : l'azote de la fonction amide en C6/C7 et la fonction carbonyle de l'Ala/Thr237 (N-^OA/T237) ; l'oxygène de la même fonction amide en C6/C7 avec l'azote de la chaîne latérale de l'Asn132 (^NCO-^{N2}N132) ; la fonction carbonyle du noyau β -lactame avec la fonction hydroxyle de la Ser130 (CO-^OS130) ; et la fonction carboxylique en C3/C4 avec la fonction hydroxyle de la Ser130 (COOH-^OS130) (tableau 4).⁽¹²⁾

Pour terminer, l'attention est portée sur le positionnement et l'orientation de la fonction carboxylique de l'antibiotique afin de quantifier sa répulsion éventuelle suite à l'intrusion de la Val216. Chez l'enzyme seule, elle doit être dirigée vers la Lys234 et la Ser235. Quatre distances sont mesurées : entre la fonction carboxylique en C3/C4 et (1) un des C γ de la Val216 (COOH-C γ V216), (2) la fonction hydroxyle de la Ser235 (COOH-^OS235), (3) la fonction amine de la chaîne latérale de la Lys234 (COOH-^{N ξ} K234), (4) une des fonctions aminées du groupement guanidinium de l'Arg244 (COOH-^{NH1}R244) (tableau 4).⁽¹²⁾ La liaison COOH-C γ V216 rapportée correspond toujours à la plus courte mesurée. Une cinquième mesure est effectuée entre le carbone partant en C2/C3 et le groupe méthyl du C γ de la Val216 (R-C γ V216) (tableau 4).

Un dernier critère vient s'ajouter lors du choix de la conformation finale de l'antibiotique pour TEM-1_NB. En effet, avant de la valider, une superposition est systématiquement effectuée avec TEM-1 de façon à vérifier que le noyau β -lactame de l'antibiotique soit positionné identiquement, ou presque, dans les deux situations. Si tel est le cas, cela signifie que les différences observées ne peuvent être que le résultat de l'introduction du nanobody. Ceci est également vérifié lors de la comparaison TEM-1_NB et TEM-121_NB.

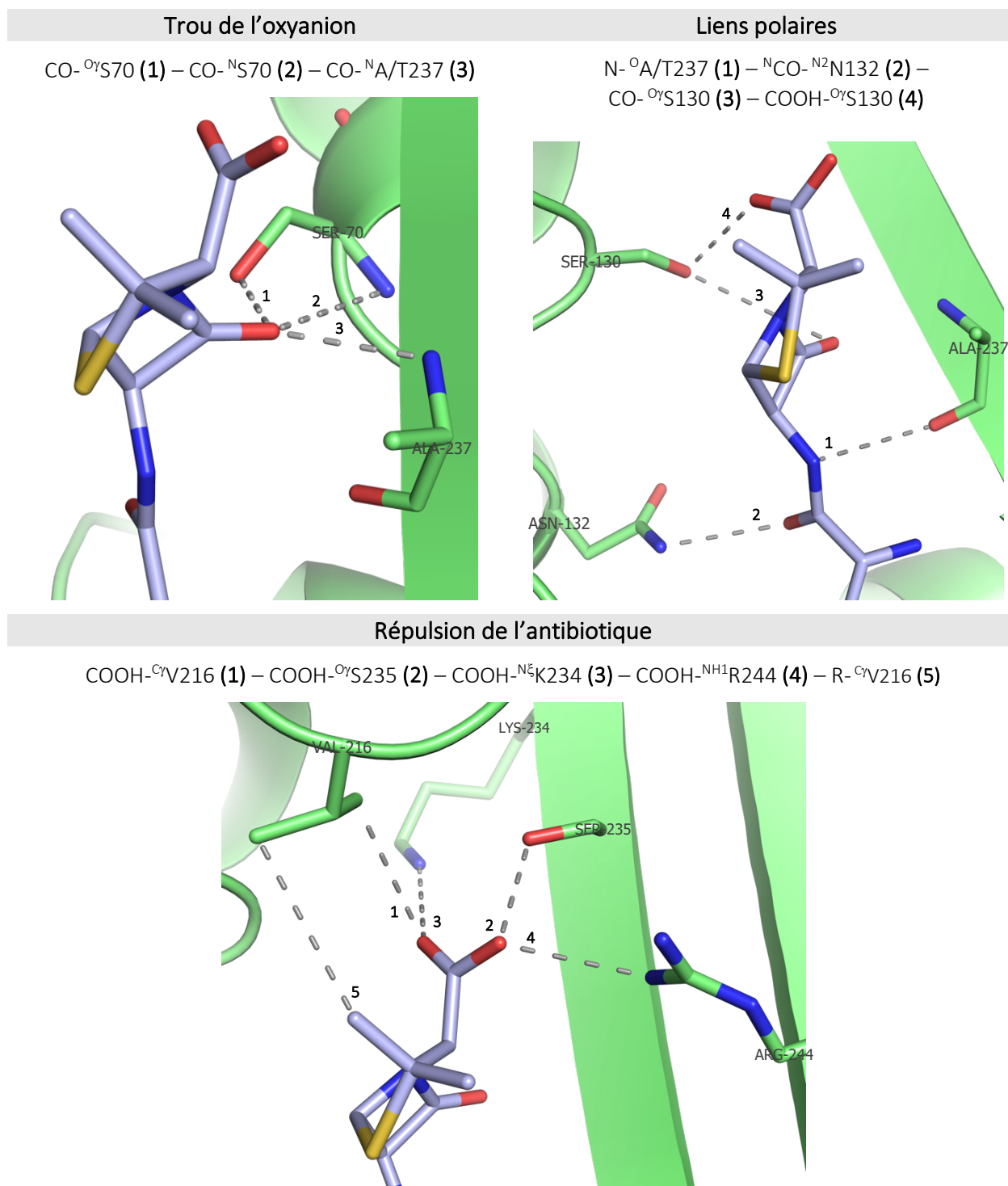


Tableau 4. Représentation des interactions dont les distances sont mesurées lors du choix de la conformation finale du substrat en utilisant TEM-1 et l'ampicilline comme exemples.

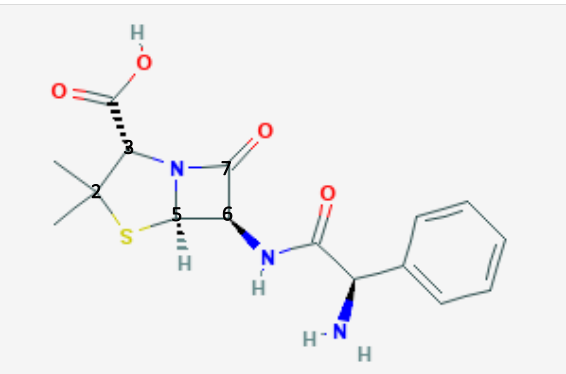
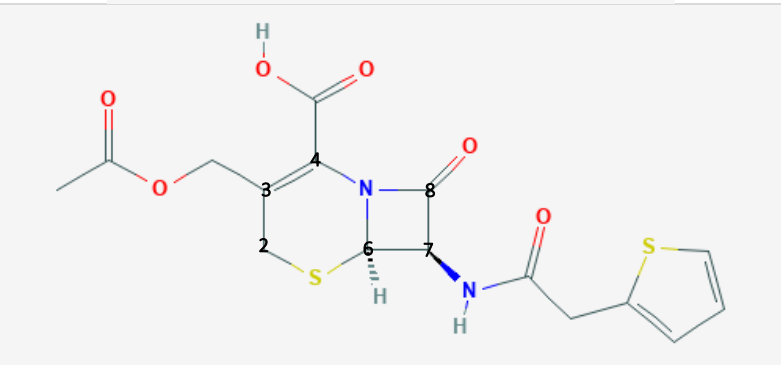
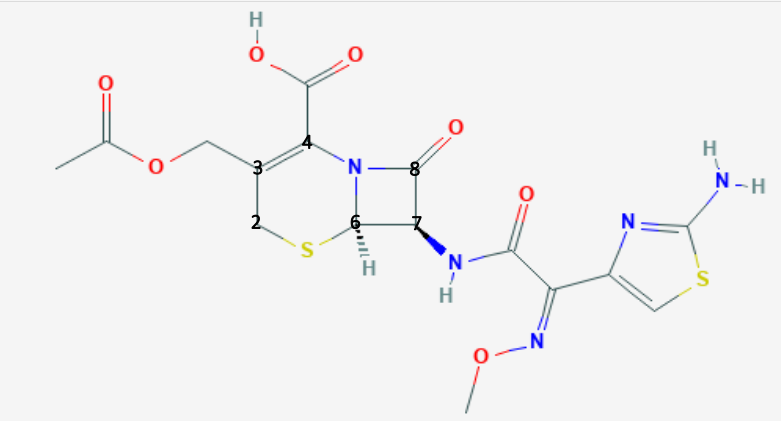
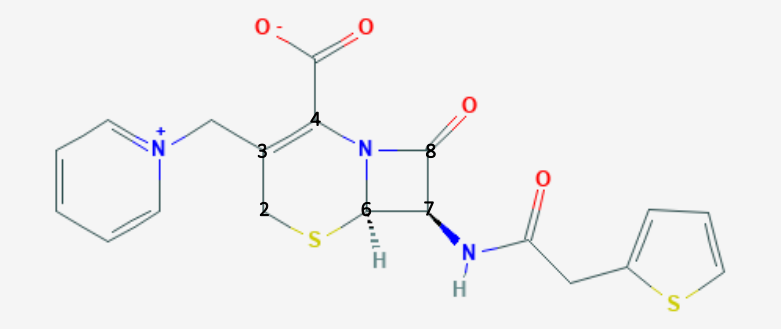
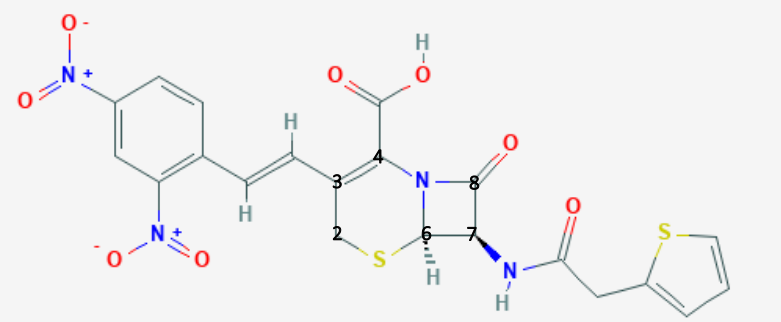
Ampicilline (pénicilline)	
Céfalotine (céphalosporine – C1G)	
Céfotaxime (céphalosporine – C3G)	
Céphaloridine (céphalosporine – C1G)	
Nitrocéfine (céphalosporine)	

Tableau 5. Structure chimique de l'ensemble des antibiotiques testés par docking.

4. Résultats

Le tableau 6 reprend l'ensemble des distances mesurées chez TEM-1, TEM-1_NB et TEM-121_NB pour tous les antibiotiques testés (ampicilline, céfalotine, céfotaxime, céphaloridine, nitrocéfine).

	Trou de l'oxyanion (Å)			Liens polaires (Å)				Répulsion de l'antibiotique (Å)				
	CO- O _γ S70	CO- N _S 70	CO- N _A 237	N- O _A 237	N ⁺ CO- N ₂ N132	CO- O _γ S130	COOH- O _γ S130	COOH- C _γ V216	COOH- O _γ S235	COOH- N _ε K234	COOH- NH ₁ R244	R- C _γ V216
AMPICILLINE												
TEM-1	2.9	3.5	2.1	2.2	2.4	3.4	2.8	3.4	2.0	3.5	2.3	4.0
TEM-1_NB	2.5	3.5	2.0	5.7	3.4	4.2	4.4	3.4	2.4	4.9	2.5	3.9
TEM-121_NB	2.6	3.9	3.1	5.3	4.1	4.4	2.1	4.3	3.9	3.5	/	3.7
CÉFALOTINE												
TEM-1	2.7	3.3	2.1	2.9	2.4	3.4	2.7	3.8	2.1	3.4	2.3	3.9
C-A	2.2	3.1	2.0	2.6	4.9	4.3	2.3	3.3	3.2	3.3	2.5	3.7
C-B	2.5	3.6	2.2	5.3	3.5	3.8	4.2	3.0	2.2	4.6	2.2	3.6
TEM-121_NB	3.0	4.9	4.1	5.0	4.8	2.2	2.6	3.5	4.7	4.4	/	5.2
CÉFOTAXIME												
TEM-1	2.6	3.6	2.6	3.4	2.4	3.1	2.4	4.5	2.6	3.0	1.9	3.7
C-A	2.5	4.0	3.1	5.4	5.4	4.6	2.0	4.2	3.5	3.5	3.1	3.6
C-B	2.7	3.7	2.1	5.2	4.2	3.8	4.1	3.2	2.4	4.6	2.2	4.0
TEM-121_NB	2.8	3.8	2.3	3.4	4.0	3.4	2.9	3.2	2.3	3.5	/	3.1
CÉPHALORIDINE												
TEM-1	2.7	3.3	2.1	3.0	2.5	3.4	2.7	3.9	2.3	3.6	2.3	3.8
TEM-1_NB	2.7	3.1	2.1	2.7	4.6	4.2	2.5	3.3	3.1	3.3	2.5	3.6
TEM-121_NB	3.8	6.0	5.4	4.1	2.3	3.2	2.9	3.2	4.1	4.5	/	4.4
NITROCÉFINE												
TEM-1	2.9	3.5	2.1	2.7	2.4	3.2	2.7	3.9	2.3	3.5	2.4	3.9
TEM-1_NB	3.2	4.1	2.2	5.8	3.4	3.8	4.8	3.4	2.7	5.2	2.2	4.1
TEM-121_NB	4.2	6.3	5.2	3.9	2.3	2.8	4.6	3.1	4.7	6.2	/	6.1

Tableau 6. Récapitulatif des distances mesurées chez TEM-1, TEM-1_NB et TEM-121_NB pour l'ampicilline, la céfalotine, la céfotaxime, la céphaloridine et la nitrocéfine.

4.1. Comparaison entre TEM-1 et TEM-1_NB

4.1.1. L'ampicilline

L'ampicilline est un petit antibiotique appartenant aux pénicillines et sans charge sur sa chaîne en C2, qui consiste en deux fonctions méthyls (tableau 5). La figure 17 représente la superposition des conformations choisies pour l'ampicilline chez TEM-1 (tons verts) et chez TEM-1_NB (tons bleus). Chez TEM-1, la fonction carboxylique en C3 est correctement orientée vers la Lys234 et la Ser235 tandis que, chez le complexe, elle est repoussée en direction de l'Arg244. En outre, le cycle thiazolidine (c'est-à-dire le cycle accolé au noyau β -lactame) de TEM-1_NB semble être expulsé de la cavité enzymatique, ce qui se voit particulièrement bien au niveau de ses fonctions méthyls en C2. Cette répulsion se marque par un accroissement général des distances à la suite de l'introduction du nanobody, à l'exception de celles mesurées pour le trou de l'oxyanion (tableau 6). Si elle ne peut pas être justifiée par un quelconque effet de charge étant donné que la chaîne en C2 de l'ampicilline n'en contient pas, elle pourrait néanmoins résulter de l'encombrement du site actif engendré par la Val216.

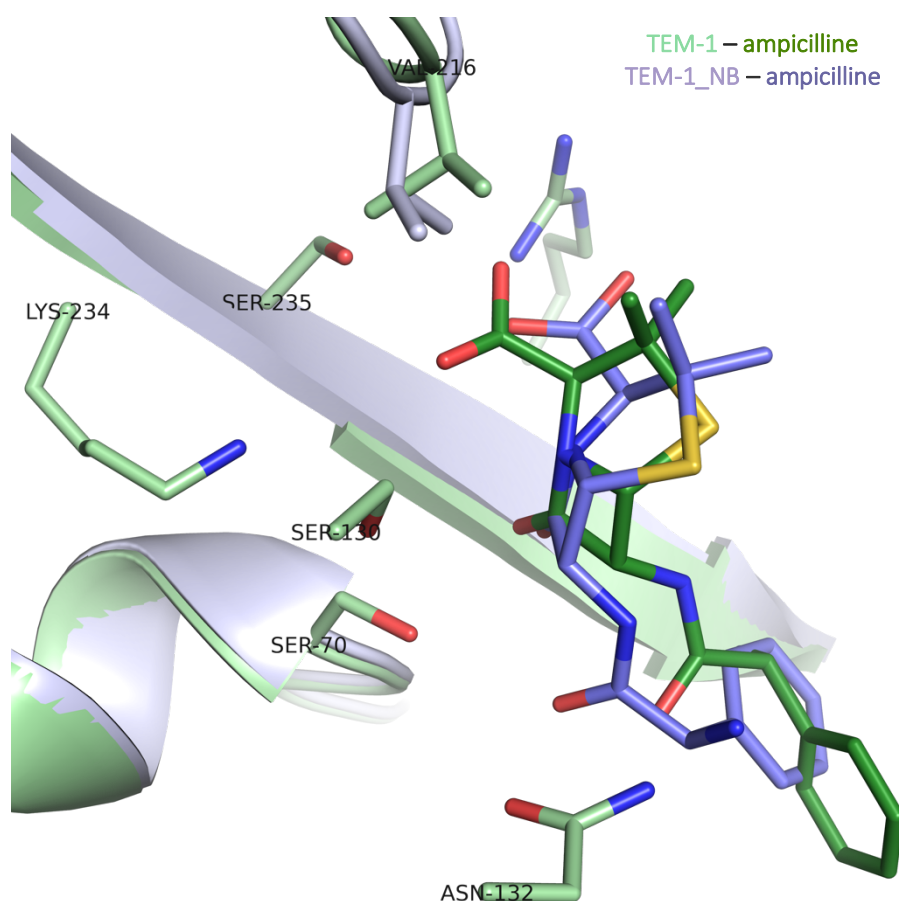


Figure 17. Superposition des conformations de l'ampicilline chez TEM-1 et TEM-1_NB avec : TEM-1 en vert clair et l'ampicilline en vert foncé ; TEM-1_NB en bleu clair et l'ampicilline en bleu foncé.

4.1.2. La céfalotine et la céfotaxime

Les résultats de la céfalotine et la céfotaxime ont été regroupés ensemble pour deux raisons. Premièrement, toutes deux sont de petites céphalosporines et bien que la première appartienne aux C1G et la seconde, aux C3G, leur chaîne en C3 est identique et sans charge (tableau 5). Deuxièmement, les conclusions sont identiques pour ces deux substrats.

Les figures 18 (ci-dessous) et 19 (en annexe) représentent la superposition des conformations choisies chez TEM-1 (tons verts) et chez TEM-1_NB (tons bleus) respectivement pour la céfalotine et la céfotaxime. Dans les deux cas, chez TEM-1, la fonction carboxylique en C4 est correctement positionnée vers la Lys234 et la Ser235. La fonction en C3 est en revanche dirigée vers l'extérieur de la cavité, surtout pour la céfalotine. Une explication possible à ce phénomène serait l'encombrement provoqué par la fonction guanidinium de l'Arg244.

Deux conformations montrant deux tendances différentes ont été obtenues pour ces substrats chez TEM-1_NB. La conformation bleue plus clair, ci-après dénommée C-A, présente une fonction carboxylique en C4 orientée vers la Ser235 et une répulsion de la fonction en C3 encore plus marquée que chez TEM-1. Par contre, dans le cas de la conformation bleu foncé, dite C-B, la fonction en C3 se positionne verticalement alors que la fonction carboxylique en C4 se décale en direction de l'Arg244. Dans les deux cas, l'antibiotique est repoussé vers l'extérieur de la cavité enzymatique ; un accroissement de la distance de certains liens polaires est d'ailleurs observé (tableau 6). Les réorientations de ces fonctions en C3 et C4 pourraient être justifiées par le positionnement général de l'antibiotique. En effet, la conformation C-B de la céfalotine est située plus en hauteur que C-A et que la céfalotine de TEM-1. De ce fait, la fonction carboxylique fait face à la Val216 et se réorienterait afin de s'éloigner de ses C γ hydrophobes. Par contre, la C-A étant plus basse, ce serait la chaîne latérale en C3 qui subirait l'effet de la réorientation de la Val216 et qui serait expulsée de la cavité. De cette manière, la fonction carboxylique pourrait se positionner d'une manière plutôt similaire à celle de TEM-1. Cette observation est corroborée par la mesure de la distance COOH-C γ V216 qui est la plus faible pour C-B. Chez la céfotaxime, c'est l'inverse (la conformation C-A est particulièrement abaissée par rapport à de TEM-1), mais les résultats demeurent identiques.

Finalement, il est intéressant de noter que, que ce soit pour la céfalotine ou la céfotaxime et peu importe la conformation, la distance COOH-C γ V216 est toujours plus faible chez TEM-1_NB que chez TEM-1.

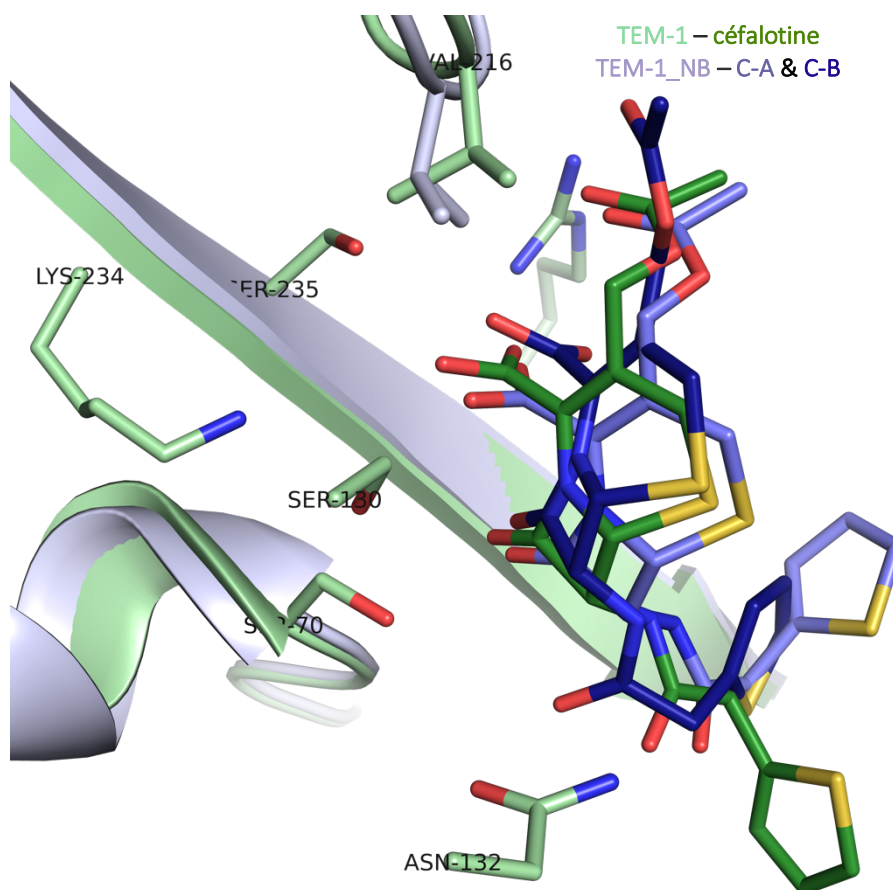


Figure 18. Superposition des conformations de la céfalotine chez TEM-1 et TEM-1_NB avec : TEM-1 en vert clair et la céfalotine en vert foncé ; TEM-1_NB en bleu clair, C-A en bleu et C-B en bleu foncé.

4.1.3. La céphaloridine et la nitrocéfine

Les résultats de la céphaloridine et la nitrocéfine ont été regroupés ensemble pour deux raisons. Premièrement, ce sont des céphalosporines présentant une chaîne en C3 volumineuse et chargée (tableau 5). La céphaloridine appartient aux C1G et contient une charge positive en C3 qui s'équilibre avec la charge négative de la fonction carboxylique en C4, ce qui en fait un zwitterion à pH physiologique. La structure de la nitrocéfine suit celle des céphalosporines (noyau β -lactame + cycle dihydrothiazine) mais il ne s'agit pas d'un antibiotique. Son cycle en C3 contient deux charges positives et deux charges négatives. Deuxièmement, les conclusions sont similaires pour ces deux substrats.

Les figures 20 (ci-dessous) et 21 (en annexe) représentent la superposition des conformations choisies chez TEM-1 (tons verts) et chez TEM-1_NB (tons bleus) respectivement pour la céphaloridine et la nitrocéfine. Pour les deux substrats, la fonction carboxylique en C4 chez TEM-1 s'oriente vers la Lys234 et la Ser235, avec des distances favorables à l'établissement du réseau de liaisons H (tableau 6).

Chez le complexe TEM-1_NB, la céphaloridine et la nitrocéfine sont toutes les deux repoussées vers l'extérieur du site actif. Cette répulsion se voit particulièrement bien pour la céphaloridine. En ce qui concerne cette dernière, si la répulsion de son cycle en C3 chez TEM-1 peut s'expliquer par un effet de charge entre la charge positive de ce dernier et celle de l'Arg244, ce serait l'encombrement stérique

provoqué par la Val216 qui jouerait ce rôle chez le complexe et qui l'exacerberait. Cette hypothèse est supportée par la réduction de la distance COOH- C_{γ} V216 chez TEM-1_NB, alors que celle entre COOH- NH^1 R244 reste relativement constante (tableau 6). Par contre, pour la nitrocéfine, la répulsion du cycle en C3 observée chez TEM-1_NB pourrait être expliquée de deux façons : soit suite à l'intrusion des C_{γ} de la Val216 dans la cavité enzymatique, soit suite à la forte proximité entre le CDR3 du nanobody et la chaîne en C3, qui n'est pas observée pour les autres substrats. La diminution de la distance entre COOH- C_{γ} V216 chez TEM-1_NB (tableau 6) tend à valider la première hypothèse, mais n'exclut pas la seconde pour autant. En outre, leur fonction carboxylique en C4, surtout celle de la nitrocéfine, s'oriente également vers l'Arg244 chez TEM-1_NB, tout comme pour l'ampicilline et les conformations C-B de la céfalotine et de la céfotaxime. Pour terminer, contrairement à ce qui avait été obtenu pour ces deux derniers antibiotiques, seule une configuration ressort des expériences de docking pour la céphaloridine et la nitrocéfine.

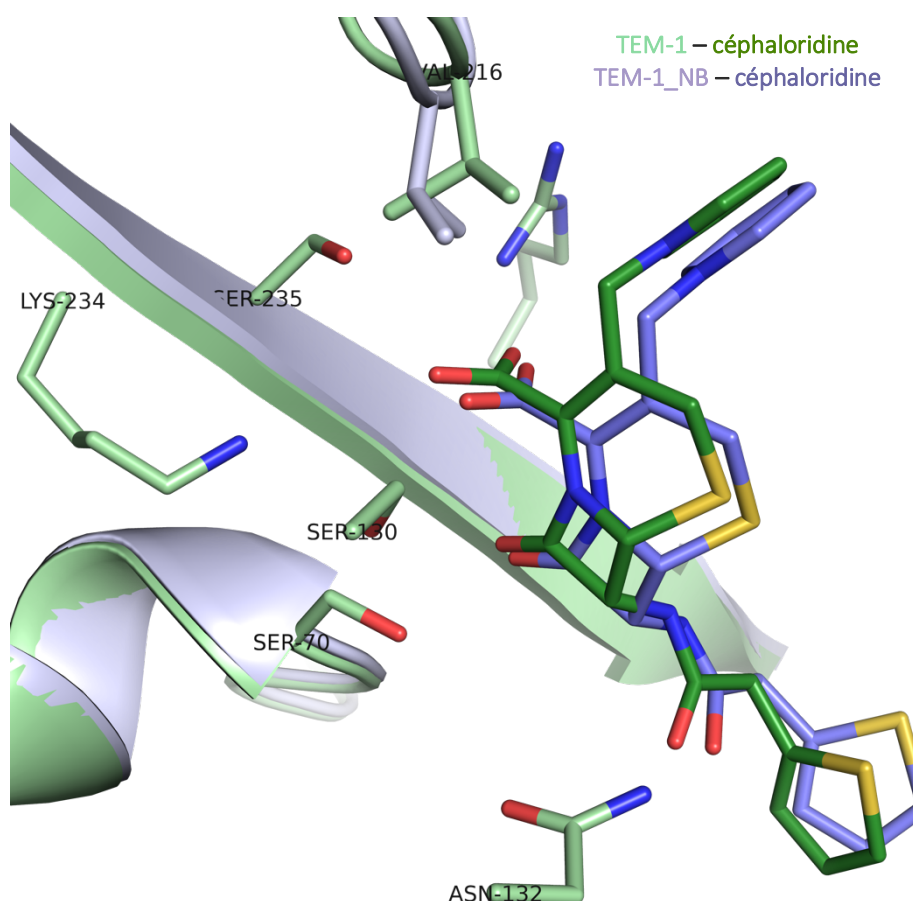


Figure 20. Superposition des conformations de la céphaloridine chez TEM-1 et TEM-1_NB avec : TEM-1 en vert clair et la céphaloridine en vert foncé ; TEM-1_NB en bleu clair et la céphaloridine en bleu foncé.

