

Université de Montréal

**Analyses mutationnelles et cinétiques de la β -lactamase
TEM-1 de *Escherichia coli*
Vers une meilleure compréhension du phénomène de résistance
aux antibiotiques**

par

Pierre-Yves De Wals

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *M.Sc.*
en biochimie

Avril 2007

© Pierre-Yves De Wals, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Analyses mutationnelles et cinétiques de la β -lactamase TEM-1 de *Escherichia coli* : vers
une meilleure compréhension du phénomène de résistance aux antibiotiques

présenté par :
Pierre-Yves De Wals

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Serguei V. Chteinberg, président-rapporteur
Joelle N. Pelletier, directrice de recherche
Jeffrey W. Keillor, membre du jury

Résumé

La β -lactamase TEM-1 catalyse l'hydrolyse des antibiotiques β -lactames et est la principale enzyme responsable de l'apparition de résistance envers cette classe d'antibiotiques. Deux analyses fonctionnelles furent menées sur TEM-1 : premièrement, le résidu Y105 fut muté par saturation afin d'élucider son rôle dans la reconnaissance des substrats et l'activité enzymatique. Les résultats de résistance *in vivo* des mutants (CMI) en présence de pénicillines et de céphalosporines de première génération indiquent que les résidus aromatiques confèrent un haut niveau de résistance, tandis que Ala et Gly permettent une faible discrimination de substrats. La cinétique enzymatique démontre une plus grande perturbation du K_M que du k_{cat} , et donc une importance du résidu 105 dans la reconnaissance du substrat. L'analyse des dynamiques moléculaires indique que le biais pour les résidus aromatiques est nécessaire afin que ceux-ci puissent former une paroi stabilisatrice du site actif, empêchant le déplacement du substrat et donc la formation d'interactions stériques défavorables. Ensuite, Y105 et quatre autres résidus du site actif de TEM-1 (E104, G238, E240 et R244) furent mutés simultanément par saturation et une sélection pour l'acquisition de résistance au céfotaxime (CTX, céphalosporine de troisième génération) fut appliquée. Les CMI de tous les mutants démontrent une augmentation de résistance envers le CTX et une réduction envers les pénicillines. La cinétique enzymatique révèle que les mutants ont amélioré leur affinité envers tous les substrats, tandis que leur efficacité catalytique est améliorée pour les céphalosporines mais réduite pour les pénicillines. La conservation d'un haut niveau d'activité de TEM-1, suite à l'introduction simultanée de plusieurs mutations à son site actif semble attester d'un certain niveau de robustesse de l'enzyme. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires menant à l'apparition de souches résistantes permettra de mieux cerner cette problématique et mènera éventuellement au développement de nouveaux antibiotiques.

Mots-clés : mutagenèse combinatoire, résistance aux antibiotiques, β -lactame, structure-fonction, concentration minimale inhibitrice, cinétique enzymatique, promiscuité

Abstract

TEM-1 β -lactamase catalyzes the hydrolysis of β -lactam compounds and is the most prevalent enzyme responsible for resistance toward this class of antibiotics. Two functional analyses were undertaken on TEM-1: firstly, residue Y105 was substituted by site-saturation mutagenesis in order to better understand its role in substrate recognition and enzyme activity. *In vivo* minimum inhibitory concentrations (MICs) assays with penicillins and first-generation cephalosporins reveal that aromatic residues confer a high level of resistance, whereas Ala and Gly provide for weak substrate discrimination. Enzyme kinetics show a greater perturbation of K_M than of k_{cat} , thus indicating the importance of residue 105 in substrate recognition. Molecular dynamics simulations indicated that the bias toward aromatic residues originates from the requirement for the formation of a stabilizing wall at the active site, thus preventing substrate displacement and the formation of unfavourable interactions. In a second experiment, Y105 and four other active-site residues of TEM-1 β -lactamase (E104, G238, E240 and R244) were simultaneously mutated by saturation and mutants were selected for acquired resistance to the third-generation cephalosporin cefotaxime (CTX). MICs of the combinatorial mutants show increased CTX resistance and decreased penicillin resistance. Analysis of kinetic parameters demonstrates that all mutants have enhanced affinities toward both penicillins and cephalosporins (first- and third-generations) but only increased catalytic efficiencies toward cephalosporins. Selection of functional mutants demonstrates a certain degree of plasticity of TEM-1 upon multiple active-site mutations, leading to substrate spectrum diversification. A better understanding of the molecular basis for increased antibiotic resistance may help in the prediction of the emergence of such resistant strains and may eventually lead to development of new antibiotic molecules.

Keywords : combinatorial mutagenesis, semi-random approach, antibiotic resistance, β -lactam, structure-function, minimum inhibitory concentration, enzyme kinetics, substrate promiscuity

Table des matières

Chapitre 1 – Introduction.....	9
Section 1.0 – Avant-propos	9
Section 1.1 – Historique	9
Section 1.2 – Problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	10
Section 1.3 – Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de type β -lactames.....	13
Section 1.3.1 – Perméabilité membranaire	14
Section 1.3.2 – Pompes à efflux.....	15
Section 1.3.3 – Modification des cibles des antibiotiques β -lactames.....	15
Section 1.3.4 – Modification enzymatique de l’antibiotique et transfert de matériel génétique	17
Section 1.4 – Les antibiotiques β -lactames	19
Section 1.4.1 – Le mode d’action des antibiotiques β -lactames	20
Section 1.5 – Les β -lactamases.....	22
Section 1.5.1 – TEM-1, une β -lactamase de classe A.....	22
Section 1.6 – La résistance bactérienne conférée par la β -lactamase TEM-1 : survol du mécanisme réactionnel	30
Section 1.7 – Mutagenèse combinatoire sur les β -lactamases de classe A	31
Section 1.8 – Objectifs et présentation de la recherche	33
Section 1.9 – Justification des méthodes expérimentales.....	34
Section 1.9.1 – Biologie moléculaire et design semi-rationnel.....	34
Section 1.9.2 – Concentrations minimales inhibitrices.....	35
Section 1.9.3 – Cinétique enzymatique.....	36
Section 1.9.4 – Modélisation moléculaire.....	36

Chapitre 2 – Résultats	38
Article 1. Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its Importance in Substrate Stabilization and Discrimination in TEM-1 β -Lactamase	38
Section 2.1 – Présentation de l’article et mise en contexte	39
ABSTRACT	42
INTRODUCTION	42
EXPERIMENTAL PROCEDURES	45
RESULTS	50
DISCUSSION	68
Chapitre 3 – Résultats	77
Article 2. Combinatorial Active-Site Mutagenesis in TEM-1 β -Lactamase: Probing for Cooperativity Between Key Residues.....	77
Section 3.1 - Présentation de l’article et mise en contexte	78
ABSTRACT	82
INTRODUCTION	83
MATERIALS AND METHODS.....	88
RESULTS	92
CONCLUSION.....	112
Chapitre 4	118
Section 4.1 - Conclusion	118

Bibliographie	133
Annexe 1	141
Annexe 2	158
Annexe 3	160
Annexe 4