4.2. Comparaison entre TEM-1_NB et TEM-121_NB

4.2.1. L'ampicilline

La figure 22 représente la superposition des conformations choisies pour l'ampicilline chez TEM-1_NB (tons verts) et chez TEM-121_NB (tons bleus). Pour les deux complexes, les distances qui impliquent la fonction carbonyle restent favorables à la mise en place du réseau de liaisons H. Par contre, le positionnement de la fonction carboxylique en C3 de l'ampicilline change entre les deux enzymes : alors qu'elle est orientée vers l'Arg244 chez TEM-1_NB, cette fonction se replace correctement face à la Lys234 et la Ser235 chez TEM-121_NB, d'une façon qui rappelle le positionnement de celle de TEM-1 (figure 23). Finalement, l'ampicilline de TEM-121_NB est située très fortement à l'extérieur du site actif par rapport à TEM-1_NB.

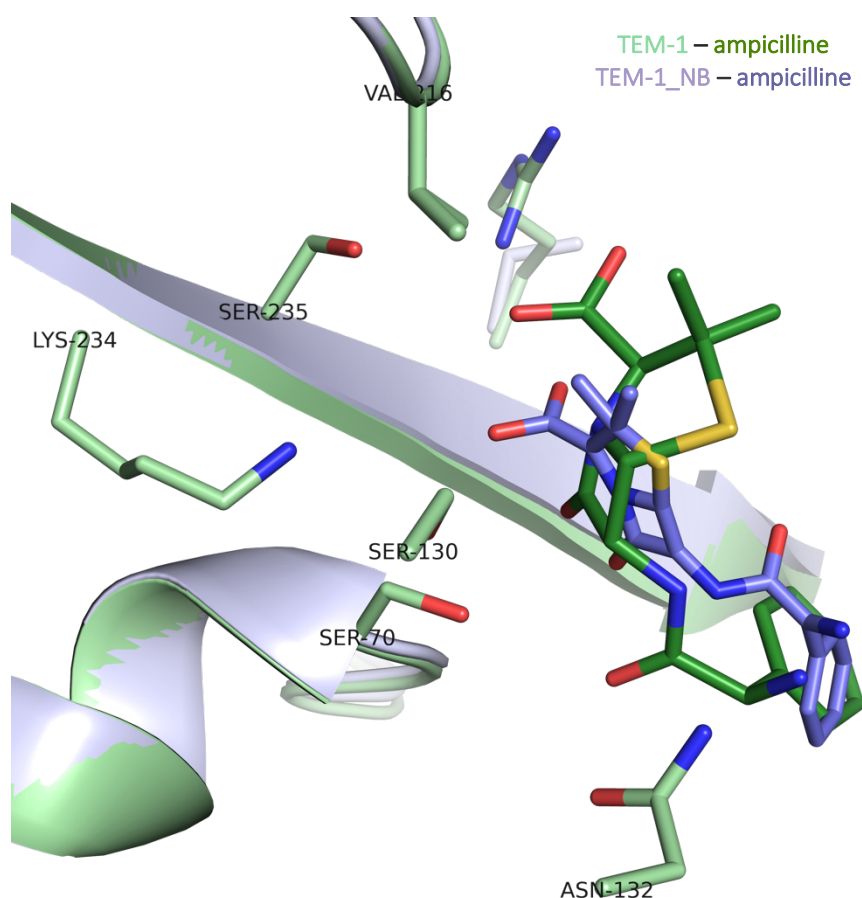


Figure 22. Superposition des conformations de l'ampicilline chez TEM-1_NB et TEM-121_NB avec : TEM-1_NB en vert clair et l'ampicilline en vert foncé ; TEM-121_NB en bleu clair et l'ampicilline en bleu foncé.

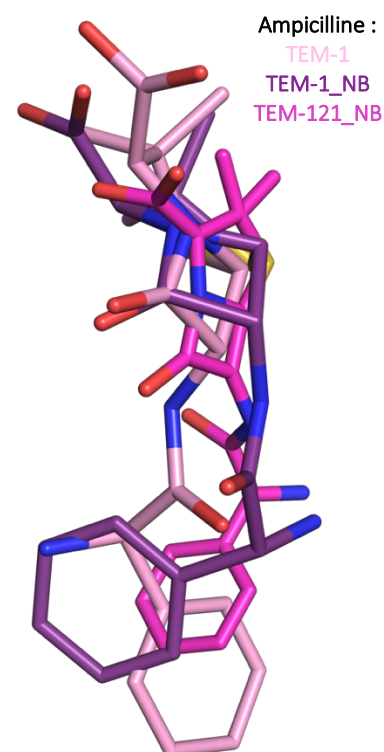


Figure 23. Superposition des conformations de l'ampicilline chez TEM-1 (rose clair), chez TEM-1_NB (violet) et chez TEM-121_NB (magenta).

4.2.2. La céfalotine et la céfotaxime

Les figures 24 (en annexe) et 25 (ci-dessous) représentent la superposition des conformations choisies chez TEM-1_NB (tons verts) et chez TEM-121_NB (tons bleus) respectivement pour la céfalotine et la céfotaxime. Dans les deux-cas, la comparaison est effectuée avec la forme C-B de TEM-1_NB. Les deux antibiotiques sont repoussés vers l'extérieur de la cavité enzymatique chez TEM-121_NB. Cette répulsion se voit particulièrement bien pour le noyau β -lactame, le cycle qui y est accolé et la fonction en C3 de la céfalotine, alors que, pour la céfotaxime, elle concerne plutôt la chaîne latérale partant du C7. Ces observations se marquent au niveau des mesures de distances, qui s'accroissent pour la première tandis qu'elles restent relativement propices à l'établissement du réseau de liaisons H chez la seconde (tableau 6). En outre, comme pour l'ampicilline, la fonction carboxylique en C4 ainsi que de la chaîne en C3 des deux antibiotiques se positionnent vers la Lys234 et la Ser235 de TEM-121_NB alors qu'elles étaient dirigées vers l'Arg244 chez TEM-1_NB.

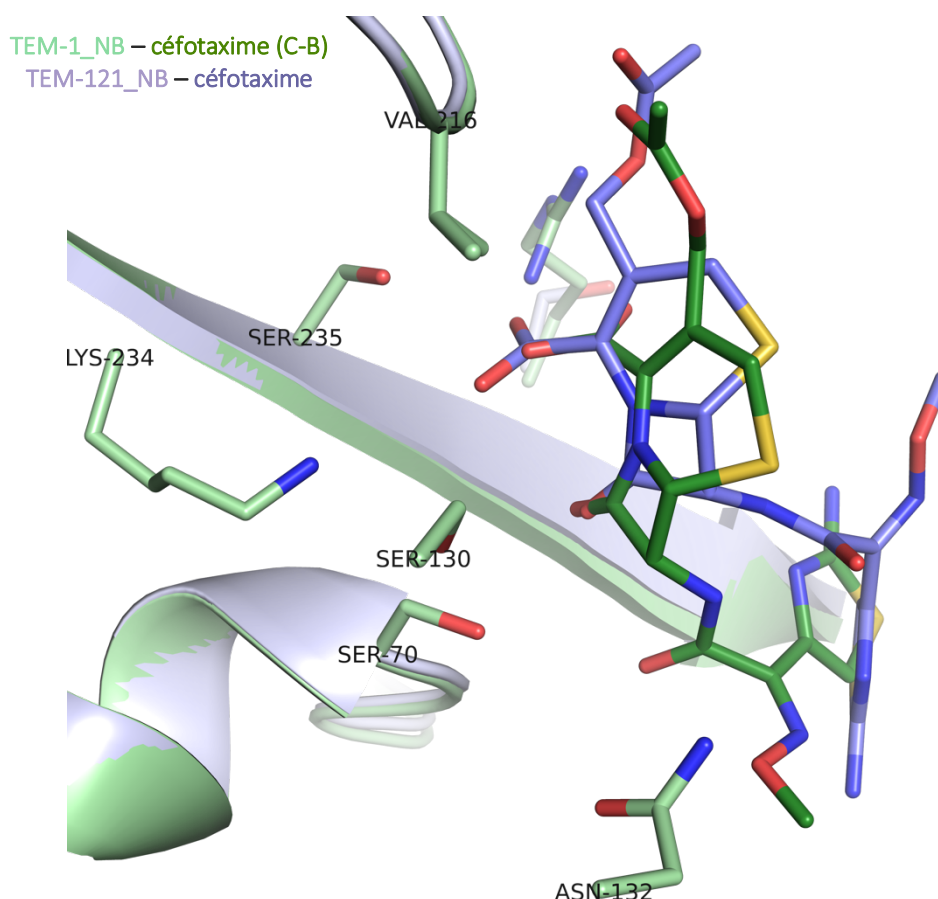


Figure 25. Superposition des conformations de la céfotaxime chez TEM-1_NB et TEM-121_NB avec : TEM-1_NB en vert clair et la céfotaxime (C-B) en vert foncé ; TEM-121_NB en bleu clair et la céfotaxime en bleu foncé.

4.2.3. La céphaloridine et la nitrocéfine

Les figures 26 (en annexe) et 27 (ci-dessous) représentent la superposition des conformations choisies chez TEM-1_NB (tons verts) et chez TEM-121_NB (tons bleus) respectivement pour la céphaloridine et la nitrocéfine. De nouveau, les deux substrats sont fortement déplacés à l'extérieur de la cavité de TEM-121_NB. De ce fait, le noyau β -lactame est bien plus éloigné de la Ser70 que chez TEM-1_NB, ce qui se traduit par une élévation des mesures de distances (tableau 6). La réorientation de la fonction carboxylique en C4 vers le site actif (Lys234 et Ser235) décrite pour l'ampicilline, la céfalotine et la céfotaxime s'observe également pour la céphaloridine et la nitrocéfine.

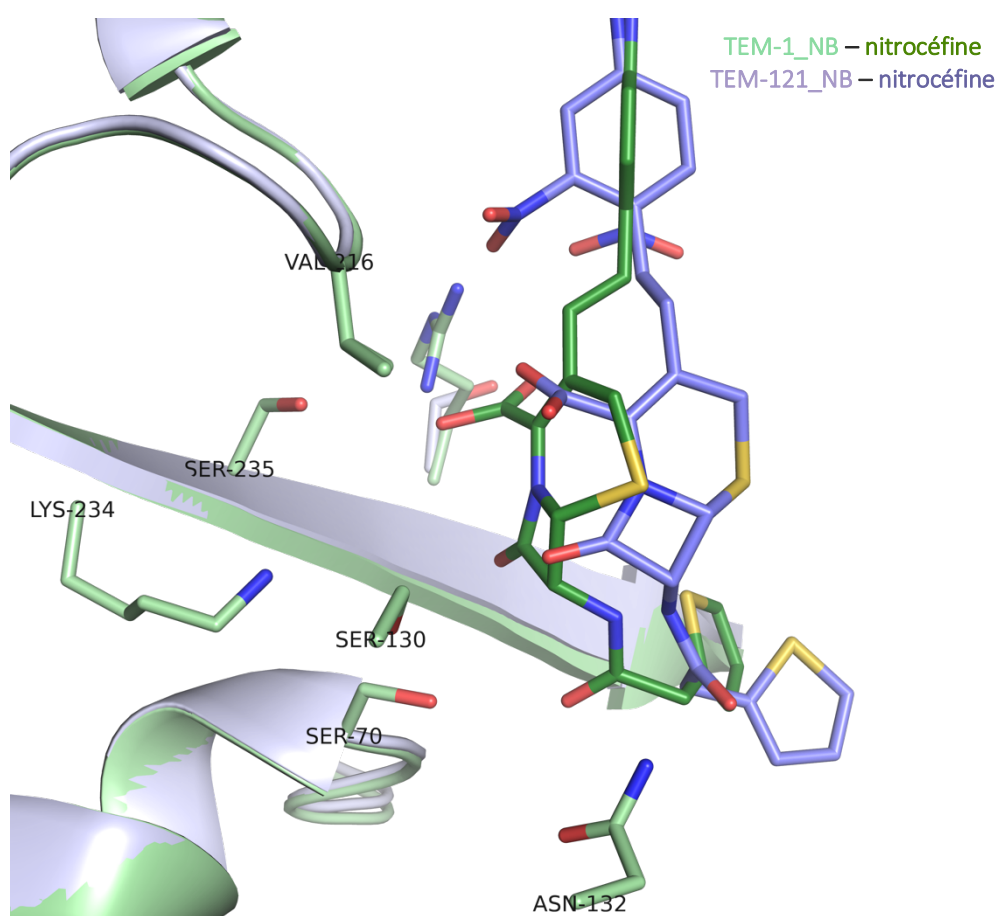


Figure 27. Superposition des conformations de la nitrocéfine chez TEM-1_NB et TEM-121_NB avec : TEM-1_NB en vert clair et la nitrocéfine en vert foncé ; TEM-121_NB en bleu clair et la nitrocéfine en bleu foncé.

4.2.4. La céfépime et la ceftazidime

La céfépime et la ceftazidime ont également été utilisées pour la réalisation de la modélisation par docking du modèle de TEM-121_NB, mais pas pour celles de TEM-1 et de TEM-1_NB car ce sont de très mauvais substrats pour cette enzyme. Ces antibiotiques sont des céphalosporines (respectivement C4G et C3G) très volumineuses et chargées en C3. Leur structure (tableau 7), les distances mesurées (tableau 8) et leur conformation (figure 28) sont présentées en annexe. Les tendances observées sont les mêmes, à savoir : un changement d'orientation de fonction carboxylique en C4 et un net recul vers l'extérieur de la cavité, en particulier pour la ceftazidime.

Partie II

Un peu de dynamique :
modélisation dynamique & RMN

1. Partie informatique : la modélisation dynamique (MD)

1.1. Objectifs

Les modèles cristallographiques de TEM-1 seul (PDB : 1M40) et de TEM-1_NB suggèrent que la présence du nanobody serait responsable d'une stabilisation de la boucle Val (Glu212 – Gly218), qui représente la partie la plus importante de l'interface d'interaction entre l'enzyme et le nanobody et par l'intermédiaire de laquelle pourrait se faire l'inhibition. En effet, alors que cette boucle présente deux formes différentes entre les deux conformations TEM-1_A et TEM-1_B du modèle cristallographique TEM-1 1M40 obtenu à très haute résolution, une seule conformation, qui est davantage ancrée au sein du site actif, est observée chez le complexe (figure 29). La modélisation dynamique a donc comme principaux objectifs la compréhension et la quantification des changements de dynamique apportés par l'interaction de l'enzyme TEM-1 avec le nanobody cAb_{TEM-1}. De plus, cette étude tente d'établir un lien cause à effet entre la diminution de dynamique au sein de la boucle Va et les phénomènes d'inhibition.

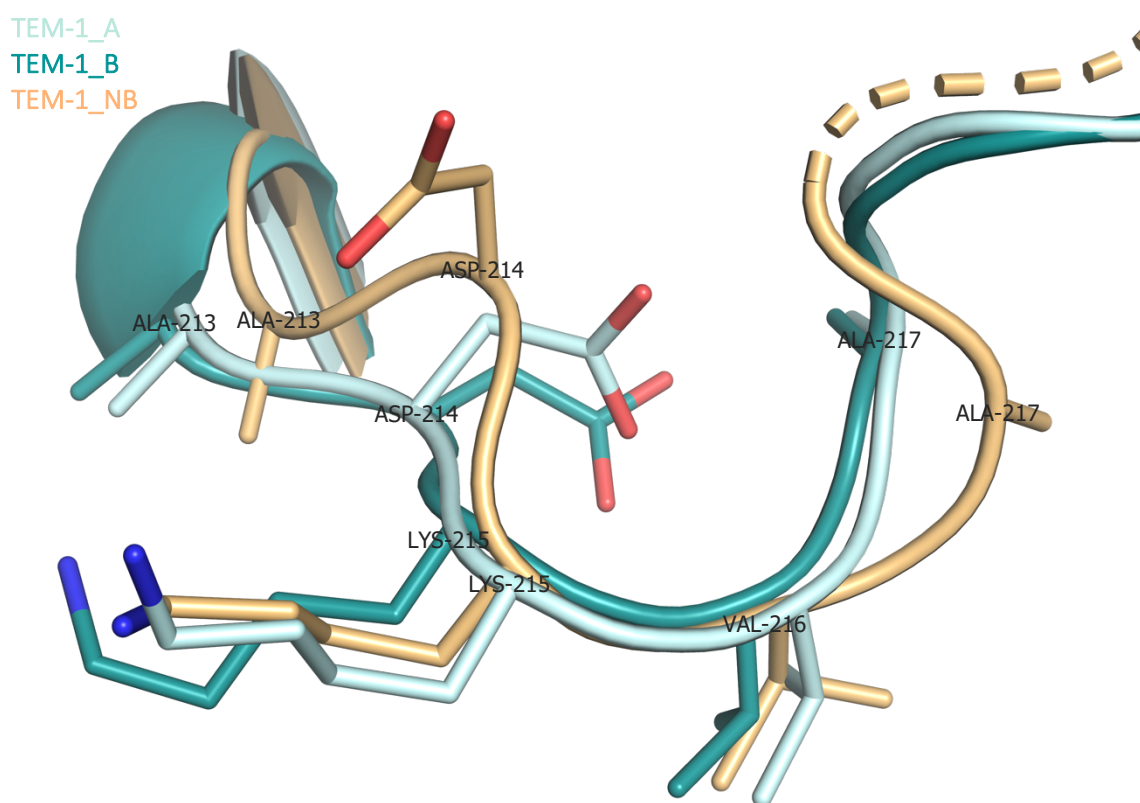


Figure 29. Comparaison des conformations de la boucle Val des structures cristallographiques TEM-1 1M40 et TEM-1_NB avec : la conformation A de TEM-1 1M40 (TEM-1_A) en cyan clair ; la conformation B de TEM-1 1M40 (TEM-1_B) en cyan foncé ; TEM-1_NB en orange.

1.2. Matériels et méthodes

Quatre modèles ont été utilisés pour lancer les simulations : le complexe TEM-1_NB ; la protéine TEM-1 seule obtenue depuis la structure de TEM-1_NB (ci-après dénommée TEM-1_C) ; et les deux conformations A et B de la structure 1M40 de TEM-1 (ci-après dénommées respectivement TEM-1_A et TEM-1_B). Tous ces modèles ont préalablement été nettoyés par suppression des molécules d'eau et de tampon. Il est en effet préférable de travailler avec les protéines nues et de laisser le logiciel ajouter lui-même les molécules d'eau afin d'obtenir un système plus homogène. Pour chaque modèle, la simulation se fait en trois étapes : (1) une minimisation d'énergie, (2) une équilibration du système, (3) une dynamique moléculaire pour la production des données. Toutes les simulations sont exécutées par l'intermédiaire du logiciel Gromacs en utilisant le champ de force Amber03 et le modèle TIP3 pour les molécules d'eau.

La minimisation d'énergie (ME) et l'équilibration du système (ES) constituent deux étapes de préparation du système pour lancer les simulations de dynamique moléculaire. Elles sont réalisées par un ordinateur situé au Chili.

La ME a pour objectif de trouver un minimum énergétique local du modèle étudié afin d'obtenir la meilleure conformation possible de celui-ci. La simulation de ME a nécessité la création d'une « boîte » au sein de laquelle la protéine est placée et bouge. Cette boîte est ensuite remplie par des molécules d'eau et d'ions (NaCl 150 mM). Le protocole de ME qui a été utilisé est le protocole « Steepest descent » avec 10 000 cycles. L'option « xyz » a été choisie pour le paramètre pbc (« *periodic boundary conditions* »), qui représente la périodicité du système. Cette option permet de s'assurer que la protéine demeure à l'intérieur de la boîte malgré ses mouvements.

L'ES restreint et fixe la position de la protéine au sein de la boîte afin de permettre aux molécules d'eau et aux ions de s'équilibrer au niveau du système. Seuls les mouvements du solvant et des ions seront tolérés au terme de cette étape (option : « DPOSRES ; Protein is restrained »). Le protocole d'ES qui a été utilisé est le protocole « md » (« *molecular dynamics* »), avec un dt (temps entre deux mesures) de 2 fsec et 500 000 étapes. L'option « xyz » a été choisie pour le paramètre pbc. L'ES a été réalisée à 298 K (25°C).

Les simulations de dynamique moléculaire (MD) ont, quant à elles, été effectuées par l'intermédiaire du système CECI (<http://www.ceci-hpc.be/>), en utilisant la machine Dragon2 de l'UMons. Pour chaque modèle, cinq simulations (md1, md2, md3, md4 et md5) sont réalisées en parallèle afin d'obtenir un plus grand poids statistique. Le protocole de MD qui a été utilisé est le protocole « md », avec un dt de 2 fsec et 50 000 000 étapes. L'option « xyz » a été choisie pour le paramètre pbc. La MD a été réalisée à 298 K (25°C) avec une vitesse différente pour chacune des 5 simulations.

1.3. Résultats

1.3.1. Définitions : RMSF et RMSD

Les résultats des diverses modélisations sont principalement analysés par le biais de la mesure du RMSD et du RMSF (respectivement « *Root-Mean-Square Deviation* » et « *Root-Mean-Square Fluctuation* »). Le premier est une mesure de la distance moyenne entre les atomes des résidus de la protéine : il témoigne de la constance et de l'absence (ou de la présence selon sa valeur) de mouvements au cours de la simulation. Le second, quant à lui, est une mesure de la déviation moyenne de la position de ces atomes par rapport à une position de référence, ce qui permet d'analyser des portions de structure présentant de fortes fluctuations. Autrement dit, le RMSF rend compte du mouvement de chaque résidu au cours de la simulation et peut être considéré comme l'équivalent du facteur B en cristallographie.

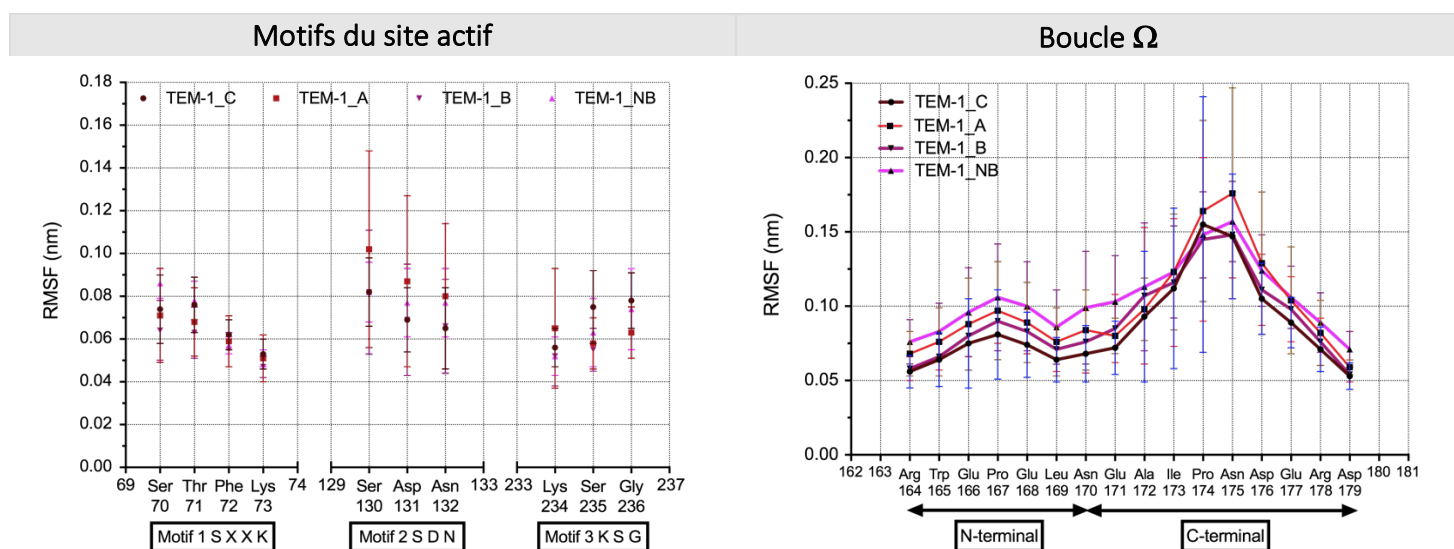
1.3.2. Contrôles de la modélisation

Avant de commencer l'analyse de la dynamique de la boucle Val, la dynamique de deux domaines de TEM-1 a été examinée pour les quatre modèles (TEM-1_A, TEM-1_B, TEM-1_C, TEM-1_NB) : il s'agit de celles des résidus des trois motifs du site actif (Ser70-X-X-Lys73 ; Ser130-X-Asn132 ; Lys234-Thr/Ser235-Gly236) et de la boucle Ω . Ces analyses sont considérées comme des contrôles permettant de valider les simulations car la dynamique de ces domaines est connue.

Les résidus des trois motifs du site actif montrent une tendance à la stabilité, que ce soit pour les modèles de TEM-1 seul ou complexé (graphique 5). En effet, aucun RMSF ne dépasse 0.1 nm, ce qui témoigne d'une dynamique très faible. Or, diverses études ont justement déjà mis en évidence que ces résidus sont caractérisés par une mobilité très faible, essentielle à leur fonction catalytique.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

En ce qui concerne la boucle Ω (graphique 6), le mouvement est similaire entre les quatre modèles : le nanobody n'introduit pas un accroissement ou une perte de la dynamique des résidus de cette boucle, les RMSF demeurant semblables entre les modèles. De plus, les tendances observées suivent les données connues et publiées pour la boucle Ω , à savoir que la partie N-terminale présente une flexibilité moindre que la partie C-terminale afin de permettre à la Glu166 et l'Asn170 d'être correctement positionnées.⁽¹³⁾ Il semble donc que le nanobody n'impacte pas sa mobilité. Enfin, la conformation de la boucle Ω n'étant pas modifiée, il y a peu de chances que la désacylation de TEM-1_NB soit touchée.

Ces contrôles indiquent que les résultats de la modélisation sont cohérents par rapport aux informations disponibles dans la littérature. Grâce à cette observation, la modélisation est validée et l'étude de la dynamique de la boucle Val a pu être initiée.



Graphique 5. Représentation des RMSF (nm) des résidus des trois motifs du site actif de TEM-1 (Ser70-X-X-Lys73 ; Ser130-X-Asn132 ; Lys234-Thr/Ser235-Gly236) pour les quatre modèles TEM-1_C, TEM-1_A, TEM-1_B et TEM-1_NB.

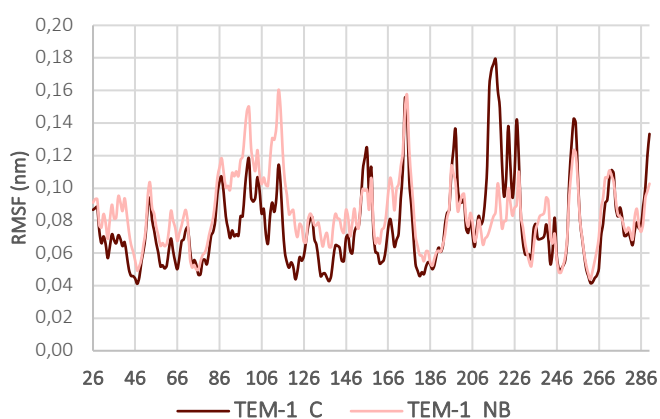
Graphique 6. Évolution du RMSF (nm) des résidus de la boucle Ω pour les quatre modèles TEM-1_C, TEM-1_A, TEM-1_B et TEM-1_NB.

1.3.3. Étude dynamique des modèles protéiques

La comparaison des mesures de RMSF de la chaîne principale de TEM-1_NB avec celle de TEM-1_C (graphique 7), de TEM-1_A (graphique 8) et de TEM-1_B (graphique 9, en annexe) met en évidence un profil dynamique relativement identique entre les formes seules et la forme complexée. Autrement dit, le nanobody ne semble pas grandement impacter la stabilité de l'enzyme à deux exceptions près. La première concerne les résidus 90 à 125 (Gln90 – Ala125, figure 30) dont la mobilité s'accroît légèrement en présence du nanobody. La région Trp210-Leu220 (figure 30), incluant donc boucle Val (Glu212 – Gly218) constitue la seconde exception, bien que la tendance soit ici inverse : une perte de dynamique est observée lors du passage des formes seules TEM-1_C et TEM-1_A à la forme complexée TEM-1_NB. Il faut également noter que l'amplitude de ces différences de mouvement est beaucoup plus importante pour le modèle TEM-1_C, issu de TEM-1_NB, que celle de TEM-1_A.

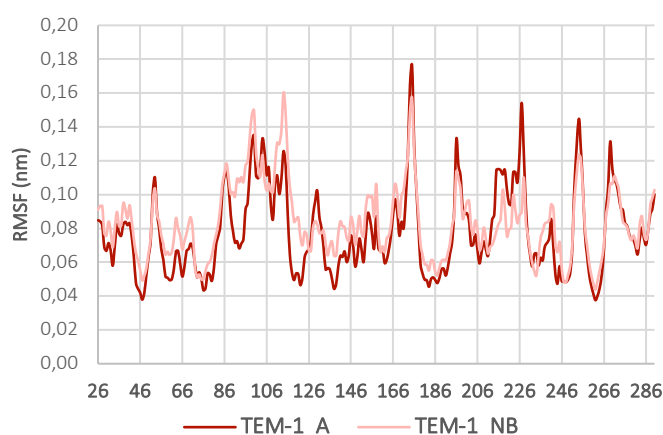
Ces données suggèrent donc que le nanobody n'aurait qu'un effet très ciblé sur la dynamique de TEM-1. En effet, seuls deux domaines (90 – 120 et 210 – 220), dont la boucle Val, semblent impactés par sa présence et cet effet se marque par leur stabilisation et une réduction de leur dynamique. Il faut noter qu'aucun des résidus de ces domaines ne présente de fonction catalytique connue...

TEM-1_C – TEM-1_NB



Graphique 7. Évolution du RMSF (nm) de la chaîne principale de TEM-1_C (rouge foncé) et de TEM-1_NB (rose).

TEM-1_A – TEM-1_NB



Graphique 8. Évolution du RMSF (nm) de la chaîne principale de TEM-1_A (rouge) et de TEM-1_NB (rose).

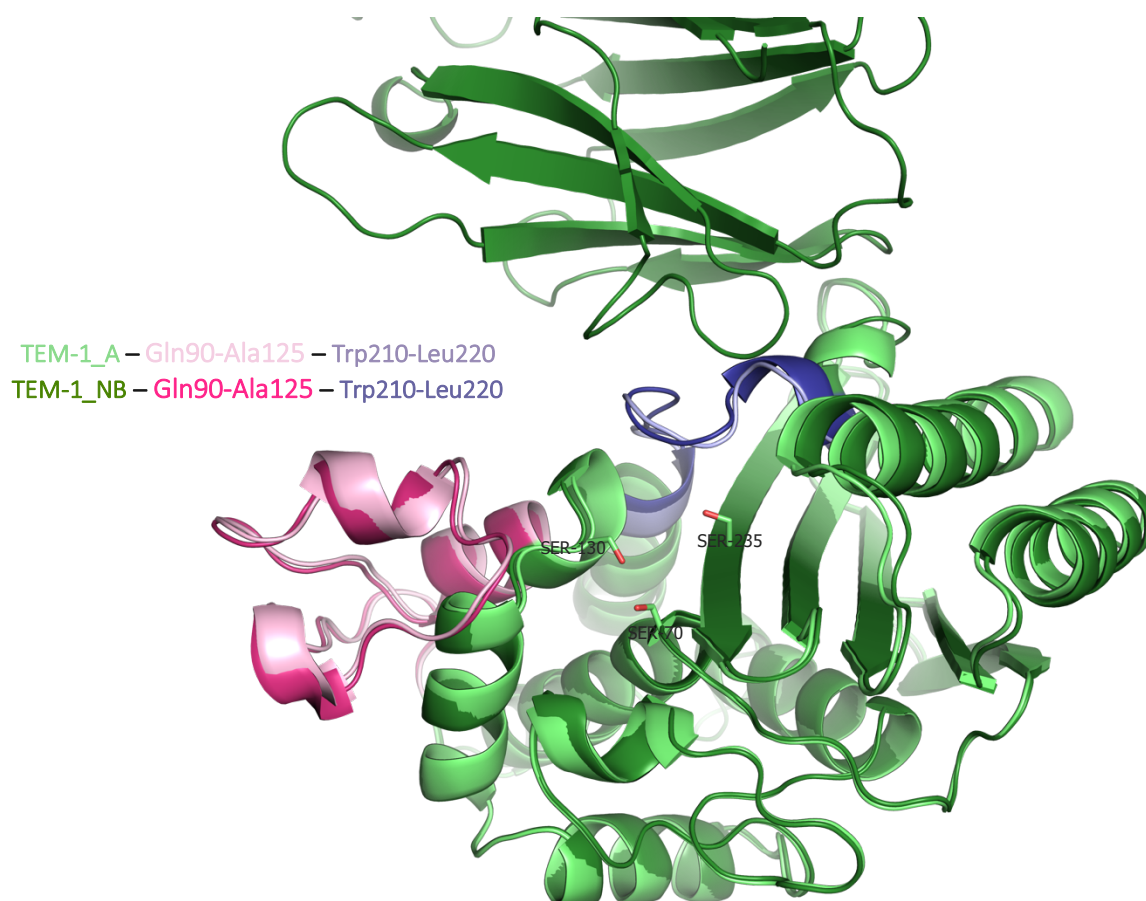
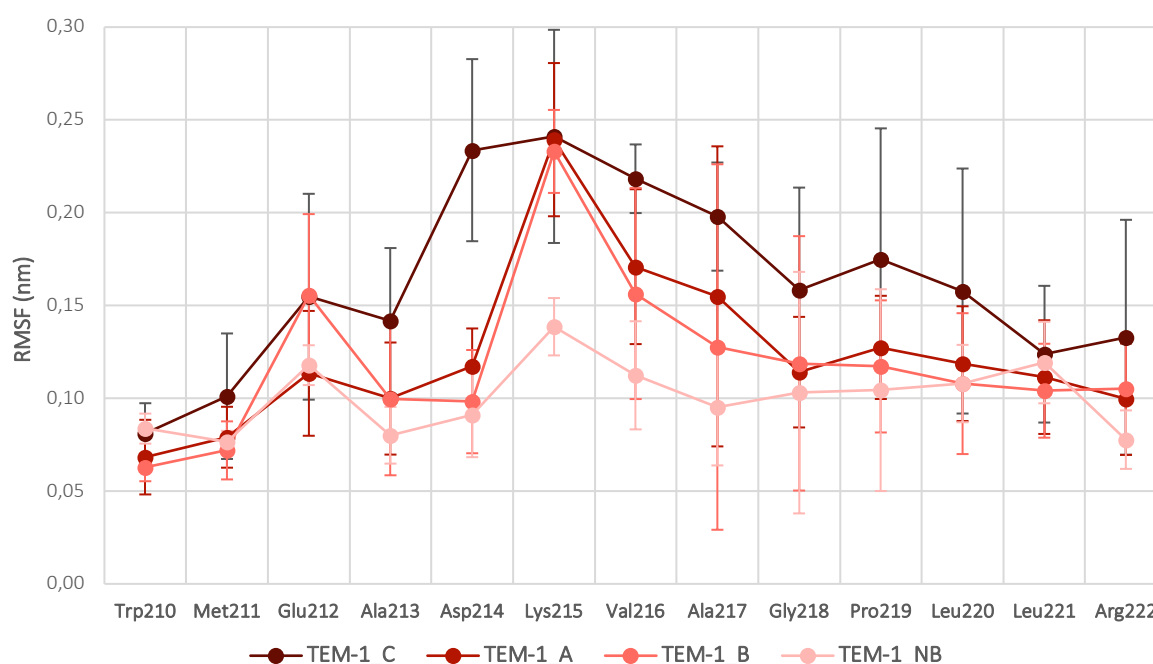


Figure 30. Localisation des régions présentant des variations de dynamique entre TEM-1_A (vert clair) et TEM-1_NB (vert foncé). Les résidus 90-125 sont représentés en rose clair chez TEM-1_A et en rose foncé chez TEM-1_NB. Les résidus 210-220 sont représentés en bleu clair chez TEM-1_A et en bleu foncé chez TEM-1_NB. Les résidus Ser70, Ser130 et Ser235 ont été représentés en stick.

1.3.4. Étude de la dynamique de la boucle Val

1.3.4.1. Vue générale

L'étude du RMSF des résidus la boucle Val montre une dynamique différente suivant les modèles étudiés (graphique 10 ; les graphiques 11 et 12 en annexe représentent l'évolution du RMSF respectivement pour les chaînes principales et latérales des résidus de la boucle Val). En effet, la boucle Val de tous les modèles de TEM-1 seul (TEM-1_C, TEM-1_A et TEM-1_B) présente une mobilité accrue par rapport à celle de TEM-1_NB et l'amplitude de cette différence est particulièrement marquée entre TEM-1_C et TEM-1_NB, moindre pour les deux configurations TEM-1_A et TEM-1_B. La seule exception est la Lys215 qui présente des mouvements d'une même amplitude élevée pour les modèles TEM-1_C, TEM-1_A et TEM-1_B, ce qui n'est pas étonnant car il s'agit d'un résidu qui se caractérise par un grand nombre de rotamères et qui, à moins d'interagir avec d'autres résidus, bouge constamment. De plus, les écarts-types des formes seules sont généralement plus importants que ceux de l'enzyme complexée, ce qui signifie que la possibilité de mouvements est accrue. Cette différence entre les écarts-types est particulièrement marquée pour la Val216 et l'Ala217 de TEM-1_A et de TEM-1_B. Les modélisations de ces deux modèles présentent donc une variabilité beaucoup plus grande que celle de TEM-1_NB, pour laquelle les écarts-types sont plus faibles, avec ainsi une réduction de la possibilité de mouvements.



Graphique 10. Évolution du RMSF (nm) des résidus de la boucle Val pour les quatre modèles TEM-1_C, TEM-1_A, TEM-1_B, TEM-1_NB. Le RMSF correspond à la moyenne des cinq simulations réalisées par modèle.

La différence de mouvements observée entre les deux conformations de TEM-1 1M40, TEM-1_A et TEM-1_B, avec le modèle TEM-1_C peut s'expliquer par la disparition de ponts H chez ce dernier (figures 31 et 32). En effet, la fonction carboxylique de l'Asp214 de TEM-1_A et de TEM-1_B interagit avec l'azote

des chaînes principales de la Val216 et de l'Ala217. Ces interactions semblent réguler la mobilité de la boucle Val, afin d'éviter qu'elle ne prenne des configurations qui seraient défavorables en terme de stabilité et d'activité, notamment par son éloignement (et donc celui des fonctions méthyles Cy de la Val216) du site actif. Cependant, chez la forme complexée TEM-1_NB, ces liens sont rompus car l'Asp214 interagit avec la Tyr52 du CDR2 et la Ser103 du CDR3 du nanobody. Or, le modèle TEM-1_C correspond à l'enzyme seule qui dérive du modèle de TEM-1_NB et, de ce fait, ces interactions entre l'Asp214 et la Val216 et l'Ala217 ne sont pas observées car l'Asp214 se positionne exactement comme chez TEM-1_NB. La mobilité très élevée de la boucle Val chez TEM-1_C et l'amplification de ses mouvements peuvent donc s'expliquer par l'absence de ces liens. Ce modèle ne sera dès lors plus utilisé pour la poursuite de l'analyse.

Ces données suggèrent que la dynamique de la boucle Val doit être régulée et que cette régulation se ferait par l'intermédiaire de l'Asp214 qui, par l'établissement de diverses liaisons H, empêcherait cette boucle de prendre des configurations défavorables tout en lui permettant de conserver une certaine mobilité. Afin de tester l'exactitude de cette idée, la poursuite de cette étude s'est scindée en quatre points qui consistent en divers calculs et mesures sur les résultats des modélisations de TEM-1_A (identiques à ceux de TEM-1_B) et TEM-1_NB, à savoir : (1) comparaison du facteur B et du RMSF la boucle Val ; (2) détermination des liaisons H entre l'Asp214 et les autres résidus de TEM-1 ; (3) mesures de distances entre la chaîne latérale de l'Asp214 avec la Val216 et l'Ala217 ; et (4) mesures du RMSD de la boucle Val, de la Val216 et de l'Asp214.

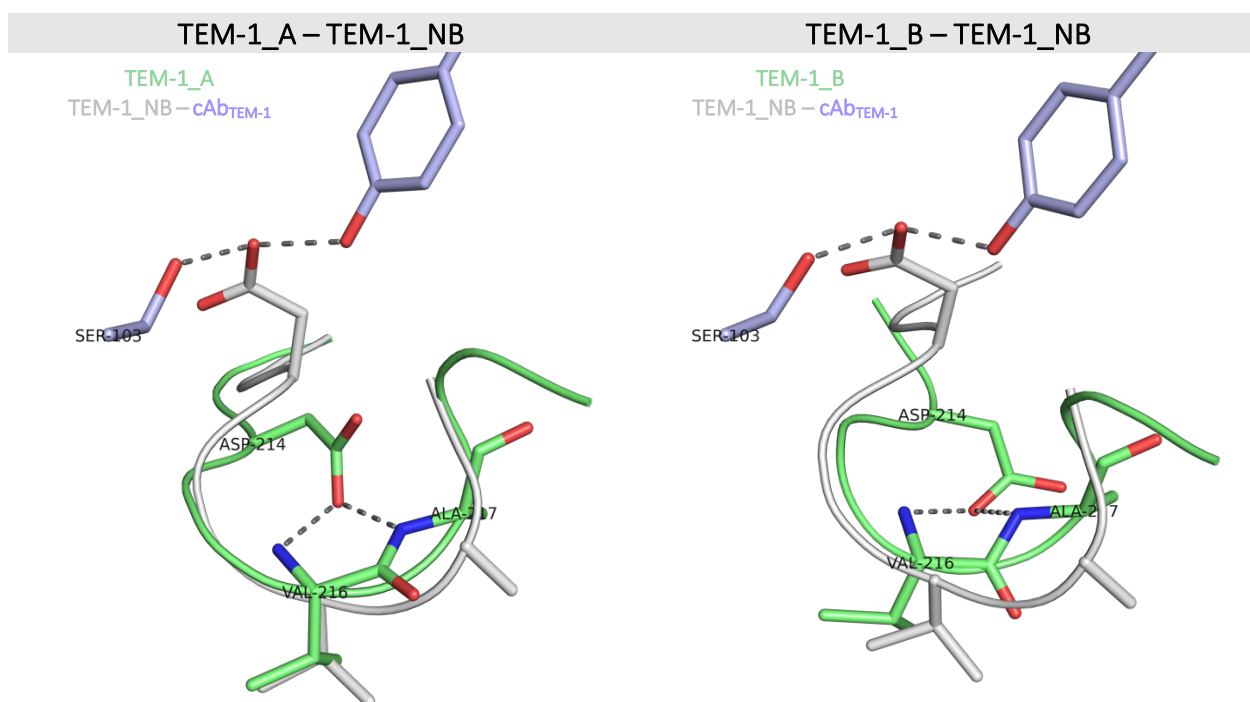


Figure 31. Comparaison de la conformation de l'Asp214 et de ses liaisons H entre TEM-1_A (vert) et TEM-1_NB (TEM-1 en gris et cAb_{TEM-1} en bleu).

Figure 32. Comparaison de la conformation de l'Asp214 et de ses liaisons H entre TEM-1_B (vert) et TEM-1_NB (TEM-1 en gris et cAb_{TEM-1} bleu).

1.3.4.2. Comparaison du facteur B et du RMSF de la boucle Val

En cristallographie des protéines, le facteur B est assimilé aux mouvements vibratoires relatifs des diverses portions de la structure protéique. Les atomes présentant un faible facteur B appartiennent à une partie de la structure bien ordonnée et inversement, ceux caractérisés par un facteur B élevé se retrouvent dans une zone très flexible. Son équivalent en dynamique moléculaire est le RMSF.

Le facteur B a été calculé pour les modélisations de TEM-1_A et de TEM-1_NB présentant le RMSF de la Val216 le plus élevé. De cette façon, les données présentées ci-dessous mettent en évidence les différences entre les mouvements maximums observés chez TEM-1 seul et complexé. Le facteur B de TEM-1_A et de TEM-1_NB est représenté respectivement aux figures 33 et 34, où l'épaisseur et l'échelle de couleur représentent la grandeur du facteur B. Plus la structure est épaisse, plus le facteur B est élevé et plus la portion protéique considérée est dynamique et inversement. L'échelle de couleur, quant à elle, va du bleu, qui représente un facteur B nul, au rouge, qui correspond à la valeur maximale du facteur B, en passant par le blanc. Ces figures indiquent clairement que la dynamique de la Val216 est beaucoup plus importante chez la forme seule TEM-1_A, caractérisée par une structure plus épaisse à cet endroit de la boucle et une coloration oscillant vers le blanc/rouge. Par contre, chez le complexe, la structure est beaucoup plus fine avec une coloration virant davantage vers le bleu (figure 35). Ces résultats démontrent que, même pour la modélisation la plus dynamique du complexe, le facteur B est resté relativement petit, ce qui témoigne d'un mouvement d'une amplitude beaucoup plus faible que pour la forme simple. Pour terminer, il est intéressant de noter que la stabilité de l'Asp214 semble rester relativement identique entre les deux formes, l'épaisseur et la couleur du facteur B étant les mêmes (figure 35).

Le graphique 13, qui représente la superposition des RMSF de la boucle Val de TEM-1_A et TEM-1_NB pour ces modélisations (et non plus pour la moyenne de toutes les modélisations comme c'était le cas au graphique 10) valide ces observations : les RMSF des résidus de la boucle Val de TEM-1_NB sont bien plus faibles que ceux de TEM-1_A, à l'exception de la Gly218, alors qu'il s'agit des modélisations caractérisées par le mouvement le plus élevé.

Ces données terminent donc de confirmer la perte de la dynamique et la rigidification de la boucle Val suite à la présence du nanobody cAb_{TEM-1}. Cette rigidification pourrait s'expliquer par l'établissement des liaisons H entre le CDR2 et le CDR3 du nanobody avec des résidus de la boucle, mais également avec ceux qui entourent cette dernière. Seule la dynamique de l'Asp214 demeure constante et très faible.

TEM-1_A

Facteur B nul – structure fine
Facteur B de valeur intermédiaire (blanc)
Facteur B maximal – structure épaisse

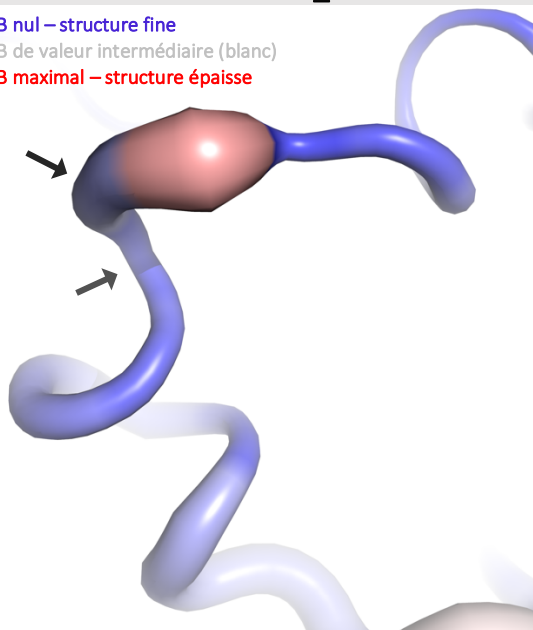


Figure 33. Représentation du facteur B de la boucle Val chez TEM-1_A. Plus la structure est épaisse et plus le facteur B est élevé. Le rouge représente une valeur élevée du facteur B et le bleu, une valeur faible. La flèche noire montre la position de la Val216, la grise, celle de l'Ala217.

TEM-1_NB

Facteur B nul – structure fine
Facteur B de valeur intermédiaire (blanc)
Facteur B maximal – structure épaisse

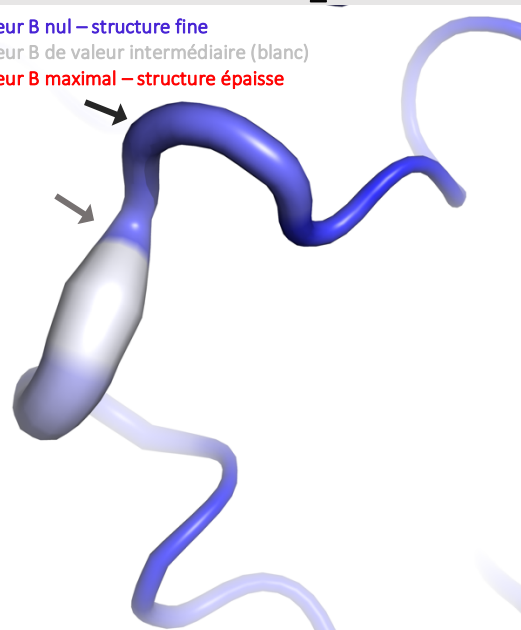


Figure 34. Représentation du facteur B de la boucle Val chez TEM-1_NB. Plus la structure est épaisse et plus le facteur B est élevé. Le bleu représente une valeur faible du facteur B élevé et le blanc, une valeur intermédiaire. La flèche noire montre la position de la Val216, la grise, celle de l'Ala217.

Comparaison TEM-1_A et TEM-1_NB

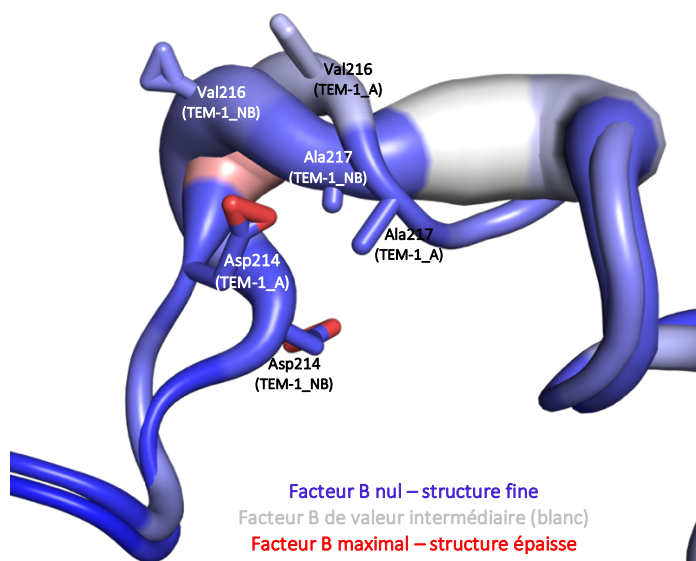
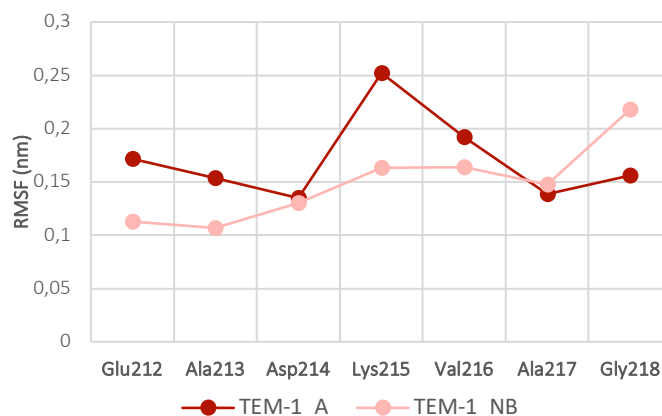


Figure 35. Superposition des facteurs B de TEM-1_A et de TEM-1_NB. La structure avec la couleur rouge correspond à TEM-1_A et celle avec la couleur bleue, TEM-1_NB. L'Asp214, la Val216 et l'Ala217 ont été représentées en stick.



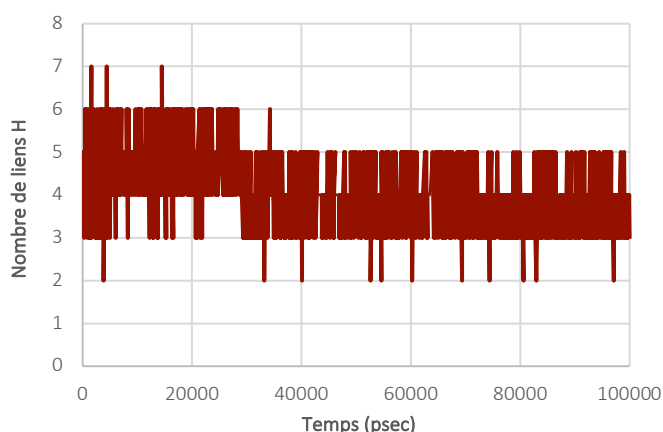
Graphique 13. Évolution du RMSF (nm) des résidus de la boucle Val (Glu212 – Gly218) de TEM-1_A (simulation md3, rouge) et de TEM-1_NB (simulation md1, rose).

1.3.4.3. Détermination des liaisons H

Afin de visualiser la contribution de l'Asp214 dans la régulation de la boucle Val, l'ensemble des liaisons H que ce résidu est capable d'établir avec le reste de la protéine TEM-1 a été calculé et visualisé pour TEM-1_A et TEM-1_NB (graphiques 14 et 15 ; figures 36 et 37). Les résultats démontrent très clairement un nombre élevé de liens H (en moyenne cinq) entre l'Asp214 et le reste de la protéine pour le modèle TEM-1_A, impliquant exclusivement sa chaîne latérale. Parmi ces interactions, se retrouvent celles établies avec l'azote des fonctions amides peptidiques de la Val216 et de l'Ala217, auxquelles viennent s'ajouter les ponts réalisés avec la Lys215 et la Lys234. La chaîne principale de l'Asp214, quant à elle, n'est impliquée dans aucune interaction. Néanmoins, dans le cadre du complexe TEM-1_NB, l'interaction de l'Asp214 avec la Tyr52 du CDR3 et la Ser103 du CDR3 du nanobody engendre une forte diminution du nombre de liens H avec les autres résidus de l'enzyme : en moyenne une liaison est observée et se fait entre les chaînes principales de l'Asp214 et de la Gly218.

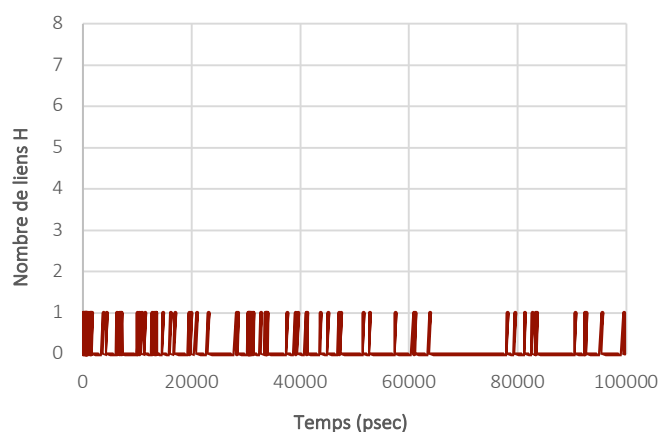
Ainsi, l'Asp214 de TEM-1 est à l'origine d'un grand nombre de liens H, qui s'établissent par le biais de sa fonction carboxylique, notamment avec la Val216 et l'Ala217. Ces interactions apparaissent comme essentielles pour la régulation et la stabilité de ces résidus et, de manière générale, de l'ensemble de la boucle Val, tout en assurant une certaine flexibilité plus que vraisemblablement nécessaire à une activité correcte de l'enzyme. Cela se voit sur la figure 36 où la Val216, avec sa chaîne latérale, semble « tirée » hors du site actif grâce au pont réalisé avec l'Asp214. En revanche, l'Asp214 de l'enzyme complexée n'établit plus de liens avec la Val216 et l'Ala217. L'absence de ces interactions explique très probablement la dynamique très élevée de la boucle Val du modèle TEM-1_C (dérivé du complexe TEM-1_NB), laquelle pourrait se retourner sans problème. L'absence de régulation de la boucle Val, la rigidification suite à l'interaction de TEM-1 avec le nanobody cAb_{TEM-1} ainsi que la répulsion de la boucle Val dans le site actif suite à la proximité du CDR3 pourraient donc vraisemblablement jouer un rôle dans l'inhibition.

TEM-1_A



Graphique 14. Évolution du nombre de liaisons H entre l'Asp214 et les autres résidus de l'enzyme TEM-1 pour le modèle TEM-1_A en fonction du temps (psec). En moyenne cinq liaisons sont observées.

TEM-1_NB



Graphique 15. Évolution du nombre de liaisons H entre l'Asp214 et les autres résidus de l'enzyme TEM-1 pour le modèle TEM-1_NB en fonction du temps (psec). En moyenne une liaison est observée.

TEM-1_A

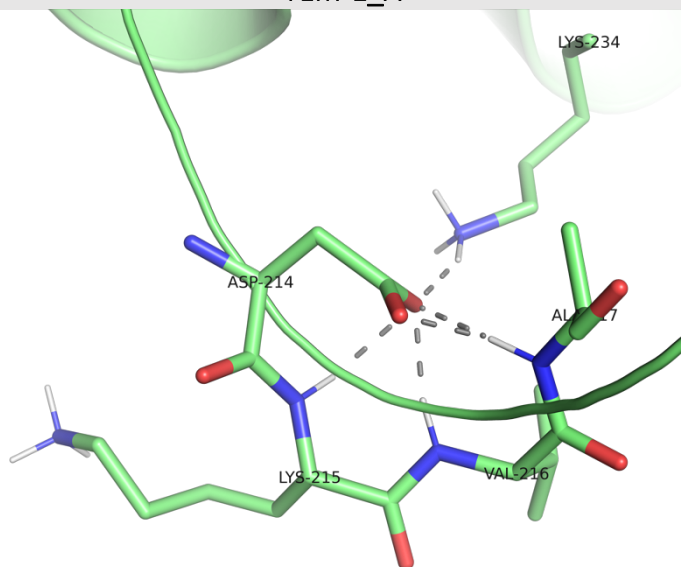


Figure 36. Représentation des liaisons H entre l'Asp214 et les autres résidus de l'enzyme TEM-1 pour le modèle TEM-1_A.

TEM-1_NB

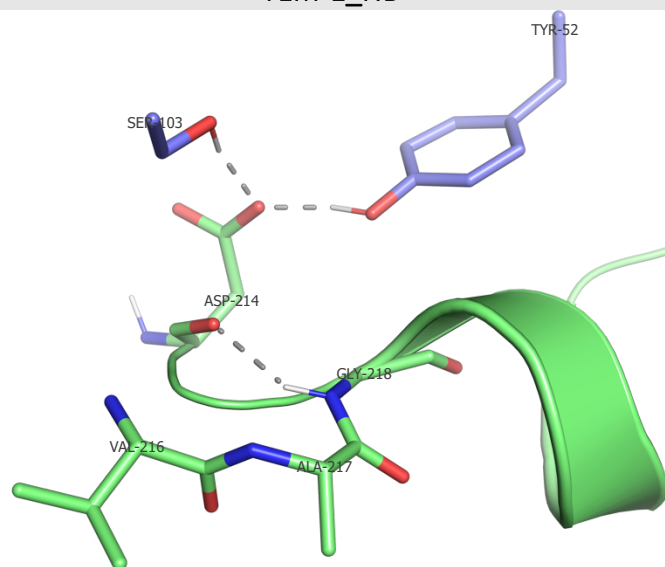
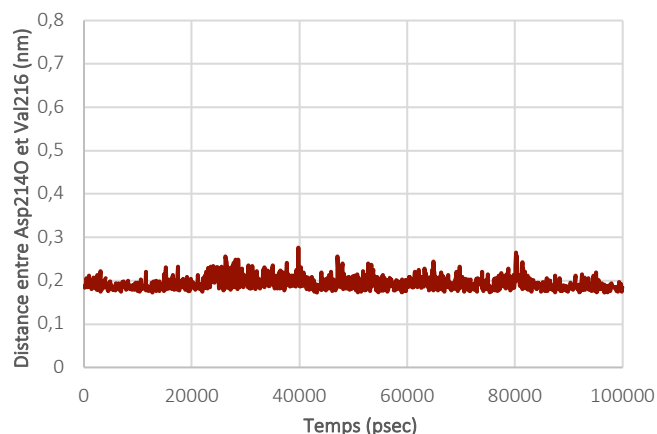


Figure 37. Représentation des liaisons H entre l'Asp214 et les autres résidus de l'enzyme TEM-1 pour le modèle TEM-1_NB (TEM-1 en vert et le nanobody en bleu)

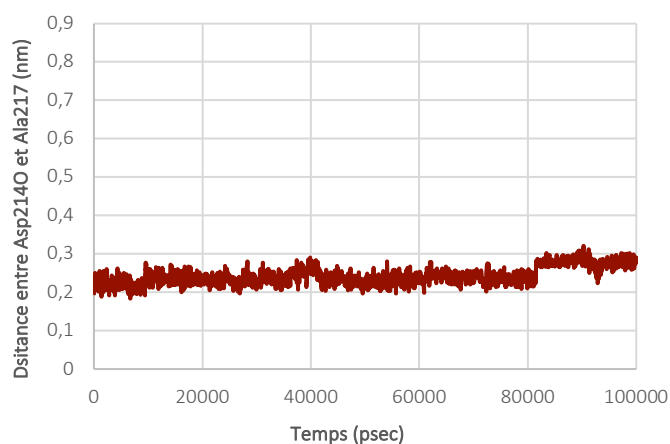
1.3.4.4. Mesures de distances

Les distances entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et l'azote des fonctions peptidiques de la Val216 et de l'Ala217 ont été mesurées pour les cinq modélisations des modèles TEM-1_A (graphiques 16 et 17, figure 38) et TEM-1_NB (graphiques 18 et 19, figure 39). Ces résultats témoignent d'un accroissement considérable de ces deux distances chez l'enzyme complexée par rapport à la forme seule. En effet, la distance entre la fonction carboxylique de l'Asp214 et la Val216 est de 2 Å en moyenne chez TEM-1_A, alors qu'elle s'élève à un peu plus de 6 Å chez TEM-1_NB. La tendance est similaire pour la distance entre la fonction carboxylique de l'Asp214 et l'Ala217 : elle passe de 2.5 Å en moyenne chez TEM-1_A à 7 Å chez TEM-1_NB. Cette augmentation peut s'expliquer par la réorientation de la chaîne latérale de l'Asp214 qui, en présence du nanobody, se retourne pour interagir avec la Tyr52 et la Ser105 de ce dernier (figure 29), et s'éloigne ainsi considérablement de la Val216 et de l'Ala217. Ces observations se superposent parfaitement avec celles décrites au point précédent sur la disparition des ponts H entre l'Asp214 et la Val216/Ala217 en présence du nanobody. En effet, puisque l'Asp214 se retourne et que la distance avec ces deux résidus s'accroît, les liaisons H ne peuvent plus s'établir. Les graphiques 20 et 21 quantifient cette observation : ils montrent que lorsque la distance entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et la Val216 diminue, une liaison H apparaît entre ces deux résidus. Ces données étant obtenues depuis le modèle TEM-1_A, cela signifie que, même chez l'enzyme seule, il arrive que l'Asp214 soit complètement retourné du côté opposé à la Val216 mais qu'une fois positionné de la sorte, il se réoriente rapidement pour se rapprocher des autres résidus de la boucle Val et reprendre ainsi sa position « normale » afin de pouvoir former les liens H avec la Val216 et l'Ala217. Cela met encore une fois en évidence l'importance de ces liens pour la régulation de la boucle Val et, ce faisant, pour l'enzyme.

TEM-1_A



Graphique 16. Évolution de la distance moyenne (nm) entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et la Val216 en fonction du temps (psec) pour les cinq simulations du modèle TEM-1_A.



Graphique 17. Évolution de la distance moyenne (nm) entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et l'Ala217 en fonction du temps (psec) pour les cinq simulations du modèle TEM-1_A.

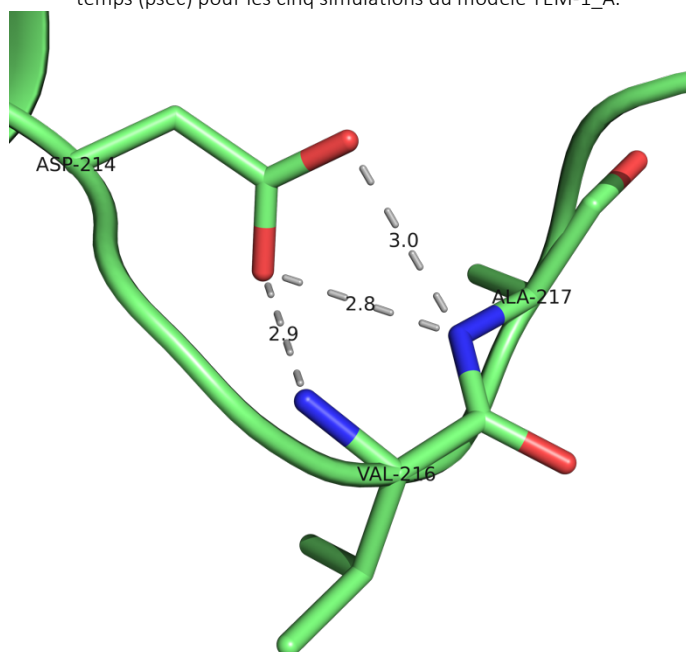
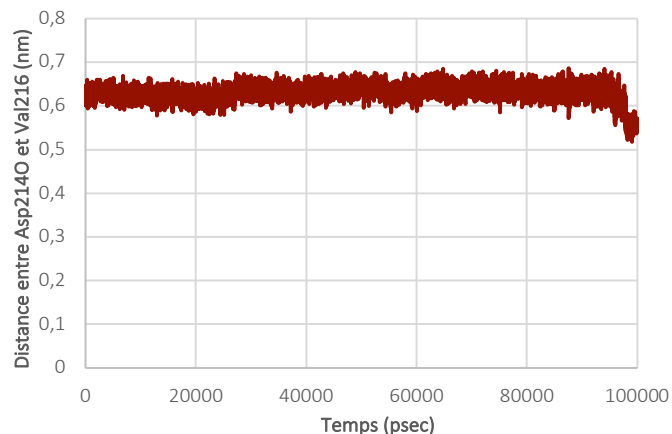
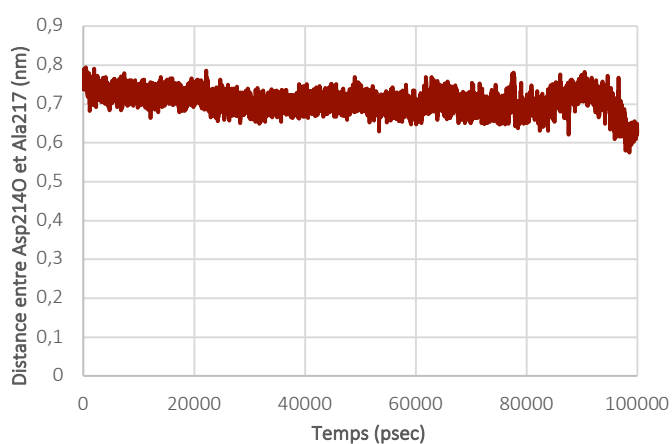


Figure 38. Mesures des distances entre la fonction carboxylique de l'Asp214 et les fonctions amines des chaînes principales de la Val216 et de l'Ala217 du modèle TEM-1_A.

TEM-1_NB



Graphique 18. Évolution de la distance moyenne (nm) entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et la Val216 en fonction du temps (psec) pour les cinq simulations du modèle TEM-1_NB.



Graphique 19. Évolution de la distance moyenne (nm) entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et l'Ala217 en fonction du temps (psec) pour les cinq simulations du modèle TEM-1_NB.

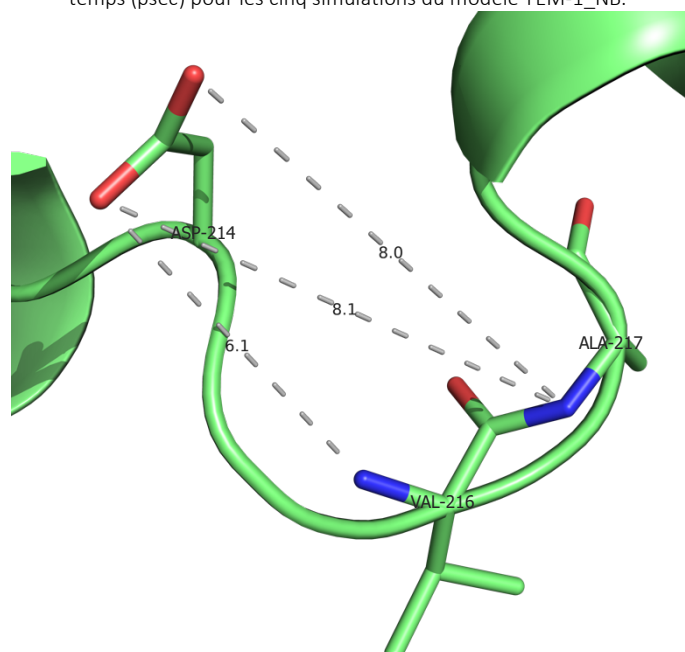
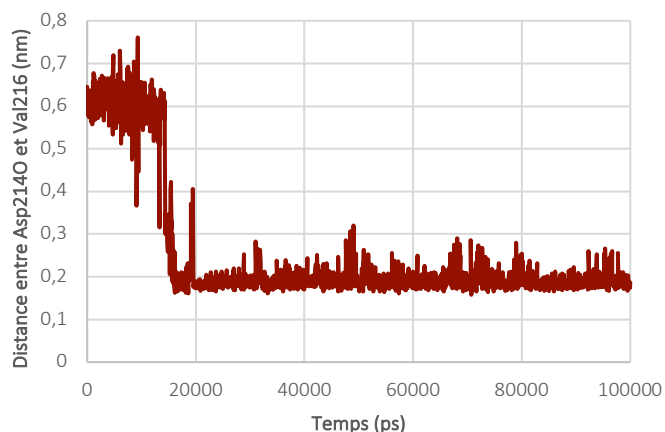
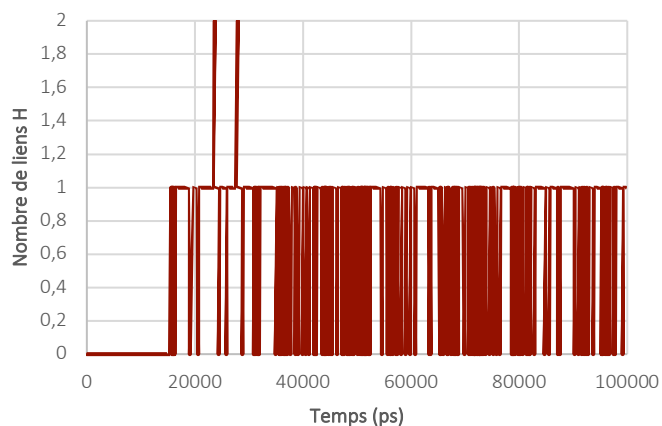


Figure 39. Mesures des distances entre la fonction carboxylique de l'Asp214 et les fonctions amines des chaînes principales de la Val216 et de l'Ala217 chez du modèle TEM-1_NB.

TEM-1_A



Graphique 20. Évolution de la distance moyenne (nm) entre l'oxygène de la fonction carboxylique de l'Asp214 et la Val216 en fonction du temps (psec) pour la première simulation du modèle TEM-1_A.



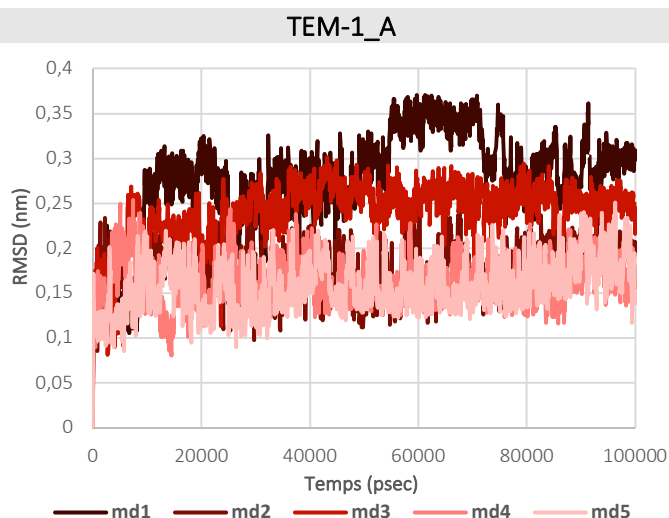
Graphique 21. Évolution du nombre de liaisons H entre l'Asp214 et la Val216 en fonction du temps (psec) pour la première simulation du modèle TEM-1_A.

1.3.4.5. Mesures du RMSD

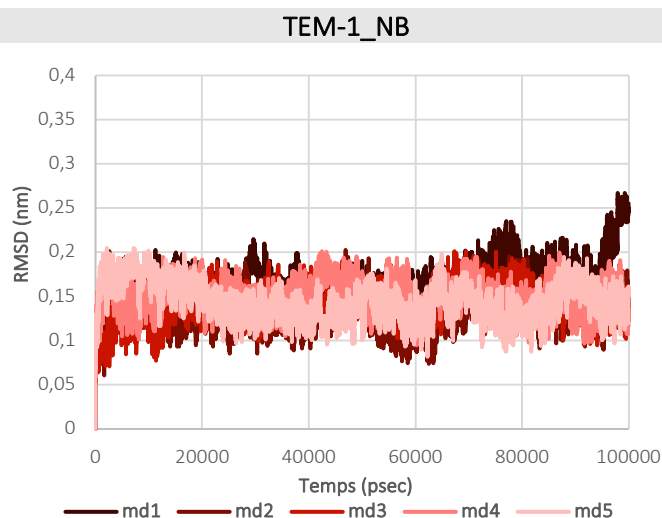
Pour terminer, les mouvements de la boucle Val, de la Val216 et de l'Asp214 de TEM-1_A et de TEM-1_NB ont été étudiés par l'intermédiaire de la mesure du paramètre RMSD (tableau 9). Ces mesures montrent que, comme pour les RMSF, la boucle Val ainsi que la Val216 sont beaucoup plus mobiles chez TEM-1_A par rapport au complexe, malgré la présence de nombreuses liaisons H entre l'Asp214 et la Val216 et l'Ala217. En effet, dans les deux cas, une diminution du RMSD et des écart-types plus élevés d'un point de vue relatif sont observés suite à l'introduction du nanobody. Même si cet accroissement de mobilité est moins marqué pour la boucle Val que pour la Val216 seule, la valeur très élevée de l'écart-type du RMSD de la boucle indique clairement un mouvement qui varie fortement d'une modélisation à l'autre, comme illustré par les graphiques 22 et 23 qui montrent que les données de TEM-1_NB sont plus faibles et surtout regroupées entre elles par rapport à celles de TEM-1_A, qui présentent une dispersion beaucoup plus importante. À l'inverse, la mobilité de l'Asp214 est très faible dans les formes simples et complexées, les RMSD et les écarts-types ne variant que très peu entre celles-ci (tableau 9). Cette forte stabilité concerne évidemment le résidu une fois qu'il a atteint sa conformation finale, c'est-à-dire lorsqu'il interagit avec la Val216 et l'Ala217 chez TEM-1 ou avec la Tyr52 et la Ser105 chez TEM-1_NB, et non pas lors du passage d'une forme à une autre. Elle peut très certainement être expliquée par le nombre important de liaisons H qu'il établit, que ce soit avec d'autres résidus de TEM-1_A ou avec le nanobody chez TEM-1_NB. De plus, le fait que l'Asp214 de TEM-1_A présente une si grande stabilité démontre l'importance de l'ensemble des interactions auxquelles il participe, notamment avec la Val216 et l'Ala217, et donc de son rôle pour la régulation et l'apport d'une certaine stabilité à la boucle Val.

	RMSD boucle Val (Å)	RMSD Val216 (Å)	RMSD Asp214 (Å)
TEM-1_A	0.2033 ± 0.0524	0.1221 ± 0.0120	0.0637 ± 0.0175
TEM-1_NB	0.1483 ± 0.0125	0.0575 ± 0.0118	0.0573 ± 0.0076

Tableau 9. Valeur moyenne de RMSD (en Å) de la boucle Val (Glu212 – Gly218), de la Val216 et de l'Asp214.



Graphique 22. Évolution du RMSD (nm) de la boucle Val (Glu212-Gly218) des cinq simulations de TEM-1_A en fonction du temps (psec).



Graphique 23. Évolution du RMSD (nm) de la boucle Val (Glu212-Gly218) des cinq simulations de TEM-1_NB en fonction du temps (psec).

2. Partie expérimentale : l'étude de relaxation par RMN

Remarque préliminaire : l'étude de relaxation que je devais réaliser n'a pas pu être effectuée au vu de la situation actuelle (pandémie de SARS-CoV-2). Certaines données avaient cependant été obtenues antérieurement à mon mémoire. Elles sont présentées à la suite de ce chapitre afin de pouvoir être plus facilement articulées à la théorie de la relaxation tout en évitant de surcharger l'introduction. Ce chapitre n'est donc pas structuré traditionnellement en « matériel et méthodes » ni en « résultats » puisque je n'en suis pas l'auteure. Néanmoins, les résultats préliminaires demeurent intéressants à exposer au vu de la contribution future qu'ils pourraient apporter à cette étude de dynamique et qu'ils donnent une idée du travail qui a été fait et qui reste à effectuer.

2.1. Pourquoi faire de la relaxation ?

Les résultats de MD étant à la fois prometteurs et intéressants, ils dérivent toutefois d'une suite d'algorithmes ; l'idéal serait donc de les combiner avec des résultats expérimentaux. Un certain nombre de méthodes permettant d'étudier la mobilité et la dynamique des protéines a déjà été cité dans l'introduction, avec notamment la spectroscopie de fluorescence et la RMN. Dans le cadre cette étude sur l'impact du nanobody cAb_{TEM-1} sur la dynamique de la boucle Val de TEM-1, c'est cette dernière technique, et plus particulièrement la relaxation du spin nucléaire (NSR), qui a été choisie pour accompagner la MD du fait des atouts qu'elle présente. En effet, la RMN fournit des informations détaillées sur des mouvements protéiques internes sur une échelle de temps très vaste, allant de la psec à la journée.⁽⁴²⁾ Des changements minimes de dynamique peuvent également être détectés, ce qui fait de la RMN un outil particulièrement intéressant pour cette étude.⁽³⁷⁾ Il est par contre plus difficile d'obtenir des données structurales précises sur des mouvements internes avec cette technique, mais cette lacune peut être comblée par la MD, grâce à laquelle chaque atome peut être positionné très précisément.⁽³⁷⁾⁽⁴¹⁾ Ces deux méthodes sont donc entièrement complémentaires. Les analyses de relaxation sont effectivement plus fiables mais contiennent des erreurs provenant du sur- ou sous-ajustement des données lors de la sélection d'un modèle, qui est un processus relativement délicat : il est parfois impossible de discriminer deux modèles (ou plus) lorsque ces derniers correspondent tous aux données expérimentales. Néanmoins, ces erreurs peuvent être corrigées par la MD car les mouvements observés avec cette technique permettent d'éliminer certains modèles, ce qui conduit à une amélioration des résultats finaux.⁽⁴¹⁾

2.2. Éléments de théorie

2.2.1. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique qui exploite les propriétés magnétiques intrinsèques des atomes présentant un spin nucléaire : elle observe les transitions entre deux niveaux énergétique très proches d'un noyau suite à l'interaction entre son aimantation naturelle (spin) avec un champ magnétique externe.⁽⁴¹⁾⁽⁵²⁾

En biologie structurale, elle est fortement utilisée pour la détermination de structures moléculaires.⁽⁵²⁾ Dans le cadre de l'étude des protéines, les noyaux visualisables par RMN sont les isotopes qui présentent un spin non-nul, c'est-à-dire le ^1H , le ^{13}C , le ^{15}N et le ^{31}P , pour lesquels le spin vaut $\frac{1}{2}$, ainsi que le deutérium ^2H , dont le spin vaut 1.⁽⁴¹⁾ L'enrichissement isotopique de certaines positions, voire de l'ensemble d'une protéine, n'induit aucune modification chimique et fait de ces isotopes des sondes site-spécifique utilisables pour des études structurales et dynamiques, où des changements minimes peuvent être visualisés.⁽⁴¹⁾ À titre d'exemple, le marquage d'une protéine de 200 à 300 AA au ^{15}N ou au ^{13}C permet d'établir le profil dynamique de l'ensemble de son squelette peptidique ; et un marquage spécifique, particulièrement au niveau des fonctions méthyls, rend possible la caractérisation de complexes macromoléculaires de très haute masse (jusqu'à 1 MDa) !⁽³⁴⁾

2.2.2. La relaxation du spin nucléaire (NSR)

En combinaison avec un marquage isotopique au ^{15}N , la RMN permet d'analyser des variations temporelles de structures à une résolution atomique. La technique principalement utilisée pour de telles analyses est la relaxation du spin nucléaire (NSR), qui se fait au moyen de la mesure de différentes paramètres.⁽³⁷⁾ De manière générale, la relaxation en RMN correspond au processus de retour à l'équilibre, par transfert d'énergie, d'un ensemble de spins nucléaires après perturbation.⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾ La NSR, quant à elle, est une méthode qui permet de construire un modèle de la dynamique d'une protéine à une échelle de temps allant de la psec à la nsec.⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾ Les mouvements atomiques aléatoires se déroulant à des temps de cet ordre entraînent des variations au niveau des interactions magnétiques. Ces interactions sont à l'origine des transitions de spins nucléaires qui, elles, tentent de ramener le système à l'état d'équilibre.⁽⁵²⁾ Ces mouvements sont assez divers et incluent notamment les rotations des chaînes latérales ainsi que les mouvements des boucles.⁽³⁷⁾

La relaxation en RMN peut se diviser en diverses composantes, dont les relaxations longitudinale et transversale. La relaxation longitudinale correspond au processus de retour à l'équilibre de l'aimantation en suivant la direction du champ magnétique extérieur B_0 . La relaxation transversale, quant à elle, correspond au processus de déphasage de la magnétisation des spins dans le plan perpendiculaire à la direction du champ magnétique extérieur B_0 . Chacune de ces relaxations est définie par un temps caractéristique : ce sont les temps de relaxation longitudinale T_1 et de relaxation transversale T_2 .⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾ Ils

sont systématiquement mesurés lors d'une étude NSR, soit au niveau des chaînes latérales, soit au niveau du squelette de la protéine. Les taux de relaxation longitudinale R_1 et transversale R_2 peuvent également être retrouvés dans la littérature : ils sont définis comme l'inverse de respectivement T_1 et T_2 .⁽⁴³⁾⁽⁵²⁾ Une information dynamique sur un large panel de mouvements peut être obtenue par la mesure de ces temps. En effet, la valeur de T_1 donne des informations sur une mobilité se déroulant de 10 nsec à 1 psec alors que celle de T_2 dépend à fois de la dynamique à cette échelle de temps et de celle allant de la μ sec à la msec.⁽⁴²⁾

Un troisième paramètre caractéristique évalué lors d'une étude NSR est le « *heteronuclear nuclear Overhauser effect* » (hnNOE). Le hnNOE résulte d'un transfert de la polarisation entre les spins de deux noyaux différents suite à leur interaction spatiale.⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾ On parle de relaxation croisée qui, en modifiant les populations des états fondamental et excité, modifie la relaxation. Comme le transfert de polarisation dépend du temps de corrélation local, la mesure du hnNOE fournit des informations sur la dynamique locale. D'un point de vue expérimental, ce transfert de polarisation est effectué d'un ^1H vers un ^{15}N ou un ^{13}C auquel il est directement attaché. Tout comme T_1 et T_2 , il peut donc être mesuré pour des sites ^{15}N et ^{13}C sur le backbone et sur les chaînes latérales. Pour détecter cet effet, la distance interatomique doit être inférieure à 7 Å.⁽⁵³⁾ En conséquence, le hnNOE est fortement utilisé pour la détermination de structures en RMN par la mesure des différences de distances interprotoniques⁽⁴³⁾, bien qu'il serve également lors d'études dynamiques par NSR, notamment pour la détermination du temps de corrélation τ_C .⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾ Ce dernier, calculé grâce à la combinaison mathématique des R_1 , R_2 et du hnNOE, correspond à la diffusion à la diffusion rotationnelle, c'est-à-dire au temps moyen nécessaire pour qu'un ensemble de molécules puisse tourner d'un radian.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾ Le terme « moyen » est important : il s'agit en effet d'une valeur statistique puisque, dans l'échantillon, la distribution de mouvements est hétérogène. Sa valeur est liée à la taille moléculaire : plus la taille augmente, et donc plus le mouvement de la molécule est lent, plus τ_C augmente.⁽⁵³⁾

La combinaison mathématique des R_1 , R_2 et du hnNOE permet également de déterminer le paramètre d'ordre S^2 .⁽³⁷⁾⁽⁵³⁾ Il peut être interprété comme le degré de restriction spatiale de la liaison NH de la fonction peptidique et permet de caractériser l'amplitude des mouvements se déroulant de la psec à la nsec.⁽⁴¹⁾ Il peut être calculé pour l'entièreté de la protéine (paramètre d'ordre global) ou pour seulement certaines parties de celle-ci (paramètre d'ordre local). Sa valeur varie entre 0 et 1 : plus elle est élevée, plus la protéine est ordonnée et, inversement, plus elle est faible, plus l'amplitude des mouvements internes est importante. La valeur de S^2 est typiquement comprise entre 0.80 et 0.90 pour des régions structurées de protéines correctement repliées.⁽⁴²⁾

2.2.3. L'attribution : un préliminaire indispensable à la NSR

Une étude NSR nécessite que l'ensemble des résonances NH peptidiques ait été préalablement attribué, c'est-à-dire qu'une corrélation ait été établie entre les signaux d'un spectre RMN et les atomes de la protéine.⁽⁴²⁾⁽⁵³⁾ Dans le cadre de ce projet, quatre attributions sont nécessaires : celle de TEM-1, celle du complexe TEM-1_NB, celle de TEM-121 et celle du complexe TEM-121_C. En effet, l'introduction d'une structure aussi volumineuse que le nanobody (14 kDa) induit d'importantes modifications au niveau des spectres. Le déplacement chimique de la plupart des résidus se trouve modifié d'une manière si importante que l'attribution des protéines TEM-1 et TEM-121 n'aide que relativement peu, voire pas du tout, celle des deux complexes, ce qui justifie le besoin d'effectuer quatre attributions différentes.

L'attribution d'une protéine nécessite qu'elle présente un enrichissement isotopique en ^{15}N . Elle commence par l'acquisition de spectres à trois dimensions (3D) de type ^{15}N -TOCSY et ^{15}N -NOESY. Les expériences TOCSY et NOESY permettent de corréler les NH peptidiques aux protons connectés respectivement par des liaisons chimiques ou au travers de l'espace.⁽⁵⁵⁾ Malgré la combinaison de ces spectres, le processus d'attribution se complexifie grandement avec la taille moléculaire de la protéine : lorsque celle-ci s'accroît, les signaux se multiplient et s'élargissent. Afin de pallier cette difficulté, l'attribution est généralement effectuée par le biais d'expériences RMN impliquant le ^{15}N et ^{13}C . En effet, le fait de disposer d'une protéine qui soit entièrement marquée au ^{15}N et au ^{13}C permet d'attribuer des molécules allant jusqu'à 30 kDa. Finalement, la deutération peut constituer une dernière alternative, notamment pour des protéines contenant plus de 250 résidus.⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾

L'attribution du backbone d'une protéine est un processus séquentiel où un noyau est positionné d'une manière relative à ses voisins en utilisant l'information de la séquence peptidique obtenue par le biais de diverses expériences RMN, incluant les expériences de type HNC (hydrogène – azote – carbone).⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾ L'expérience HNCA est une expérience où les déplacements chimiques du ^1H et du $^{15}\text{N}(\text{H})$ de la fonction amide de la liaison peptidique sont corrélés aux $^{13}\text{C}\alpha$ de l'AA considéré et celui du précédent ($\text{H} \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{C}\alpha$) (figure 40).⁽⁵⁴⁾ Le HNCO suit la même logique mais pour le CO de la fonction peptidique. Le HNCACB est une expérience pour laquelle le déplacement chimique du $^{15}\text{N}(\text{H})$ est corrélé à celui des $^{13}\text{C}\alpha$ et $^{13}\text{C}\beta$ de l'AA considéré et du précédent ($\text{HN} \rightarrow \text{C}\alpha \rightarrow \text{C}\beta$) (figure 41).⁽⁵⁴⁾ Une autre expérience indispensable est le HN(CO)CACB où le déplacement chimique du $^{15}\text{N}(\text{H})$ est corrélé aux ^{13}CO , $^{13}\text{C}\alpha$ et $^{13}\text{C}\beta$ uniquement de l'acide aminé précédent (figure 42).⁽⁵⁴⁾

Généralement, le HNCACB, le HN(CO)CACB et le HSQC sont les trois expériences utilisées pour l'attribution du backbone d'une protéine. Les HNCA/HN(CO)CA et le HN(CA)CO/HNCO sont, quant à eux, plutôt utilisés lorsque le HNCACB et le HN(CO)CACB sont de mauvaise qualité, ce qui peut être le cas en présence de grosses protéines (> 150 AA) où le rapport signal/bruit est élevé.⁽⁵⁴⁾

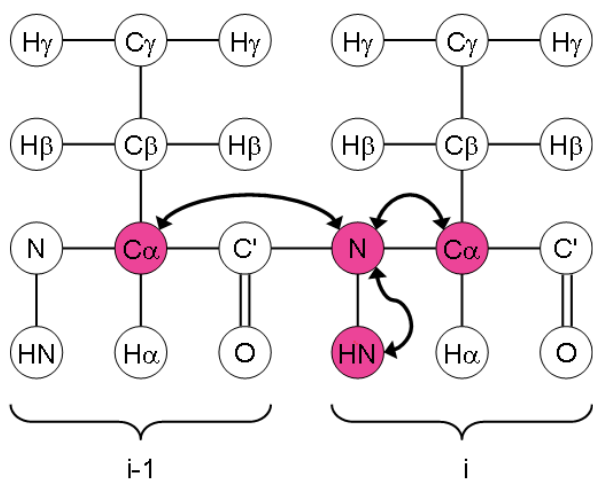


Figure 40. Représentation théorique du transfert de la magnétisation pour un spectre HNCA.

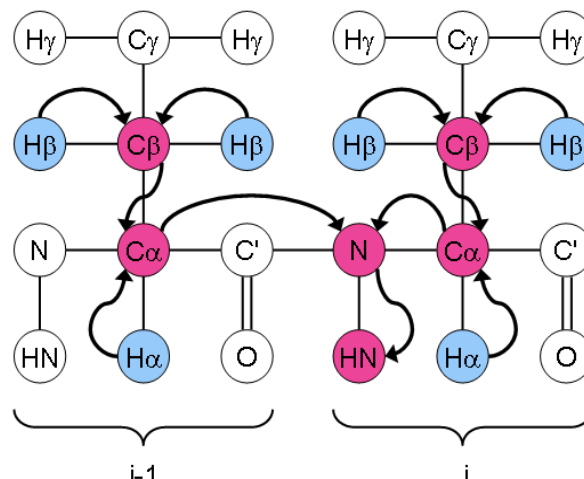


Figure 41. Représentation théorique du transfert de la magnétisation pour un spectre HNCACB.

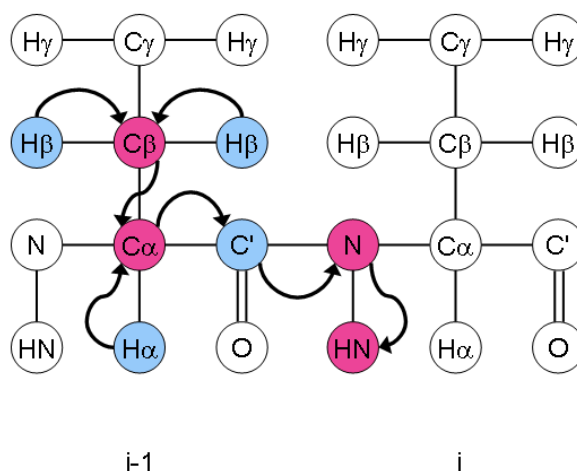


Figure 42. Représentation théorique du transfert de la magnétisation pour un spectre HN(CO)CACB.

2.3. Mise au point sur les avancées réalisées

2.3.1. Revue de la littérature

2.3.1.1. L'attribution de TEM-1

L'attribution de TEM-1 réalisée par Savard *et al.*⁽⁵⁶⁾ en 2003 a été effectuée par la méthode classique d'attribution séquentielle par le biais des expériences de corrélation HNC (HNCA/HN(CO)CA, HNCACB/HN(CO)CACB et HNCO/HN(CA)CO) en utilisant des échantillons marqués au ^{15}N , au ^{15}N - ^{13}C et au ^2H - ^{15}N - ^{13}C (tampon : NaPO_4 25 mM, imidazole 3.0 mM, pH 6.6). Elle est déposée dans la BMRB (« *Biological Magnetic Resonance Data Bank* », le référentiel contenant les données obtenues par la spectroscopie RMN sur les protéines, peptides, acides nucléiques et autres biomolécules) sous le numéro d'accès 6024. Le ^1H - ^{15}N -HSQC représentant l'attribution de TEM-1 est représenté à la figure 43. Les attributions manquantes sont les suivantes : $^{13}\text{C}'$ -Ser106, $^{13}\text{C}'$ -Ile173, $^{13}\text{C}\beta$ -Ser203, $^{13}\text{C}\alpha/^{13}\text{C}\beta$ -Lys215 et $^1\text{HN}/^{15}\text{N}$ -Ala237, où C' correspond au carbonyle peptidique. On note celle de la Lys215 qui fait partie la boucle Val.⁽⁵⁶⁾

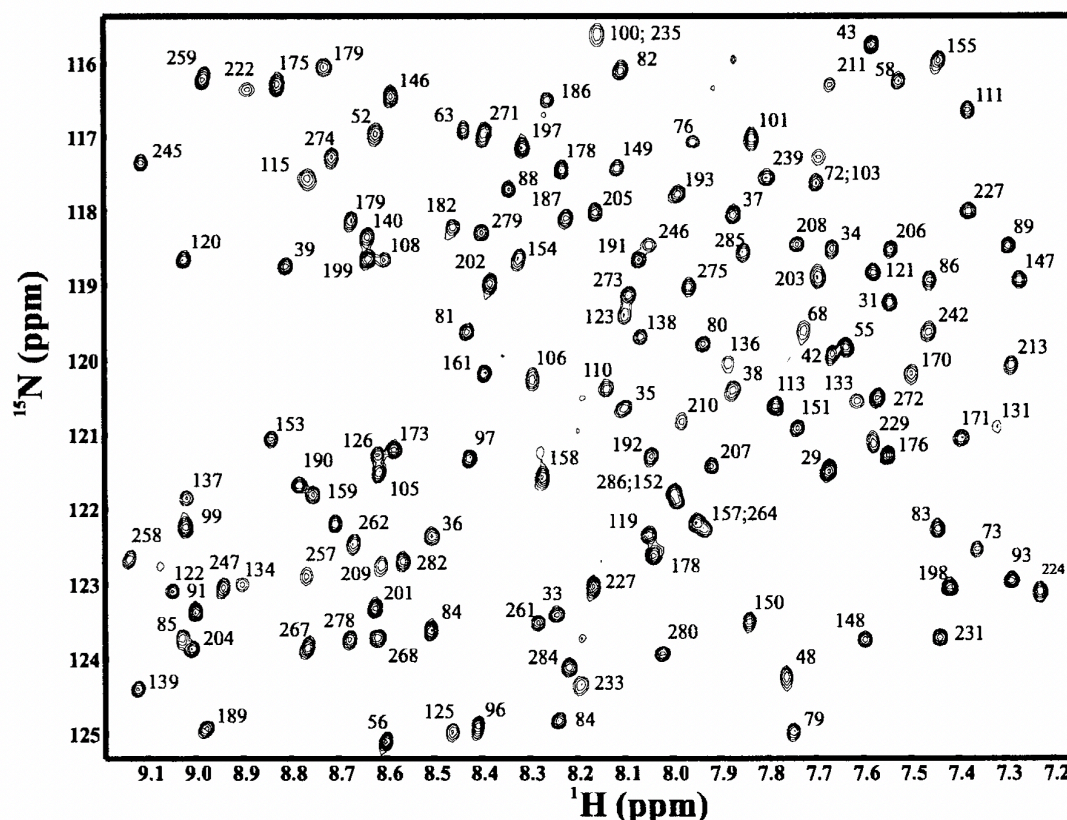


Figure 43. ^1H - ^{15}N -HSQC de TEM-1 effectué par Savard *et al.*⁽⁵⁷⁾
Numérotation : His26 – Trp288.

2.3.1.2. La relaxation de TEM-1

Les résultats de l'étude de relaxation de Savard *et al.*⁽⁴²⁾ montrent que TEM-1 est l'une des protéines les plus ordonnées étudiées par RMN liquide : elle est caractérisée par un S^2 moyen de 0.90 ± 0.02 – ce qui est exceptionnellement élevé. De manière générale, les hélices α et les feuillets β présentent les S^2 les plus grands et les boucles, les plus faibles. La valeur du S^2 des extrémités N-terminale et C-terminale de TEM-1 est également remarquablement importante. Ces résultats indiquent qu'en solution, cette enzyme est très ordonnée. En outre, certains résidus conservés du site actif situés à moins de 4 Å de la Ser70, comme le motif SDN ou la Lys234, présentent un S^2 supérieur à 0.94. Ceci signifie que le site actif est très ordonné à une échelle de temps de la psec à la nsec, ce qui pourrait indiquer, selon les auteurs, que ces résidus impliqués dans la catalyse sont correctement positionnés pour jouer leur rôle dès l'entrée d'un substrat.⁽⁴²⁾

Bien qu'à peine évoqués, les résidus de la boucle Val semblent présenter des caractères de relaxation particuliers. En effet, ni la Lys215 et la Val216 n'ont pu être détectées.⁽⁴²⁾ Présentée de la sorte, cette information pourrait sembler anodine ; or, nous avons rencontré les mêmes problèmes de détection lors du processus d'attribution de TEM-1. Les auteurs de l'étude les expliquent par des mouvements qui se dérouleraient dans le site actif lors de la liaison d'un ligand sur une échelle de temps allant de la μsec à la msec (et non pas de la nsec à la μsec).⁽⁴²⁾ Ces résultats s'approchent donc de ceux de la boucle Ω , aussi caractérisée par une mobilité plus lente. En effet, bien que son S^2 soit étonnamment élevé pour une boucle ($S^2 = 0.90 \pm 0.02$), les mesures des R_1 et R_2 témoignent d'une mobilité plus lente, de l'ordre de la μsec à

la msec. Ce temps est pourtant caractéristique au repliement de la protéine et au mouvement des hélices α et des feuillets β .⁽⁴²⁾ De plus, une seconde étude alliant MD et NSR montre d'importantes divergences entre les paramètres mesurés par chacune de ces techniques pour la boucle H9, composée des résidus 214 – 220 (incluant donc la boucle Val en N-terminal) et ces mêmes divergences sont observées pour la boucle Ω .⁽⁴¹⁾ Il semble donc que les deux boucles présentent une dynamique relativement similaire, bien les problèmes rencontrés pour la détection de la boucle Val ne se posent pas pour la boucle Ω . Sans compter que cette dernière est la cible d'une attention beaucoup plus importante que la première...

2.3.2. Première étape : l'attribution de TEM-1

Bien qu'elle soit disponible dans la littérature, la NSR de TEM-1 doit être remesurée pour TEM-1 dans le cadre de cette étude afin de servir de témoin pour celle du complexe TEM-1_NB. En effet, les mesures de relaxation dépendent d'un grand nombre de facteurs. De ce fait, il est relativement difficile de mesurer exactement les mêmes valeurs que celles décrites dans la littérature et les différences risquent d'être importantes. De plus, les données de relaxation sont interprétées avec plus de facilités par comparaison. Il est donc indispensable que les paramètres de relaxation soient déterminés chez TEM-1 avant de se pencher sur l'étude du complexe.

Toutes les étapes d'attribution ont été réalisées par Marius Wanko.

2.3.2.1. L'attribution par recherche d'un vecteur de translation

Afin d'éviter de devoir entièrement refaire l'attribution de TEM-1, préliminaire indispensable à l'étude de relaxation, il nous a semblé opportun d'utiliser les données provenant de l'attribution de TEM-1 disponible dans la BMRB (6024).⁽⁵⁶⁾ Ce transfert se base sur l'établissement d'un vecteur de translation déterminé par la comparaison entre les spectres 6024 et notre ¹⁵N-HSQC de TEM-1 (ci-après dénommé TEM-1_témoin). En effet, nos expériences ont été réalisées dans des conditions différentes (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7.2). De ce fait, des variations au niveau des déplacements chimiques sont attendues.

Malheureusement, cette translation n'a permis d'attribuer que 80 des 250 résidus de TEM-1, ce qui est largement insuffisant pour la suite de l'étude. De plus, les résidus de la boucle Val n'en faisaient pas partie. Pour terminer, les divergences entre les ¹⁵N-HSQC 6024 et TEM-1_témoin sont importantes : les déplacements chimiques varient très fortement et de manière singulière pour tous les résidus.

2.3.2.2. L'attribution par combinaison de ^{15}N -TOCSY et de ^{15}N -NOESY

Afin d'accroître le nombre de résidus attribués, des spectres 3D ^{15}N -TOCSY et ^{15}N -NOESY ont été réalisés sur l'échantillon ^{15}N -TEM-1. Le TOCSY permet de corréler les NH aux $\text{H}\alpha$ et d'identifier certains AA particuliers, comme la Gly, l'Ala, la Ser et la Thr (figure 44). Le NOESY, quant à lui, connecte le NH d'un résidu avec le $\text{H}\alpha$ du résidu précédent (figure 45). La combinaison de ces spectres est généralement utilisée pour l'attribution de protéines de taille petite à moyenne. Dans ce cas-ci, elle a permis d'identifier 50 résidus supplémentaires, ce qui porte le nombre total de résidus attribués à 130 sur 263, nombre toujours trop faible.

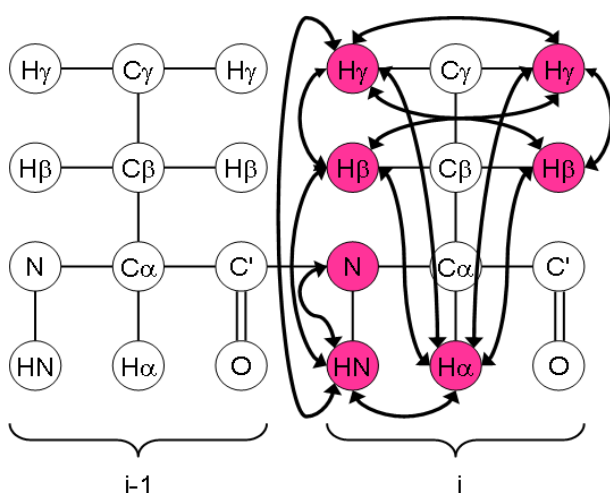


Figure 44. Représentation théorique du transfert de la magnétisation pour un spectre ^{15}N -TOCSY.

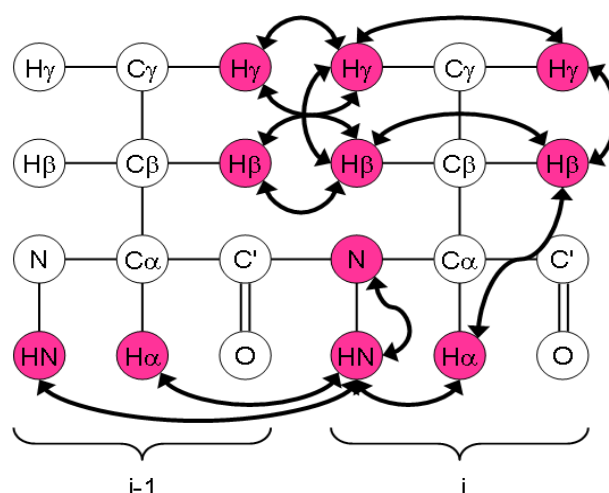


Figure 45. Représentation théorique du transfert de la magnétisation pour un spectre ^{15}N -NOESY.

2.3.2.3. L'attribution par utilisation d'expériences de type HNC

Afin de terminer l'attribution de toute la protéine TEM-1, l'utilisation d'expériences de type HNC s'est donc avérée nécessaire et a nécessité la production et la purification de l'enzyme TEM-1 doublement marquée au ^{13}C - ^{15}N . Bien qu'initialement non prévus, le double marquage et ces expériences s'avèrent en définitive judicieux car ils serviront de témoin pour le complexe TEM-1_NB pour lequel aucune attribution de référence n'est disponible pour ce dernier.

Grâce aux informations supplémentaires fournies par ces expériences, 213 résidus ont pu être attribués. Malheureusement, ni la Val216 ni l'Ala217 ne faisaient partie de ceux-ci.

2.3.2.4. L'acidification du tampon, une étape pour une meilleure résolution/sensibilité ?

L'Ala217 étant détectée sur le ^{15}N -HSQC 6024, l'idéal serait de se rapprocher des conditions expérimentales dans lesquelles ce dernier a été effectué. Puisqu'un changement de tampon est plus long à mettre en place, une acidification du pH a d'abord été envisagée, la spectroscopie RMN étant une technique très sensible aux variations de ce paramètre. Le pH du tampon HEPES de l'échantillon ^{15}N -TEM-1 a donc été abaissé de 7.2 à 6.6 par ajout de DCl. La comparaison entre les ^{15}N -HSQC des échantillons de TEM-1_témoin

à pH 7.2 et à pH 6.6 montre une augmentation de la sensibilité de détection lorsque le pH est plus acide suite à une vitesse d'échange chimique réduite. De ce fait, certains signaux, non détectés à pH 7.2, se précisent et de nouveaux apparaissent, notamment à la fréquence où l'Ala217 est attendue.

Sur base de l'attribution 6024 et à l'aide des expériences de type HNC ainsi que du ^{15}N -HSQC effectué à pH 6.6, 238 ^{15}NH ont pu être attribués, dont la Val216 et l'Ala217. Seuls 10 ^{15}NH manquent donc à l'attribution, et ils correspondent aux résidus suivants : Ser45, Thr103, Glu187, Asp189, Lys190, Gly193, Pro194, Leu196, Lys209 et Ser210. Bien que les résidus de la boucle Val soient désormais détectés, il demeure indispensable de résoudre le problème de ces 10 ^{15}NH s manquants.

2.3.2.5. Vers une alternative ingénieuse : le double marquage spécifique

L'attribution de TEM-1 s'est donc avérée beaucoup plus ardue que prévu et a été particulièrement difficile à réaliser pour les résidus de la boucle Val. Au vu de la quantité de problèmes auxquels il a fallu faire face pour TEM-1 – alors qu'une référence était à disposition –, l'attribution du complexe TEM-1_NB promet d'être encore plus complexe et chronophage. Or, il faut garder à l'esprit que l'objectif principal est de déterminer l'impact du nanobody sur la dynamique de la boucle Val, et non pas forcément sur l'entièreté de la protéine. C'est avec cette idée en tête qu'un double marquage spécifique de la paire Val216 – Ala217 a été imaginé. Malheureusement, il n'a pas pu être effectué en raison du confinement imposé face à la pandémie de COVID19. La suite de ce chapitre n'est donc qu'hypothétique.

De manière plus précise, les 38 alanines de TEM-1 seraient marquées au ^{15}N et les 15 valines, au ^{13}C au niveau de leur fonction carbonyle peptidique. Les autres résidus ne seraient pas marqués. Autrement dit, le spectre ^{15}N -HSQC ne contiendrait que 38 signaux qui ne représentent que les alanines de TEM-1. De plus, grâce au marquage ^{13}C des valines, le lien peptidique de toutes les paires valine – alanine pourrait être visualisé. Or, TEM-1 ne présente qu'une seule paire de ce genre : celle de la boucle Val (Val216 – Ala217). Par ce procédé, l'attribution de la Val216 et de l'Ala217 serait grandement facilitée, notamment grâce à la quantité bien inférieure de résidus mesurés.

L'étude de relaxation se ferait ensuite sur le même échantillon, ce qui signifie que seules les données sur les alanines seraient disponibles. Cela fournirait à la fois une information sur la dynamique globale de TEM-1, par l'observation des alanines situées aléatoirement dans la séquence, sans nécessiter l'analyse de tous les résidus ; mais également plus spécifiquement sur la mobilité de la boucle Val, centre d'attention de cette étude. En revanche, le marquage de la Val216 au ^{13}C pourrait perturber les mesures de relaxation de l'Ala217. L'idéal serait donc de les confirmer en utilisant un échantillon de TEM-1 où seules les alanines seraient marquées au ^{15}N , sans la combinaison avec les valines au ^{13}C .

Si le nombre de signaux détectés devait être inférieur à 38, une alternative serait d'effectuer ce double marquage en combinaison avec une deutération complète de la protéine. Il est en effet connu depuis longtemps que la deutération d'une protéine améliore grandement la qualité d'un spectre RMN, en

particulier si elle présente un haut poids moléculaire (> 30 kDa) : le rapport signal/bruit est accru et les pics sont affinés par rapport au spectre proton.⁽⁵⁷⁾ Des gains importants de sensibilité et de résolution ont déjà été observés grâce à la deutération d'un échantillon pour les expériences de type HNC utilisées lors d'une attribution. De telles améliorations peuvent s'expliquer par l'augmentation du temps de relaxation des H^N , des NH et des $C\alpha$ grâce à la deutération. En effet, les propriétés de relaxation des spins impliqués dans le transfert de la magnétisation sont à la base de l'efficacité des expériences de type HNC et une diminution de la magnétisation conduit à une diminution du rapport signal/bruit, particulièrement pour les protéines plus de 20 kDa.⁽⁵⁷⁾ La deutération de TEM-1 pourrait dès lors être envisagée en cas de problèmes de détection ou de résolution.

2.3.3. Seconde étape : l'attribution de TEM-1_NB

Ni l'attribution ni la relaxation du complexe TEM-1_NB n'ont pu être initiées. Étant donné que ces expériences promettent d'être compliquées à réaliser par la voie traditionnelle (c'est-à-dire par marquage de l'entièreté de la séquence de la protéine et de celle nanobody) et au vu de la taille du complexe, le double marquage semble être une alternative astucieuse pour simplifier ces procédés. Il est néanmoins nécessaire de commencer par TEM-1 avant TEM-1_NB afin de s'assurer que cette théorie est applicable sur le plan expérimental.

2.3.4. Et TEM-121 dans tout ça ?

Ni l'attribution ni la relaxation n'ont été initiées pour TEM-121 seule ou complexée. Aucun spectre n'a été mesuré pour cette enzyme et aucune donnée relative à l'attribution ou la relaxation de TEM-121 n'est disponible dans la littérature. Puisque seules six mutations séparent TEM-121 de TEM-1, l'attribution de la seconde pourrait vraisemblablement aider à effectuer celle de la première, mais ce n'est qu'une vague hypothèse à ce stade de l'étude.

Conclusion, discussion & perspectives

1. Remise en contexte et rappels des objectifs

La synthèse de β -lactamases constitue donc le mécanisme de résistance bactérienne le plus efficace et le plus répandu envers les antibiotiques de type β -lactamine (tableau 1). Les bactéries, principalement de type Gram⁺, font preuve d'une adaptation très rapide suite à l'introduction de nouvelles formes de ces antibiotiques par la production de nouvelles β -lactamases présentant des spectres d'action de plus en plus larges, telles que les ESBLs. De nombreuses approches novatrices ont été pensées afin de concevoir de nouveaux modèles d'inhibiteurs envers ces enzymes et c'est ainsi que les nanobodies, ces petits fragments d'anticorps monomériques (figure 7), sont apparus comme une perspective prometteuse, notamment en raison de leurs nombreuses qualités. Ainsi, le projet dans lequel s'inscrit ce mémoire consiste en la caractérisation cinétique et structurale de l'inhibition et de l'interaction entre le nanobody cAb_{TEM-1} identifié en 2001 et la β -lactamase de classe A TEM-1. Cette dernière est en effet une enzyme de référence, idéale pour réaliser une démonstration de faisabilité pour le développement et l'utilisation de nanobodies contre des β -lactamases bien plus dangereuses, comme les M β LS.

Préalablement à la réalisation de ce mémoire, une première caractérisation cinétique avait permis de montrer que le nanobody cAb_{TEM-1} était spécifique aux enzymes de la famille TEM et qu'il pouvait interagir et inhiber à la fois des membres à caractère classique, comme TEM-1, mais aussi des ESBLs ou des IRTs, voire qui combinent les deux profils, comme TEM-121. De plus, ce nanobody présente une affinité élevée pour ces enzymes, qui s'accompagne d'une association rapide et d'une forte stabilité du complexe généré (tableau 2). En outre, bien qu'il puisse inhiber TEM-1 et TEM-121, les profils d'inhibition varient avec ces enzymes. En effet, il s'agirait d'un inhibiteur compétitif de TEM-1 (graphique 1) et d'un inhibiteur non-compétitif de TEM-121 (graphique 4). Finalement, les paramètres de taille et de charge propres à chaque antibiotique semblent également influencer le pourcentage d'activité résiduelle, notamment en ce qui concerne l'enzyme TEM-1 (tableau 3).

Ensuite, les études cristallographiques du complexe TEM-1_NB ont montré que le nanobody se place entre les boucles α 10 et α 11 de l'enzyme et non dans son site actif (figure 8), malgré un profil d'inhibition compétitif. De plus, la comparaison entre une structure à très haute résolution de TEM-1 (PDB : 1M40) avec celle de TEM-1_NB révèle une rigidification de l'extrémité N-terminale de la boucle H9, et plus précisément de la séquence (dénommée boucle Val) Glu212 – Ala213 – Asp214 – Lys215 – Val216 – Ala217 – Gly218. En effet, alors que cette boucle Val présente deux conformations différentes chez TEM-1 1M40, seule une conformation est observée chez TEM-1_NB (figure 29). Cette rigidification s'explique par l'interaction des domaines CDR2 et CDR3 du nanobody avec des résidus qui entourent et qui composent cette boucle, ainsi que par la proximité entre le CDR3, plutôt polaire, et la boucle Val, qui contient davantage de résidus hydrophobes, (figure 9) avec pour conséquence la répulsion et la pénétration de cette dernière au sein du site actif ainsi que la réorientation des chaînes latérales de certains de ses résidus, dont la Val216 et l'Ala217, vers l'intérieur de celui-ci (figure 11). Il s'agit des seuls changements structuraux majeurs : la

comparaison entre les modèles de TEM-1 et de TEM-1_NB a en effet montré que le nanobody n'impactait que peu le reste de la structure de l'enzyme, les résidus du site actif étant parfaitement superposables entre eux (figure 11). Pour terminer, l'interface d'interaction entre ce nanobody et les enzymes TEM-1 et TEM-121 est identique dans les deux cas (figure 12). Une telle observation complique évidemment l'interprétation des résultats cinétiques, et notamment l'explication quant à la différence des profils d'inhibition.

De ces observations ont émergées trois questions de recherche qui visent à améliorer la compréhension quant aux mécanismes inhibiteurs par lesquels le nanobody cAb_{TEM-1} agit et ces trois questions ont constitué les trois objectifs de ce mémoire. Pour commencer, par le biais de modélisations par docking moléculaire, l'impact de la réorientation de la chaîne latérale de la Val216 a été investigué afin de voir si elle pouvait engendrer un encombrement stérique et/ou hydrophobe au sein du site actif qui serait défavorable à l'entrée du substrat, notamment si ce dernier est volumineux et chargé. De plus, la différence entre les profils d'inhibition ne pouvant pas être expliquée par des changements au niveau des interfaces d'interaction entre les enzymes et le nanobody, le docking a également été utilisé afin d'étudier l'existence d'un lien éventuel entre cette différence des profils d'inhibition et la mutation Arg244Ser, qui libère le site actif de TEM-121 d'un résidu volumineux et d'une charge positive, avec pour conséquence davantage de place et moins de contraintes de charges pour l'entrée du substrat. Finalement, suite à l'observation d'une différence de dynamique entre les modèles cristallographiques de TEM-1 et de TEM-1_NB, notamment au niveau de la boucle Val, une modélisation dynamique (MD) a été initiée afin de confirmer, de caractériser et de quantifier l'impact du nanobody sur la dynamique de l'enzyme et de la boucle Val, ainsi que pour déterminer son rôle éventuel dans l'inhibition. La combinaison de ces méthodes structurale (docking) et dynamique (MD) permet ainsi de compléter l'ébauche du modèle concernant l'inhibition apportée par le nanobody cAb_{TEM-1} sur les β -lactamases de classe A.

2. Discussion et perspectives pour la modélisation par docking

L'étude par docking moléculaire a mis en évidence plusieurs phénomènes intéressants avec, tout d'abord une réorientation défavorable de la fonction carboxylique en C3/C4 des β -lactamines en direction de l'Arg244 chez le modèle de TEM-1_NB alors qu'elle est dirigée vers la Lys234 et Ser235 chez TEM-1 (figure 46). Une telle observation valide l'hypothèse selon laquelle la Val216, par l'intrusion de ses groupes méthyls Cy, génère un encombrement stérique et/ou hydrophobe important au sein du site actif qui contraindrait le substrat. La Val216 peut donc être assimilée à une barrière énergétique que le substrat doit absolument franchir pour entrer dans le site actif avec d'un côté, un effet hydrophobe (la chaîne latérale de la Val216) et, de l'autre, un effet polaire (la fonction carboxylique en C3/C4 et, éventuellement, la chaîne latérale en C2/C3). Cette théorie est soutenue par le fait qu'en présence du nanobody, la distance entre la fonction carboxylique, lorsqu'elle est décalée vers l'Arg244, et la Val216 reste inférieure à 4 Å et diminue même pour l'ensemble des substrats (à l'exception de l'ampicilline pour laquelle elle reste constante) (tableau 6), rendant le passage de cette fameuse barrière énergétique Val216 relativement difficile. Les contraintes imposées par cette dernière seraient en revanche fortement restreintes chez TEM-1 grâce à l'éloignement de la boucle Val du site actif, qui pourrait être rendu possible par sa dynamique à priori relativement élevée. Autrement dit, ce n'est pas parce que l'orientation de la fonction carboxylique vers l'Arg244 n'est pas observée chez TEM-1 qu'elle ne peut pas avoir lieu ; il semble plutôt que, chez l'enzyme seule, les contraintes mentionnées ci-dessus seraient franchies bien plus aisément et rapidement et, de ce fait, le docking ne fournirait que des conformations correctes et compatibles en vue de l'acylation.

Si la réorientation de la Val216 semble fortement affecter le bon positionnement de la fonction carboxylique en C3/C4, elle impacterait également celui de la chaîne latérale en C2/C3 d'une manière plus ou moins forte selon la taille et la présence de charge(s) sur cette dernière. Lorsque cette chaîne est petite et non chargée et qu'elle se retrouve à proximité de la Val216, elle pourrait en effet plus facilement passer outre l'encombrement généré par ce résidu en se décalant en direction de l'Arg244, comme le montre la conformation C-A de la céfalotine et de la céfotaxime (figure 47). Avec une telle conformation où ce serait plutôt la chaîne en C2/C3 qui ferait face à la Val216, la fonction carboxylique en C3/C4 serait éloignée de ce résidu et en subirait moins les contraintes, ce qui permettrait son repositionnement face à la Lys234 et la Ser235 ainsi que l'établissement des liaisons H nécessaires à la catalyse. Cela expliquerait également les pourcentages d'activité résiduelle plus élevés de l'ampicilline, de la céfalotine et de la céfotaxime. En revanche, les chaînes en C3 de la céphaloridine et de la nitrocéfine, qui sont bien plus volumineuses et qui contiennent des charges positives, éprouveraient beaucoup plus de difficultés à se placer correctement dans le site actif suite à l'encombrement de la Val216 et ne pourraient pas se décaler en direction de l'Arg244 suite à la répulsion électrostatique entre les charges positives de la fonction guanidinium et de la chaîne en C3, ce qui expliquerait l'absence de la conformation C-A pour ces substrats et en des pourcentages d'inhibition bien plus élevés. Pour le dire autrement, les conformations C-A et C-B observées

pour la céfalotine et la céfotaxime (figure 47) représenteraient les différentes configurations que l'antibiotique prendrait successivement lors de son entrée dans le site actif pour franchir les divers obstacles générés par la Val216. Une fois ceci fait, le mécanisme catalytique serait identique à celui décrit pour les β -lactamases de classe A (figure 6). Si ces deux conformations n'ont pas été observées pour l'ampicilline, c'est probablement parce que sa chaîne latérale est très petite et relativement hydrophobe (fonctions méthyls) ; elle pourrait donc avoir moins de problèmes à passer outre la barrière énergétique.

Cette théorie explique non seulement les différences observées pour les pourcentages d'inhibition, mais aussi en quelque sorte le profil d'inhibition compétitif de TEM-1_NB. En effet, bien que le nanobody ne se place pas directement dans le site actif, la réorientation de la Val216 qu'il induit semble empêcher le substrat d'y entrer et génère ainsi une situation comparable à la compétition habituellement observée entre l'inhibiteur et le substrat.

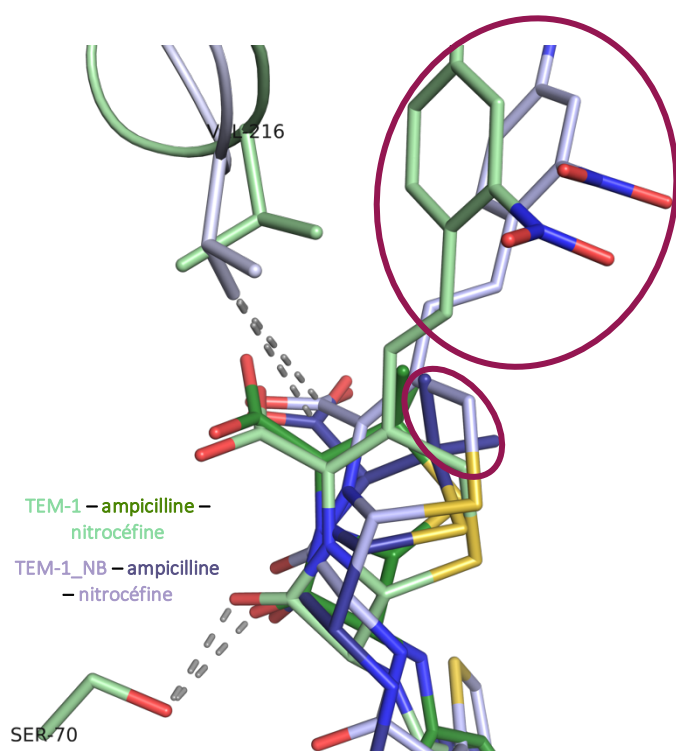


Figure 46. Superposition des conformations de l'ampicilline et de la nitrocefine chez TEM-1 et TEM-1_NB. Les structures dans les tons verts se rapportent à TEM-1 et celles dans les tons bleus, à TEM-1_NB. L'ampicilline est de couleur plus foncée que la nitrocefine. Les traits gris en pointillé montrent les distances de moins de 4 Å. La chaîne latérale en C2/C3 est entourée en bordeaux.

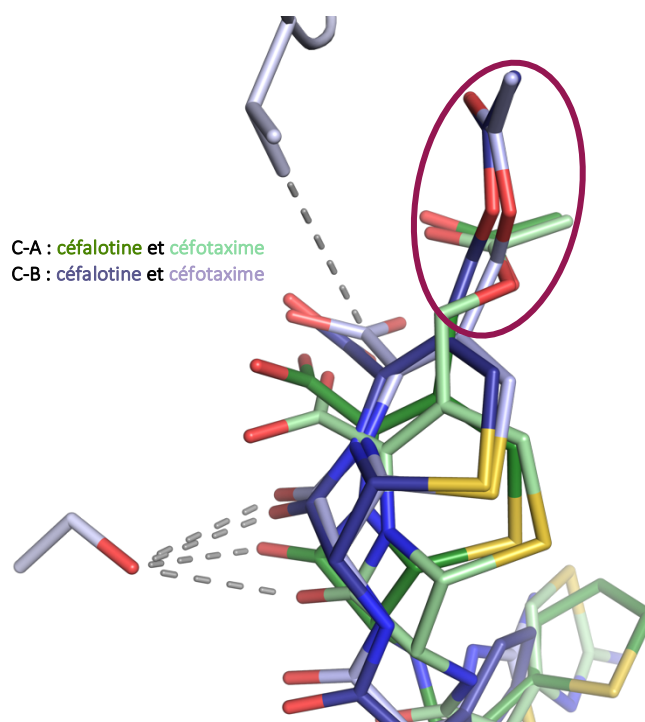


Figure 47. Superposition des conformations la céfalotine et la céfotaxime chez TEM-1_NB. Les structures dans les tons verts se rapportent à la conformation C-A et celles dans les tons bleus, à C-B. La céfalotine est de couleur plus foncée que celle de la nitrocefine. Les traits gris en pointillé montrent les distances de moins de 4 Å. La chaîne latérale en C3 est entourée en bordeaux.

Pour terminer, bien que le mécanisme catalytique ne serait pas impacté, il apparait que le pivotement de la chaîne latérale de la Val216 pourrait poser problème à l'antibiotique lors de son entrée, mais également lors des étapes catalytiques ultérieures, telles l'acylation. C'est ce que montrent des superpositions effectuées entre les structures de TEM-1_NB, montrant l'entrée de l'antibiotique, et Toho-1 au stade d'acyl-enzyme pour trois substrats : l'ampicilline/la benzyl-pénicilline (PDB : 1IYQ, figure 48), la céfalotine (PDB : 1IYP, figure 49) et la céfotaxime (PDB : 1IYO, figure 50 en annexe). Toho-1, également

connue sous le nom de CTX-M-44, est une β -lactamase de classe A appartenant à la famille des CTX-M et qui présente le caractère ESBL. Elle possède une thréonine en position 216, mutation fréquemment retrouvée dans cette famille. Pour les trois substrats, la fonction carboxylique de l'antibiotique acylé est positionnée de façon relativement similaire à celle de TEM-1, soit plutôt en direction des Lys234 et Ser235 du site actif. Néanmoins, la distance entre cette fonction et le C γ de la Val216 est suffisamment faible que pour que ce résidu l'encombre d'un point de vue stérique et constitue un obstacle qui devra être franchi pour que l'étape d'acylation soit réalisée correctement. Cette observation confirme donc que le positionnement de la chaîne latérale de la Val216 est crucial au bon déroulement de tout le mécanisme catalytique de l'enzyme.

Ampicilline – benzyl-pénicilline

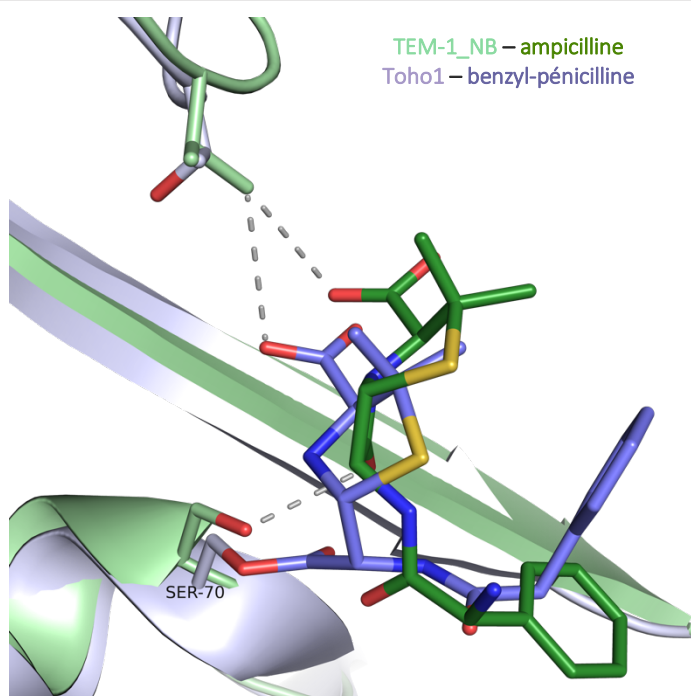


Figure 48. Superposition du modèle de TEM-1 (vert clair) avec l'ampicilline entrante (vert foncé) et de Toho-1 (bleu clair) acylé à la benzyl-pénicilline (bleu foncé – PDB : 1IYQ). Les traits gris en pointillé montrent les distances de moins de 4 Å.

Céfaloine

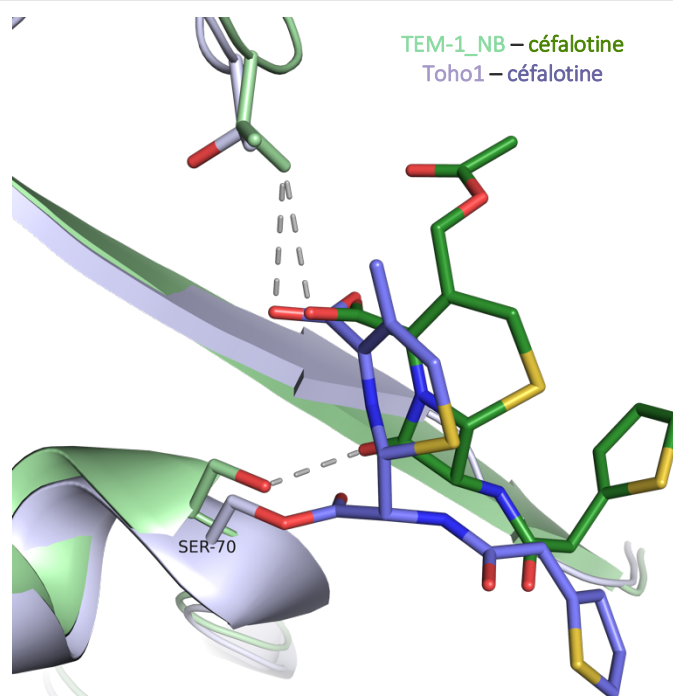


Figure 49. Superposition du modèle de TEM-1 (vert clair) avec la céfalotine entrante (vert foncé) et de Toho-1 (bleu clair) acylé à la céfalotine (bleu foncé – PDB : 1IYP). Les traits gris en pointillé montrent les distances de moins de 4 Å.

La Val216 bloque donc le bon positionnement de la fonction carboxylique en C3/C4 du substrat, laquelle est repoussée vers l'Arg244 chez TEM-1_NB lorsqu'elle se retrouve face à ce résidu. Néanmoins, cette fonction se place toujours en direction de la Lys234 et de la Ser235 chez TEM-121_NB, comme chez TEM-1 et Toho-1 (figure 51). Il se pourrait donc que la fonction guanidinium de l'Arg244 attire la fonction carboxylique du substrat et facilite ainsi sa réorientation. Cet effet de charge ne peut cependant pas être vu comme la cause de cette réorientation car il est connu que l'Arg244 interagit déjà directement ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau avec cette fonction carboxylique lors de l'activité catalytique⁽⁵⁸⁾, bien que cette interaction ne soit pas observée pour la modélisation de TEM-1. Elle serait donc établie en

conséquence de la répulsion engendrée par la Val216 et facilitée par les charges opposées des fonctions carboxylique et guanidinium.

En outre, une des hypothèses de départ était que la mutation Arg244Ser libère de la place dans le site actif et réduit les phénomènes de répulsion électrostatique avec les chaînes latérales en C2/C3 volumineuses et contenant des charges positives. Si les résultats du docking ne sont pas suffisamment probants que pour valider définitivement cette théorie, il n'en demeure que cette substitution pourrait clairement faciliter le positionnement correct du substrat, notamment celle de la fonction carboxylique en C3/C4 et de la chaîne latérale en C2/C3, lors de son entrée dans le site actif. De plus, les similitudes entre les conformations des substrats de TEM-121_NB et celles de TEM-1 et de Toho-1 indiquent que la différence entre les profils d'inhibition ne résulterait pas d'une différence dans l'entrée du substrat. En outre, le fait que l'antibiotique ne semble pas faire face à d'importants problèmes lors de l'entrée s'accorde avec le profil d'inhibition non compétitive puisque, avec celui-ci, seul le k_{cat} est modifié, pas le K_m . Or, le k_{cat} intervient lors des phases d'acylation et de désacylation ; l'entrée pourrait donc se faire correctement.

Pour terminer, une explication potentielle à la répulsion du substrat vers l'extérieur de la cavité qu'il serait intéressant d'investiguer serait celle des nombreux rotamères engendrés par les mutations Glu104Lys et Glu240Lys. Ces résidus sont situés dans le bas de la cavité enzymatique et, de ce fait, les rotamères au niveau de leur chaîne latérale fermeraient le site actif de TEM-121 (figure 52). Cela signifie qu'en présence du nanobody, le site actif serait à la fois encombré sur le dessus, avec la Val216, qui est positionnée exactement comme celle de TEM-1_NB, et sur le dessous, avec les Lys104 et Lys240, avec pour conséquence une entrée plus difficile du substrat. Ceci pourrait également expliquer que la modélisation de TEM-121_NB n'ait que moyennement fonctionné.

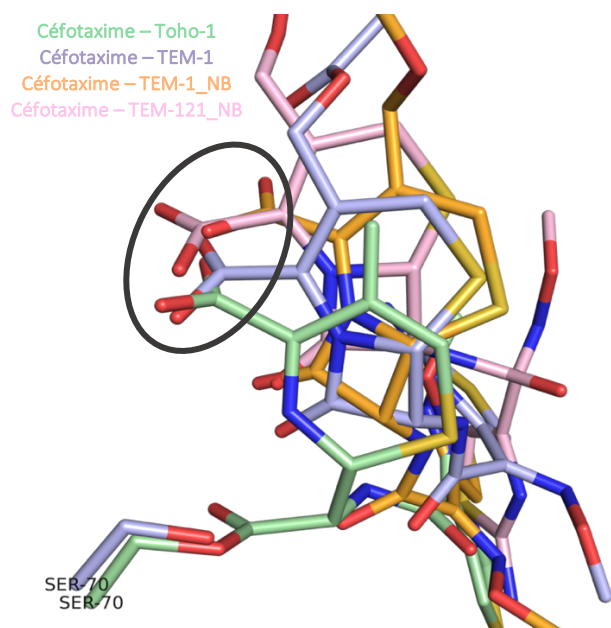


Figure 51. Superposition des conformations de la céfotaxime chez Toho1 (vert clair), TEM-1 (bleu clair), TEM-1_NB (orange clair) et TEM-121_NB (rose clair). La fonction carboxylique en C4 est entourée en gris.

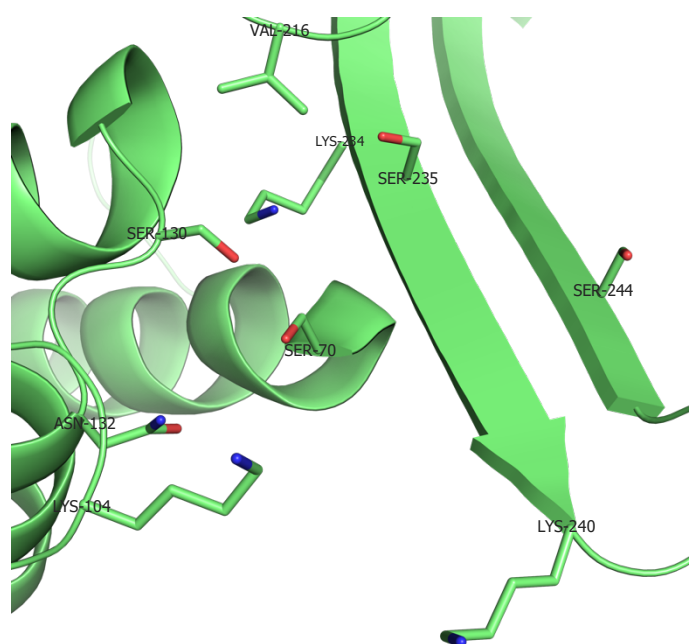


Figure 52. Représentation du site actif de TEM-121 et de sa fermeture éventuelle par les Lys104 et Lys240.

Bien que ces observations soient pleines de perspectives, il ne faut pas oublier que le côté statique de cette étude limite fortement ses implications et que tous ces résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet, la cristallographie a mis en évidence que la dynamique de TEM-1 semblait fortement impactée en présence du nanobody, notamment avec la rigidification de la boucle Val. Or, le docking ne permet pas de visualiser de tels phénomènes. Il s'agit également d'une méthode qui est très sensible à toute interaction possible sur le plan théorique (c'est-à-dire rendue envisageable par des distances interatomiques favorables à son établissement), ce qui peut parfois fausser les résultats car ce n'est pas parce qu'une interaction peut se faire sur le plan théorique qu'elle existe réellement. Il n'en demeure que cette modélisation structurale, qui est complétée par une modélisation dynamique, a permis d'affiner l'ébauche du schéma sur l'inhibition de TEM-1 et de TEM-121 par le nanobody cAb_{TEM-1}.

Outre la MD, plusieurs expériences peuvent être envisagées au terme de cette modélisation afin de la valider. La première chose qu'il apparaît nécessaire de mettre en œuvre est la détermination des constantes cinétiques d'acylation k_2 et de désacylation k_3 chez TEM-121_NB afin de confirmer que l'entrée n'est pas impactée par le nanobody chez ce complexe, s'agissant en effet d'une inhibition non compétitive, ce qui validerait définitivement les résultats de la comparaison entre TEM-1_NB et TEM-121_NB. Une mutagenèse dirigée des Lys104 et Lys240 de TEM-121 pourrait également s'avérer enrichissante car elle permettrait de déterminer si ces lysines seraient responsables d'un encombrement stérique induisant la fermeture du site actif pour le substrat. Néanmoins, le plus intéressant serait de réaliser la même modélisation sur des mutants pour l'Arg244 de TEM-1 seul et complexé. Ce résidu n'est pas particulièrement conservé au sein de la famille TEM⁽⁵⁸⁾ : les mutations Arg244Ser, Arg244His ou Arg244Cys, observées chez d'autres TEM, conduisent à une diminution de la résistance envers les pénicillines.⁽¹⁷⁾ En revanche, il s'avère que la présence d'une charge positive dans cette région est conservée.⁽⁵⁸⁾ En effet, en cas de substitution de l'Arg244, d'autres mutations apparaissent, notamment aux positions 220 ou 276, afin de compenser la perte de la charge positive.⁽⁵⁸⁾ L'idéal serait donc de faire deux mutants Arg244Ser : un avec et un sans compensation de la charge positive et de telle sorte qu'à la fois l'encombrement et la charge sont modifiés chez ces mutants. La modélisation du premier mutant pourrait ainsi être comparée à celle de TEM-1 et la seconde, à celle de TEM-121. Cela permettrait d'abord de vérifier que l'encombrement stérique provoqué par les fonctions Cy de la Val216 prévaut sur l'effet de charge de l'Arg244, mais aussi de voir si cette mutation à elle seule peut être à l'origine d'un changement du profil et/ou de la force d'inhibition. Pour cette seconde hypothèse, une alternative serait de réaliser la mutation Ser244Arg chez TEM-121, qui pourrait éventuellement générer des problèmes au niveau de l'acylation et de la désacylation.

3. Discussion et perspectives pour la modélisation dynamique

Le troisième et dernier objectif se concentre sur l'impact du nanobody sur la dynamique de la boucle Val. Il a été étudié par une modélisation dynamique sur quatre modèles cristallographiques : les deux conformations TEM-1_A et TEM-1_B du modèle cristallographique TEM-1 1M40 ; le modèle TEM-1_C qui correspond à l'enzyme TEM-1 du complexe TEM-1_NB ; et le modèle TEM-1_NB. Il est rapidement apparu que le modèle TEM-1_C ne pouvait être utilisé pour la comparaison dynamique de l'enzyme seule et complexée. En effet, chez l'enzyme seule, la fonction carboxylique de l'Asp214 interagit avec l'azote des fonctions amides principales de la Val216 et de l'Ala217, mais elle se lie également à la Lys215 et la Lys234 (figure 36). Or, ces interactions n'existent pas chez TEM-1_NB et, *de facto*, chez TEM-1_C non plus (figures 31 et 32). L'établissement de ces liaisons semble avoir deux conséquences majeures. Premièrement, l'Asp214 est stabilisé au sein de la cavité et présente une dynamique très faible par rapport aux autres résidus de la boucle Val (tableau 9). Deuxièmement, ces interactions semblent réguler toute la dynamique de la boucle Val. En effet, la boucle Val du modèle TEM-1_C est caractérisée par une mobilité considérable et se retourne complètement pour prendre une configuration qui pourrait gêner l'entrée du substrat par la proximité de résidus hydrophobes. En revanche, chez TEM-1_A, bien que la boucle Val présente une dynamique qui puisse tout de même être qualifiée d'élevée, ce qui s'est traduit par l'obtention de deux conformations, elle est stabilisée par ses interactions avec l'Asp214 qui lui évitent de prendre des configurations défavorables en termes de stabilité et d'activité, notamment en l'éloignant (ainsi que les fonctions méthyles Cy de la Val216) du site actif.

De plus, la présence du nanobody n'impacte que très localement la dynamique de TEM-1. En effet, seules les séquences Gln90-Ala125 et Trp210-Leu220, incluant donc la boucle Val, présentent des variations dynamiques, avec un accroissement non expliqué de la mobilité de la première et une chute pour la seconde (graphique 8). En outre, en présence du nanobody, de nouvelles interactions impliquant l'Asp214 sont observées : les chaînes latérales de la Tyr52 du CDR2 et de la Ser103 du CDR3 de cet inhibiteur viennent en effet établir des ponts H avec sa fonction carboxylique. Suite à ces interactions, l'Asp214 s'éloigne des autres résidus de la boucle Val, donc de la Val216 et de l'Ala217 (figures 38 et 39), avec pour conséquence l'impossibilité de réaliser les liaisons observées chez l'enzyme seule. De ce fait, le nombre de liens H impliquant l'Asp214 est considérablement réduit : sa chaîne latérale n'interagit qu'avec le nanobody et sa chaîne principale (qui ne réalise aucune interaction chez TEM-1 seul), avec celle de la Gly218 (figure 37).

Autre fait intéressant, déjà brièvement évoqué : bien qu'il fasse partie de la boucle Val, l'Asp214 présente la même dynamique entre les formes seule et complexée de TEM-1. Ce résidu est caractérisé par une très grande stabilité (tableau 9) qui peut s'expliquer par l'établissement de nombreux liens H (minimum trois, jusqu'à cinq) qui diffèrent selon l'absence ou la présence du nanobody. A noter que, malgré cette stabilité, deux configurations de l'Asp214 peuvent être observées dans la structure à haute résolution de TEM-1 (PDB : 1M40). Néanmoins, quelle que soit la conformation, les interactions avec la Val216 sont

toujours maintenues (figure 53). Autrement dit, bien l'Asp214 ait toujours été considéré comme un résidu « quelconque » de TEM-1, il apparaît qu'il jouerait un rôle primordial pour la régulation de la dynamique de la boucle Val et, de ce fait, pour l'entrée du substrat et l'activité de l'enzyme, et cette régulation semble d'autant plus essentielle que la dynamique de la boucle en elle-même. En plus de la stabilité de l'Asp214, cette hypothèse est soutenue par la conservation des liens H entre l'Asp214 et la Val216/l'Ala217 (ou entre l'Asn214 et la Thr216/la Gly217) chez les différentes familles de β -lactamases de classe A, incluant TEM, CTX-M, SHV et KPC. Comme le montre la figure 54, les mêmes interactions peuvent en effet être retrouvées au sein des enzymes appartenant à ces familles. Sans compter que les diverses conformations sont fortement semblables entre elles d'un point de vue structural, à l'exception de SHV-1 pour laquelle de légères différences existent, ce qui témoigne de l'importance du positionnement relatif de ces résidus en vue de l'établissement des différents ponts H.

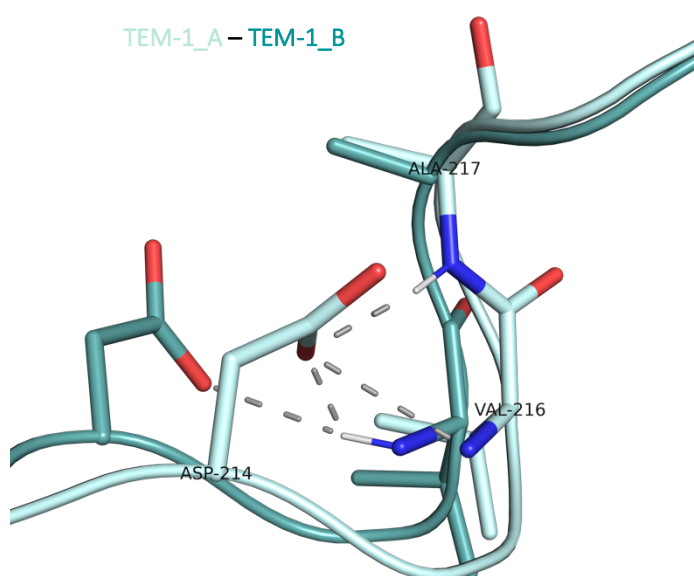


Figure 53. Représentation des deux conformations de l'Asp214 du modèle cristallographique de TEM-1 1M40 avec la conformation A (TEM-1_A) en cyan clair, la conformation B (TEM-1_B) en cyan foncé et de ses interactions (lignes grises en pointillé) avec la Val216 et l'Ala217.

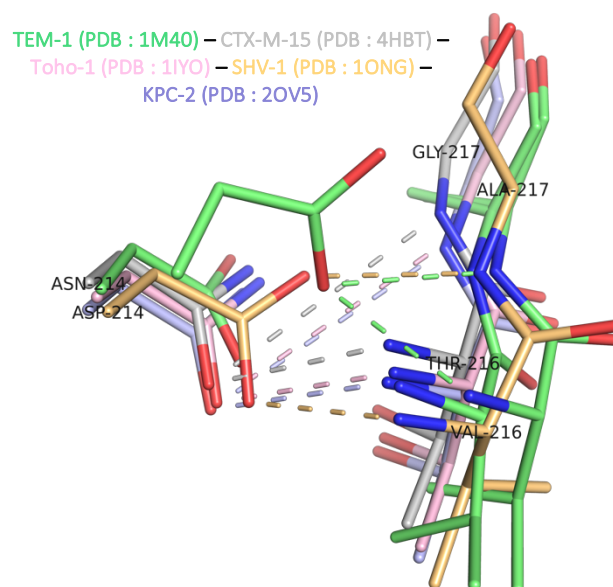


Figure 54. Représentation de la conservation des liens H entre l'Asp214 et la Val216/l'Ala217 (ou entre l'Asn214 et la Thr216/la Gly217) entre les familles TEM (TEM-1, vert), CTX-M (sous-groupe 1 : CTX-M-15, gris ; sous-groupe 2 : Toho1, rose), SHV (SHV-1, jaune) et KPC (KPC-2, bleu).

Les informations dérivées de la modélisation dynamique permettent d'imaginer des expériences dont les résultats pourraient s'avérer extrêmement enrichissants, que ce soit pour terminer la caractérisation de l'inhibition des enzymes TEM-1 et TEM-121 par le nanobody cAb_{TEM-1}, mais aussi pour déterminer si le modèle soutenant l'importance de la régulation de la boucle Val par l'Asp214 est correct. La première expérience à mettre en place, et peut-être la plus importante, est évidemment la relaxation par RMN, qui se ferait par un double marquage spécifique de la paire Val216 – Ala217, car elle permettrait de valider définitivement ces résultats par la comparaison de données informatiques et expérimentales. En outre, le rôle régulateur de l'Asp214 pourrait être démontré par une mutagenèse dirigée de ce résidu. Cette mutagenèse doit évidemment induire une perte des ponts H normalement observés entre l'Asp214 et la

Val216/Ala217. La suppression de ces ponts pourrait diminuer la stabilité de l'enzyme, perturber son activité et éventuellement, impacter son spectre d'action. Cette expérience pourrait être réalisée à la fois sur TEM-1, mais également pour des membres représentatifs des autres familles des β -lactamases de classe A afin de valider l'universalité de l'importance des interactions générées par l'Asp214. Différentes mutations peuvent être envisagées, notamment la substitution Asp214Asn car l'asparagine est un résidu polaire et de même taille que l'acide aspartique mais ne pourrait pas réaliser autant d'interactions que ce dernier ; ou encore, la mutation Asp214Ser, la sérine étant polaire mais beaucoup plus petite que l'acide aspartique. Finalement, la stabilité de l'Asp214 pourrait être démontrée expérimentalement, toujours par mutagenèse mais cette fois-ci sur la Val216 et l'Ala217. Ces deux résidus pourraient en effet être remplacés par d'autres résidus hydrophobes mais plus volumineux, comme une leucine ou une phénylalanine, qui empêcheraient l'accès de la fonction carboxylique de l'Asp214 à leur chaîne principale. La dynamique de la boucle Val et de l'Asp214 devrait alors être grandement accrue, peut-être plus que ce qui avait observé pour TEM-1_C, avec des impacts plus que probables sur l'activité de TEM-1.

4. Vers l'établissement d'un nouveau modèle ?

Bien que cela dépasse largement les objectifs fixés, un nouveau modèle présentant la dynamique de la boucle Val et sa régulation par l'Asp214 comme éléments essentiels au fonctionnement de l'enzyme TEM-1 peut ainsi être construit sur base de l'ensemble des données provenant du docking et de la modélisation dynamique. Il apparaît en effet que la boucle Val modulerait l'entrée des substrats dans le site actif par sa dynamique, qui serait principalement régulée par les liaisons H établies par l'Asp214. Ce résidu pourrait donc s'avérer primordial à la bonne activité de TEM-1, bien qu'il n'ait jamais été abordé en ce sens.

En absence du nanobody, la chaîne latérale de l'Asp214 interagit entre autres avec les chaînes principales de la Val216 et de l'Ala217. De telles liaisons stabilisent non seulement l'Asp214, qui présente une mobilité très faible, mais également la boucle Val, dont la dynamique explose en leur absence. A noter que malgré cette régulation, la boucle Val demeure flexible. Bien que l'Asp214 puissent prendre diverses conformations chez TEM-1, il demeure toujours suffisamment proche de la Val216 que pour interagir avec cette dernière. Du fait de cette interaction, la chaîne latérale de la Val216 est dirigée vers l'Asp214, et non pas vers le site actif, de telle sorte qu'elle n'engendre pas d'encombrement stérique et/ou hydrophobe au sein de celui-ci. Le substrat, généralement une β -lactamine, pourrait ainsi se positionner correctement en vue de son acylation, c'est-à-dire avec sa fonction carboxylique en C3/C4 dirigée vers la Lys234 et la Ser235.

Cependant, en présence du nanobody cAb_{TEM-1}, la Tyr52 du CDR2 et la Ser103 du CDR3 viennent interagir avec la fonction carboxylique de l'Asp214, ce qui génère un pivotement de ce dernier qui s'éloigne alors de la Val216 et de l'Ala217 avec, pour conséquence, l'impossibilité d'établir les interactions normalement observées avec ces deux résidus. De plus, suite à ces nouvelles liaisons, la boucle CDR3, à tendance plutôt polaire, se retrouve très près de la boucle Val hydrophobe qui, pour échapper à cet effet, rentre davantage dans le site actif et se rigidifie fortement, ce qui fait du nanobody cAb_{TEM-1} le responsable de la perte de la dynamique de la boucle Val. Par contre, que ce soit chez TEM-1 seul ou complexé, l'Asp214 présente la même stabilité, qui se justifie par la quantité de liaisons H qu'il réalise, bien qu'elles diffèrent entre les modèles. Une seconde conséquence importante et plutôt d'ordre structural se superpose à ceci car l'absence du pont H entre l'Asp214 et la Val216 induirait une réorientation de la chaîne latérale de la Val216 et son intrusion dans le site actif. De ce fait, un important encombrement stérique et/ou hydrophobe est généré au sein du site actif, faisant de la Val216 une barrière énergétique que le substrat doit franchir pour son entrée ou son acylation, et avec plus ou moins de difficultés selon la taille et la présence de charges sur la chaîne latérale en C2/C3. Cette barrière encombrerait fortement la fonction carboxylique en C3/C4 des antibiotiques qui, pour se soustraire à cet effet, se réorienterait en direction de l'Arg244. Pour les substrats présentant une chaîne C2/C3 chargée positivement, cet encombrement pourrait être amplifié par une répulsion électrostatique entre cette dernière et la fonction guanidinium de l'Arg244 de l'enzyme. Pour le dire autrement, une mutation de cette Arg244 en un résidu moins volumineux et non chargé, comme

une sérine, permettrait à l'antibiotique de se positionner correctement en vue de son entrée dans le site actif et de son acylation.

Pour simplifier, si la dynamique de la boucle Val apparaît comme primordiale pour lui permettre de se distancier du site actif lors de l'entrée du substrat, il semble que sa régulation par l'Asp214 soit encore plus essentielle. Cette idée est soutenue par la conservation de ces liens H entre l'Asp214 et la Val216/l'Ala217 (ou entre l'Asn214 et Thr216/Gly217) entre les diverses familles de β -lactamases de classe A et par la grande stabilité de l'Asp214. Néanmoins, ces résultats soulèvent une énième question, plus fondamentale, à laquelle ils ne répondent pas : quel intérêt y a-t-il de fermer le site actif d'une enzyme avec une boucle hydrophobe ?

Je terminerai cet écrit en adaptant la célèbre expression de Lamartine « Un être vous manque et tout est dépeuplé » au nouveau modèle présenté ci-dessus : « Un résidu voit ses interactions modifiées et toute l'enzyme est déstructurée », où le résidu est évidemment l'Asp214.

Annexes

INTRODUCTION

tr Q6SJ61 Q6SJ61_ECOLX	MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP	60
tr Q6W7F6 Q6W7F6_KLEAE	MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP	60
	*****_*****	
tr Q6SJ61 Q6SJ61_ECOLX	EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL	120
tr Q6W7F6 Q6W7F6_KLEAE	EERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRIHYSQNDLVKYSPTTEKHLTDGMTVREL	120
	*****_*****	
tr Q6SJ61 Q6SJ61_ECOLX	CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLEHNMGDHVTSLDSEPELNEAIPNDERDTTM	180
tr Q6W7F6 Q6W7F6_KLEAE	CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLEHNMGDHVTSLDSEPELNEAIPNDERDTTM	180
	***** *****	
tr Q6SJ61 Q6SJ61_ECOLX	PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGSG	240
tr Q6W7F6 Q6W7F6_KLEAE	PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGTGRGSG	240
	*****_*_***	
tr Q6SJ61 Q6SJ61_ECOLX	RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW	286
tr Q6W7F6 Q6W7F6_KLEAE	SGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW	286

Figure 13. Alignement des séquences de TEM-1 et de TEM-121, où tr|Q6SJ61|Q6SJ61_ECOLX correspond à la séquence de TEM-1 (au-dessus) et où tr|Q6W7F6|Q6W7F6_KLEAE correspond à la séquence de TEM-121 (en-dessous).
Les séquences ont été obtenues depuis UNIPROT.

PARTIE I – UN PEU DE BIOLOGIE STRUCTURALE : MODÉLISATION PAR DOCKING

4.1. Comparaison entre TEM-1 et TEM-1_NB

4.1.1. L'ampicilline

4.1.2. La céfalotine et la céfotaxime

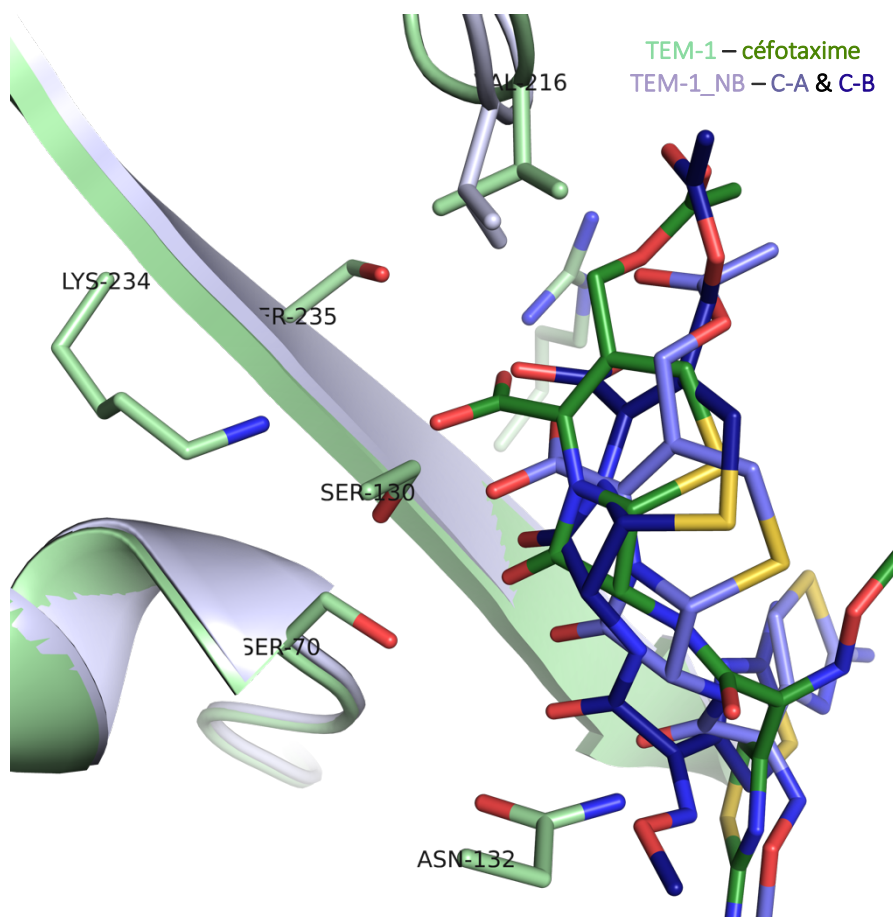


Figure 19. Superposition des conformations de la céfotaxime chez TEM-1 et TEM-1_NB avec : TEM-1 en vert clair et la céfotaxime en vert foncé ; TEM-1_NB en bleu clair, C-A en bleu et C-B en bleu foncé.

4.1.3. La céphaloridine et la nitrocéfine

TEM-1 – nitrocéfine
 TEM-1_NB – cAb_{TEM-1} – nitrocéfine

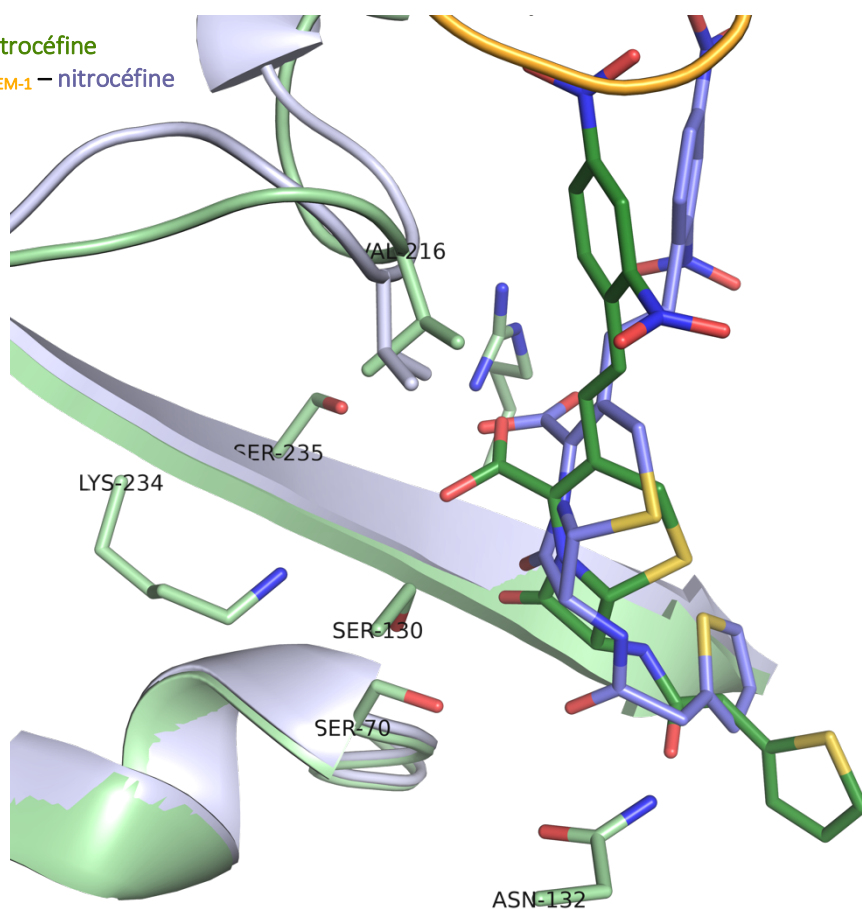


Figure 21. Superposition des conformations de la nitrocéfine chez TEM-1 et TEM-1_NB avec : TEM-1 en vert clair et la nitrocéfine en vert foncé ; TEM-1_NB en bleu clair, la nitrocéfine en bleu foncé et cAb_{TEM-1} en orange.

4.2. Comparaison entre TEM-1_NB et TEM-121_NB

4.2.1. L'ampicilline

4.2.2. La céfalotine et la céfotaxime

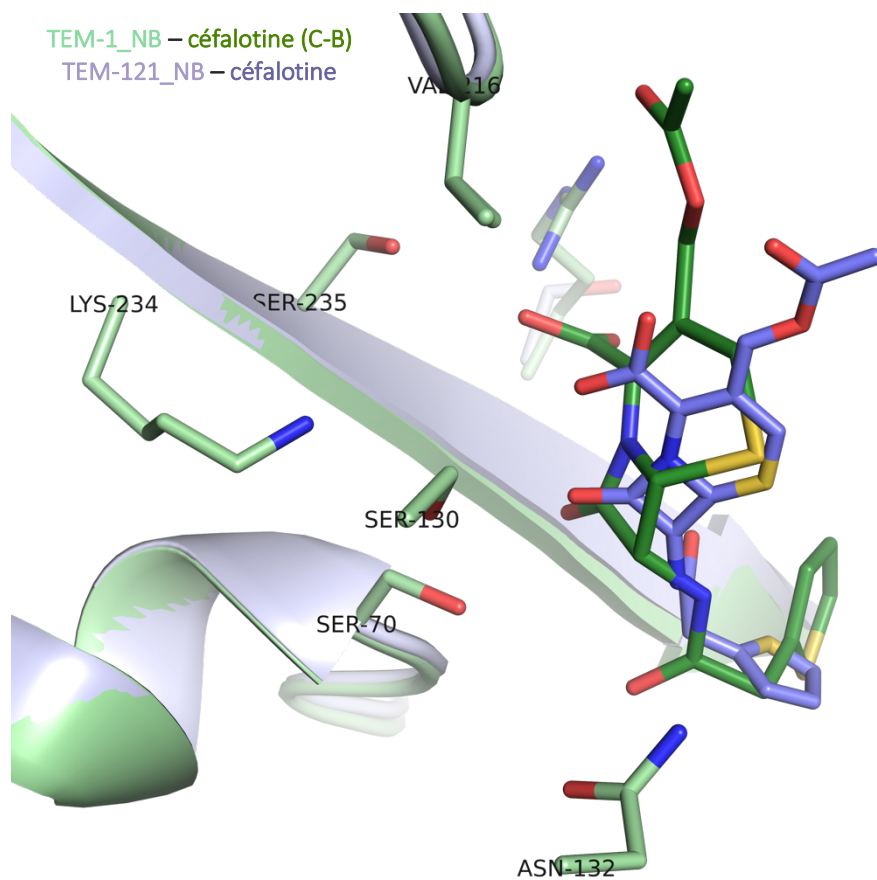


Figure 24. Superposition des conformations de la céfalotine chez TEM-1_NB et de TEM-121_NB avec : TEM-1_NB en vert clair et la céfalotine (C-B) en vert foncé ; TEM-121_NB en bleu clair et la céfalotine en bleu foncé.

4.2.3. La céphaloridine et la nitrocéfine

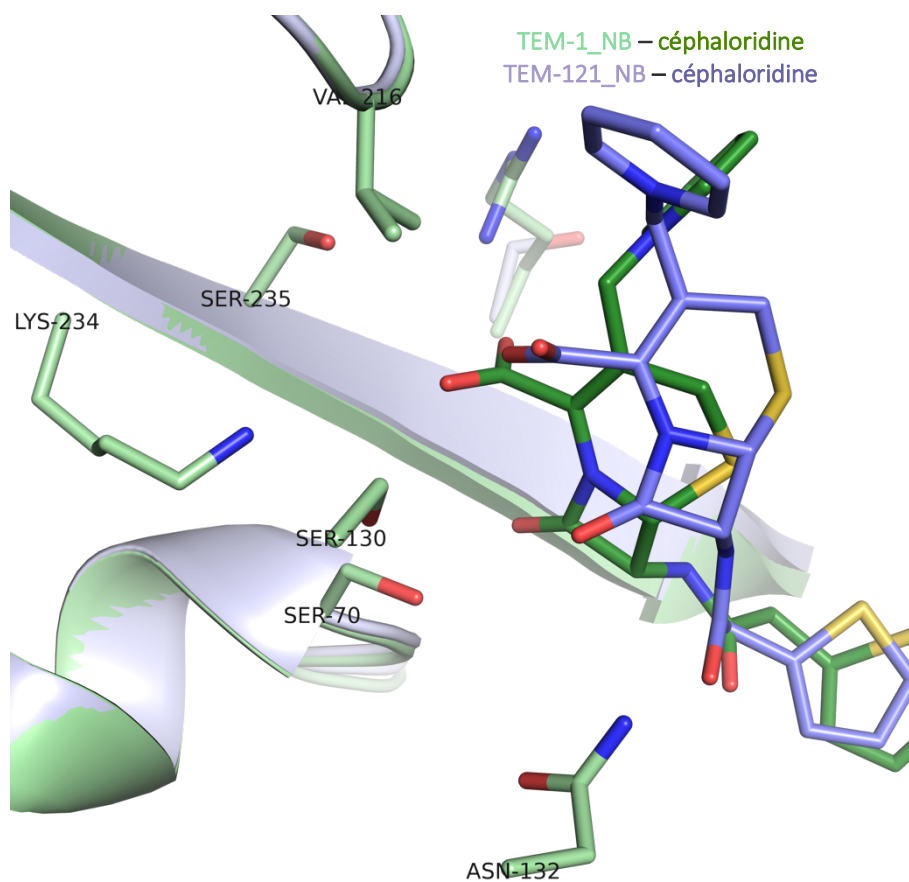


Figure 26. Superposition des conformations de la céphaloridine chez TEM-1_NB et de TEM-121_NB avec : TEM-1_NB en vert clair et la céphaloridine en vert foncé ; TEM-121_NB en bleu clair et la céphaloridine en bleu foncé.

4.2.4. La céfépime et la ceftazidime

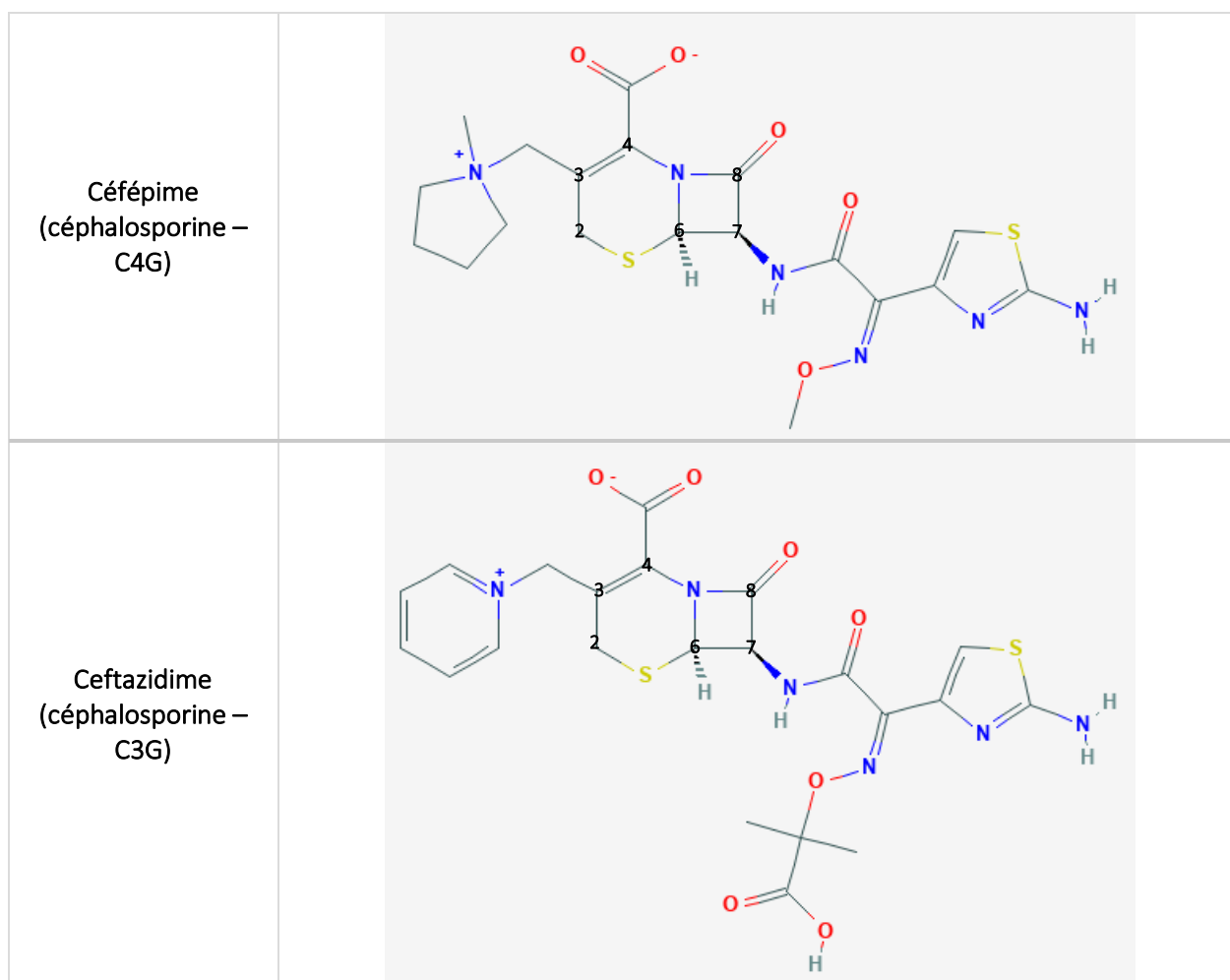


Tableau 7. Structure chimique de la céfépime et de la ceftazidime.

	Trou de l'oxyanion (Å)			Liens polaires (Å)				Répulsion de l'antibiotique (Å)				
	CO- O γ S70	CO- N δ S70	CO- N δ T237	N- O δ T237	N δ CO- N δ 2N132	CO- O γ S130	COOH- O γ S130	COOH- C γ V216	COOH- O γ S235	COOH- N δ K234	COOH- NH δ 1R244	R- C γ V216
CÉFÉPIME												
TEM-121_NB	2.8	3.7	2.0	3.3	3.4	3.7	3.2	2.7	2.0	3.8	/	2.9
CEFTAZIDIME												
TEM-121_NB	4.8	6.4	4.5	4.2	7.3	5.0	4.1	3.6	4.3	5.8	/	5.1

Tableau 8. Récapitulatif des distances mesurées TEM-121_NB pour la céfépime et la ceftazidime.

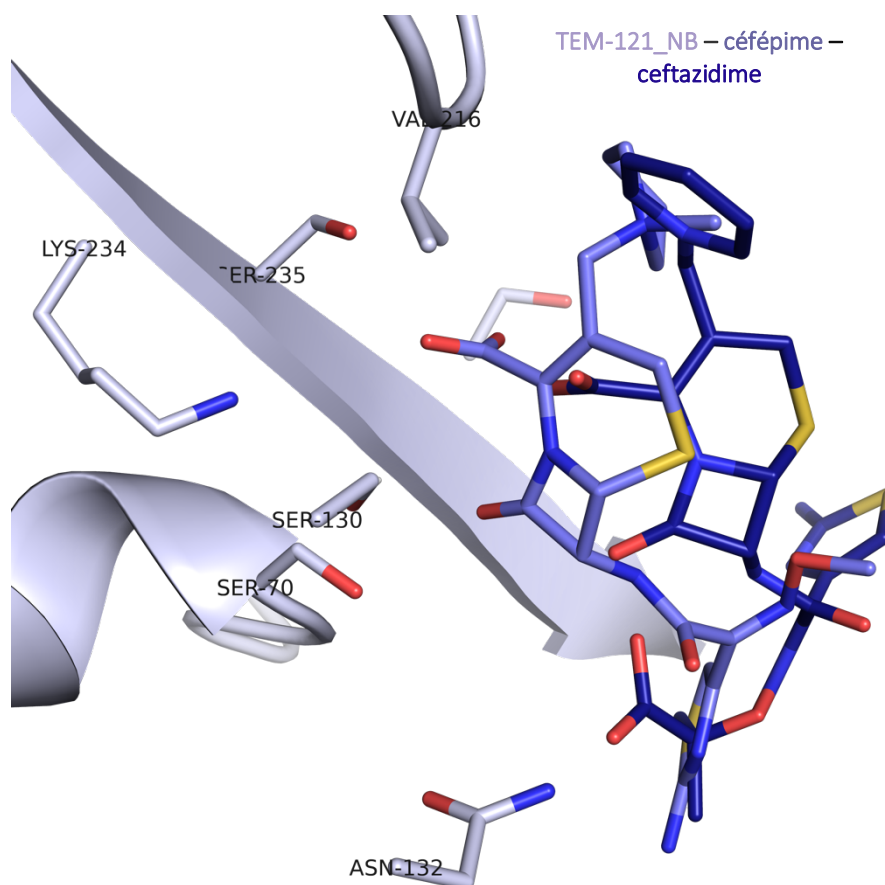


Figure 28. Superposition des conformations de la céfépime et de la ceftazidime chez TEM-121_NB avec : TEM-121_NB en bleu clair, la céfépime en bleu et la ceftazidime en bleu foncé

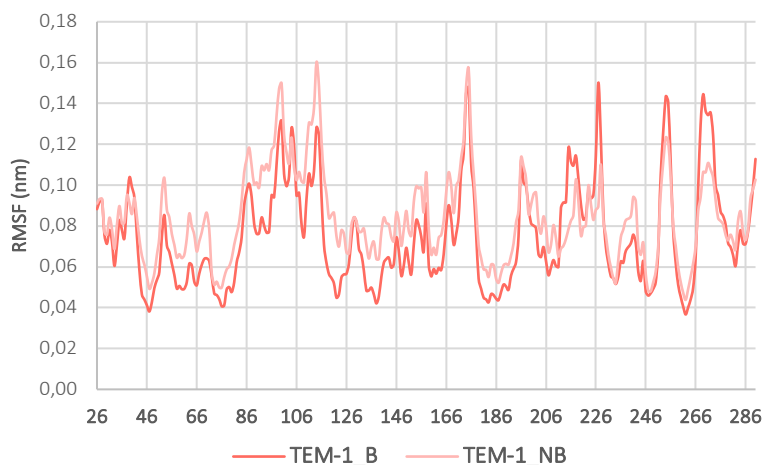
PARTIE II – UN PEU DE DYNAMIQUE : MODÉLISATION DYNAMIQUE & RMN

1.3. Résultats et discussion

1.3.1. Définition : RMSF et RMSD

1.3.2. Contrôles de la modélisation

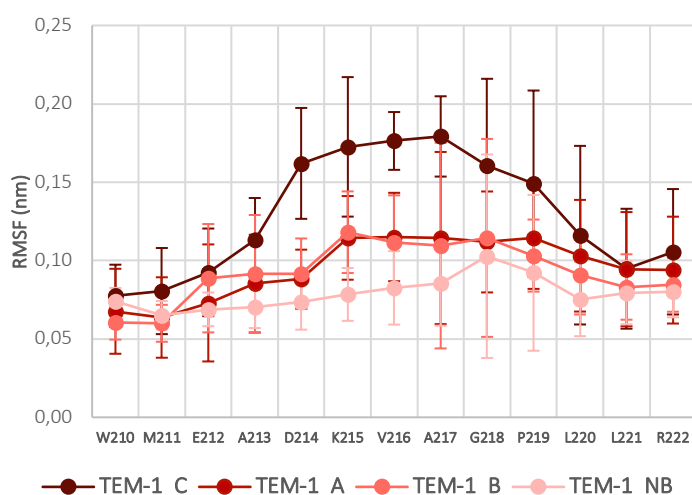
1.3.3. Étude dynamique des modèles protéiques



Graphique 9. Évolution du RMSF (nm) de la chaîne principale de TEM-1_B (rouge foncé) et de TEM-1_NB (rose).

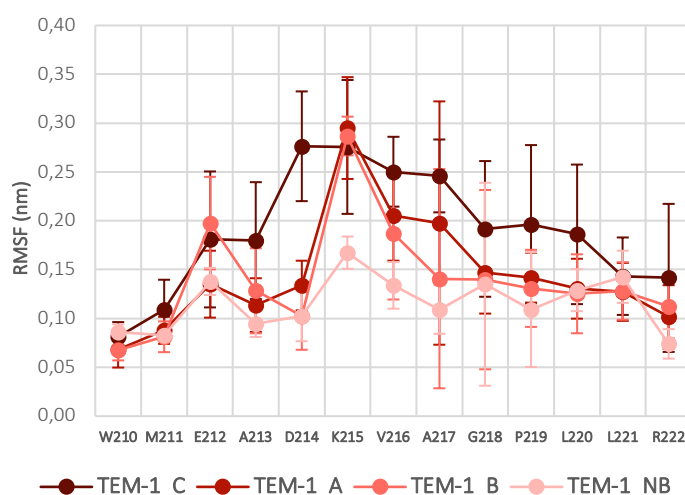
1.3.4. Étude de la dynamique de la boucle Val

RMSF de la chaîne principale



Graphique 11. Évolution du RMSF (nm) des chaînes principales des résidus de la boucle Val pour les quatre modèles de TEM-1 (TEM-1_A, TEM-1_B, TEM-1_C, TEM-1_NB). Le RMSF correspond à la moyenne des cinq simulations réalisées par modèle.

RMSF des chaînes latérales



Graphique 12. Évolution du RMSF (nm) des chaînes latérales des résidus de la boucle Val pour les quatre modèles de TEM-1 (TEM-1_A, TEM-1_B, TEM-1_C, TEM-1_NB). Le RMSF correspond à la moyenne des cinq simulations réalisées par modèle.

CONCLUSION GÉNÉRALE, DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. Remise en contexte & rappels des objectifs
2. Discussion et perspectives pour la modélisation par docking

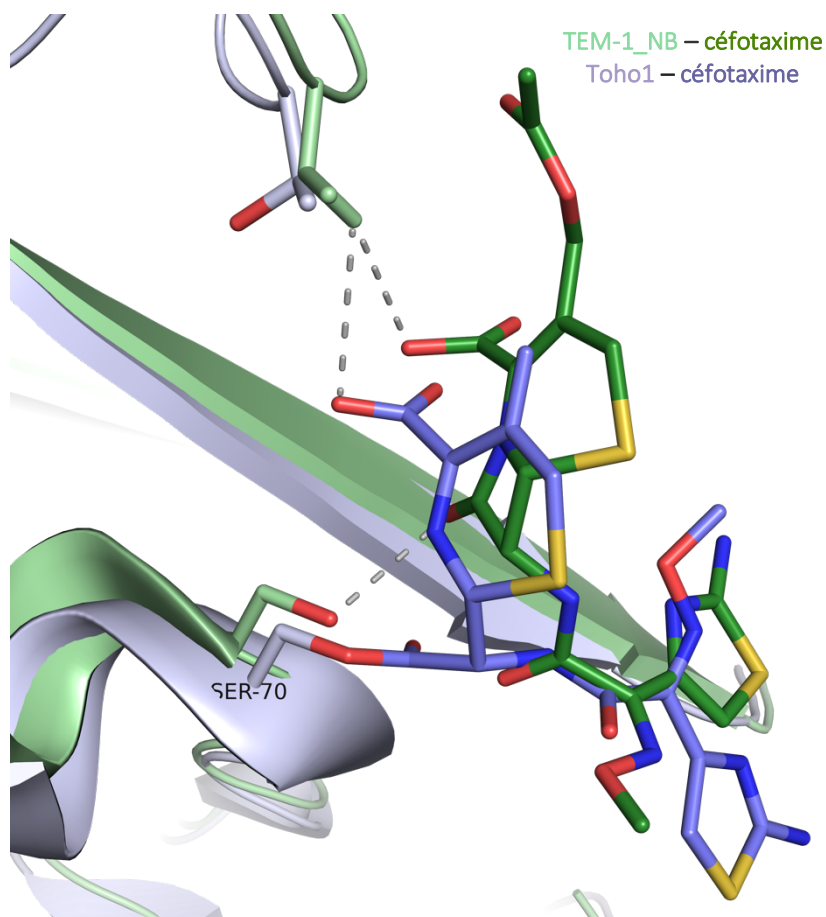


Figure 50. Superposition du modèle de TEM-1 (vert clair) avec la céfotaxime entrante (vert foncé) et de Toho-1 (bleu clair) acylé à la céfotaxime (bleu foncé – PDB : 1IYO). Les traits gris en pointillé montrent les distances de moins de 4 Å.

3. Discussion et perspectives pour la modélisation dynamique
4. Vers l'établissement d'un nouveau modèle ?

Références

Références

- (1) Portraits de Médecins, « Sir Alexander FLEMING », date de dernière mise à jour inconnue, consulté le mercredi 8 avril 2020, disponible sur :
<http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/fleminga.html>
- (2) Wikipédia, « Découverte de la pénicilline », dernière mise à jour le 6 janvier 2020, consulté le mercredi 8 avril 2020, disponible sur :
https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9couverte_de_la_p%C3%A9nicilline
- (3) Wikipédia, « Ernest Duchesne », dernière mise à jour le 8 décembre 2019, consulté le jeudi 14 mai 2020, disponible sur : https://fr.wikipedia.org/wiki/Ernest_Duchesne
- (4) W. Eiamphungporn *et al.* "Tackling the Antibiotic Resistance Caused by Class A β -Lactamases through the Use of β -Lactamase Inhibitory Protein." *Int J Mol Sci.* 2018, 19(8), 2222. doi: 10.3390/ijms19082222
- (5) B. Joris, cours de « Microbiologie, Partim 2 : Bactériologie » (MICR1715-2) donné en 3^{ème} Bachelier en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences, ULiège, année scolaire 2017-2018
- (6) R. Fernandes *et al.* " β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance" *Rev Med Micro.* 2013, 24, p7-17. doi: 10.1097/MRM.0b013e3283587727
- (7) C. Girard-Thernier, « Les β -lactames », dernière mise à jour en 2013, consulté le jeudi 9 avril 2020, disponible sur :
http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2014_Besancon_Girard-Thernier_Beta-lactame/co/2_generalite.html
- (8) K. Bush. "Past and Present Perspectives on β -Lactamases." *Antimicrob Agents Chemother.* 2018, 62(10), e01076-18. doi: 10.1128/AAC.01076-18
- (9) Y. Dia, A. Belarbi, N. Seghiri, « La Résistance Des Bactéries », date de dernière mise à jour inconnue, consulté le samedi 11 avril 2020, disponible sur :
<http://tpe-antibiotiques.doomby.com/pages/la-resistance-des-bacteries.html>
- (10) Les Antibiotiques et Leur Avenir, « La résistance bactérienne », date de dernière mise à jour inconnue, consulté le samedi 11 avril 2020, disponible sur :
<http://antibiotiques-tpe-by-eca.e-monsite.com/pages/resista.html>
- (11) A. Matagne *et al.* "Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity." *Biochem J.* 1998, 330(Pt 2), p581-598. doi: 10.1042/bj3300581
- (12) T. Palzkill. "Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases." *Front Mol Biosci.* 2018, 5, 16. doi: 10.3389/fmolb.2018.00016
- (13) A. Egorov *et al.* "The Role of the Ω -Loop in Regulation of the Catalytic Activity of TEM-Type β -Lactamases." *Biomolecules.* 2019, 9(12). doi: 10.3390/biom9120854
- (14) K. Bush, GA. Jacoby. "Updated Functional Classification of β -Lactamases." *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(3), p969-976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- (15) A. Philippon. "A structure-based classification of class A β -lactamases and bioinformatics." *Bull. Acad. Vét.* 2016, 169, p54-60. doi: 10.4267/2042/60663
- (16) R.P. Ambler. "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980, 289(1036), p321-331. doi: 10.1098/rstb.1980.0049
- (17) M.L. Salverda *et al.* "Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance." *FEMS Microbiol Rev.* 2010, 34(6), p1015-1036. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x
- (18) D.L. Paterson, R.A. Bonomo. "Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update." *Clin Microbiol Rev.* 2005, 18(4), p657-686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- (19) L. Poiriel *et al.* "TEM-121, a Novel Complex Mutant of TEM-Type β -Lactamase from *Enterobacter aerogenes*." *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(12), p4528-4531. doi: 10.1128/AAC.48.12.4528-4531.2004
- (20) T. Modi and S.B. Ozkan. "Mutations Utilize Dynamic Allostery to Confer Resistance in TEM-1 β -lactamase." *Int J Mol Sci.*, 19(12), 3808. doi: 10.3390/ijms19123808
- (21) P. Lassaux, « Caractérisation biochimique et structurale de la métallo- β -lactamase VIM-4. Sélection de nouveaux inhibiteurs de métallo- β -lactamase. », thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP), Laboratoire de Macromolécules Biologiques, Faculté des Sciences, ULiège, 2010
- (22) D. Roccatano *et al.* "Dynamical aspects of TEM-1 β -Lactamase probed by molecular dynamics." *Comput Aided Mol Des.* 2005, 19(5), p329-340. doi: 10.1007/s10822-005-7003-0

Références

- (23) M. Laws *et al.* "Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions." *FEMS Microbio Rev.* 2019, 43(5), p490-516. doi: 10.1093/femsre/fuz014
- (24) K.E. Conrath *et al.* (2001), "β-Lactamase Inhibitors Derived from Single-Domain Antibody Fragments Elicited in the Camelidae." *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45(10), p2807-2812. doi: 10.1128/AAC.45.10.2807-2812.2001
- (25) C. Sadzot, cours de « Immunologie » (IMMU0521-1) donné 3^{ème} Bachelier en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences, ULiège, année scolaire 2017-2018.
- (26) F. Cawez, « Ingénierie de fragments d'anticorps de camélidés (nanobodies) capables de reconnaître des ARNs structurés », mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du grand de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire à finalité approfondie, Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP), Laboratoire de Macromolécules Biologiques, Faculté des Sciences, ULiège, 2017
- (27) S. Muyldermans. "Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies." *Annu Rev Biochem.* 2019, 82, p775-797. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- (28) Y. Wang *et al.* "Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications." *Int J Nanomedicine.* 2016, 11, p3287-3303. doi: 10.2147/IJN.S107194
- (29) K. Bélanger *et al.* "Single-Domain Antibodies as Therapeutic and Imaging Agents for the Treatment of CNS Diseases." *Antibodies (Basel).* 2019, 8(2), 27. doi: 10.3390/antib8020027
- (30) J.S. Sohler *et al.* "Allosteric inhibition of VIM metallo-β-lactamases by a camelid nanobody." *Biochem J.* 2013, 450(3), p477-486. doi: 10.1042/BJ20121305
- (31) J.R. Porter *et al.* "Cooperative Changes in Solvent Exposure Identify Cryptic Pockets, Switches, and Allosteric Coupling." *Biophys. J.* 2019, 116(5), p818-830. doi: 10.1016/j.bpj.2018.11.3144
- (32) K.C. Sivakumar *et al.* "Prospects of multitarget drug designing strategies by linking molecular docking and molecular dynamics to explore the protein–ligand recognition process." *Drug Dev Res.* 2020. doi: 10.1002/ddr.21673
- (33) O. Fiset *et al.* "Molecular Dynamics of Class A β-lactamases – Effects of Substrate Binding." *Biophys J.* 2012, 103(8), p1790-1801. doi: 10.1016/j.bpj.2012.09.009
- (34) G. Nars, « Dynamique fonctionnelle des protéines : études d'une lipase et d'une protéine A de la membrane externe de bactérie », Thèse de l'Université Paul Sabatier, 2015
- (35) A. Borgia *et al.* "Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex." *Nature.* 2018, 555(7694), p61-66. doi: 10.1038/nature25762
- (36) H. Neuweiler *et al.* "Measurement of Submicrosecond Intramolecular Contact Formation in Peptides at the Single-Molecule Level." *J Am Chem Soc.* 2003, 125(18), p5324-5330. doi: 10.1021/ja034040p
- (37) I.R. Kleckner, M.P. Foster. "An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics." *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1814(8), p942-968. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.10.012
- (38) C.A. MacRaid *et al.* "Global Changes in Local Protein Dynamics Reduce the Entropic Cost of Carbohydrate Binding in the Arabinose-binding Protein." *J Mol Biol.* 2007, 368(3), p822-832. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.055
- (39) L.J. Smith *et al.* "The Dynamics of Lysozyme from Bacteriophage Lambda in Solution Probed by NMR and MD Simulations." *ChemBioChem.* 2013, 14(14), p1780-1788. doi: 10.1002/cbic.201300193
- (40) A. Turupcu *et al.* "An NMR and MD study of complexes of bacteriophage lambda lysozyme with tetra- and hexa-N-acetylchitohexaose." *Proteins.* 2020, 88, p82-93. doi: 10.1002/prot.25770
- (41) O. Fiset *et al.* "TEM-1 Backbone Dynamics – Insights from Combined Molecular Dynamics and Nuclear Magnetic Resonance." *Biophys J.* 2010, 98(4), p637-645. doi: 10.1016/j.bpj.2009.08.061
- (42) P.Y. Savard, S.M. Gagné. "Backbone Dynamics of TEM-1 Determined by NMR: Evidence for a Highly Ordered Protein." *Biochemistry.* 2006, 45(38), p11414-11424. doi: 10.1021/bi060414q
- (43) K. Wüthrich, G. Wagner. "NMR investigations of the dynamics of the aromatic amino acid residues in the basic pancreatic trypsin inhibitor." *FEBS Lett.* 1975, 50(2), p265-268. doi: 10.1016/0014-5793(75)80504-7
- (44) L. Pinzi, G. Rastelli. "Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery." *Int J Mol Sci.* 2019, 20(18), 4331. doi: 10.3390/ijms20184331
- (45) I.D. Kuntz *et al.* "A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions." *J Mol Biol.* 1982, 161(2), p269-288. doi: 10.1016/0022-2836(82)90153-x

Références

- (46) ZL. Ji *et al.* "In silico search of putative adverse drug reaction related proteins as a potential tool for facilitating drug adverse effect prediction." *Toxicol Lett.* 2006, 164(2), p104–112. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.11.017
- (47) S.L. Kinnings *et al.* "Drug discovery using chemical systems biology: Repositioning the safe medicine Comtan to treat multi-drug and extensively drug resistant tuberculosis." *PLoS Comput Biol.* 2009, 5(7), e1000423. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000423
- (48) M.A. Phillips *et al.* "Has Molecular Docking Ever Brought us a Medicine?" *IntechOpen*. 2018. doi: 10.5772/intechopen.72898, available from: <https://www.intechopen.com/books/molecular-docking/has-molecular-docking-ever-brought-us-a-medicine->
- (49) J.X. Ren *et al.* "Discovery of novel Pim-1 kinase inhibitors by a hierarchical multistage virtual screening approach based on SVM model, pharmacophore, and molecular docking." *J Chem Inf Model.* 2011, 51(6), p1364–1375. doi: 10.1021/ci100464b
- (50) T. Shimamura *et al.* "Acyl-intermediate structures of the extended-spectrum class A beta-lactamase, Toho-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin." *J Biol Chem.* 2002, 277(48), p46601–46608. doi:10.1074/jbc.M207884200
- (51) Futura Science, « RMN: tout sur la résonance magnétique nucléaire », dernière mise à jour le 18 août 2015, consulté le lundi 11 mai 2020, disponible sur : <https://www.futura-sciences.com/sciences/dossiers/chimie-rmn-tout-resonance-magnetique-nucleaire-1860/>
- (52) G. Nodet, M. Blackledge, « La relaxation en résonance magnétique nucléaire », date de dernière mise à jour inconnue, consulté le lundi 11 mai 2020, disponible sur : http://thcgerm.free.fr/IMG/pdf/Blackledge_1.pdf
- (53) C. Damblon, « Chimie Biologique » (CHIM0729-1), cours donné en 1^{er} Master en Sciences Chimiques, Faculté des Sciences, ULiège, année scolaire 2019-2020
- (54) Protein NMR: A Practical Guide, "Assignment Theory", date de dernière mise à jour inconnue, consulté le mardi 12 mai 2020, disponible sur : <https://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/assignment-theory/>
- (55) Cours sur l'attribution donné le 13 mars 2019 par C. Damblon et M. Wanko, CREMAN, ULiège
- (56) P.Y. Savard *et al.* "1H, 13C and 15N backbone resonance assignments for TEM-1, a 28.9 kDa beta-lactamase from E. coli." *J Biomol NMR.* 2004, 29(3), p433–434. doi: 10.1023/B:JNMR.0000032503.96942.68
- (57) M. Sattler, S.W. Fesik. "Use of deuterium labeling in NMR: overcoming a sizeable problem." *Structure.* 1996, 4(11), p1245–1249. doi: 10.1016/s0969-2126(96)00133-5
- (58) D.C. Marciano *et al.* "Analysis of the plasticity of location of the Arg244 positive charge within the active site of the TEM-1 β -lactamase." *Protein Sci.* 2009, 18(10), p2080–2089. doi: 10.1002/pro.220

Fin

Rien n'est impossible à qui a la volonté

Les proverbes et dictons latins (1876)

Cœur et courage font l'ouvrage

Le dictionnaire des sentences et proverbes français (1892)



« La fin fait partie du voyage »

TS

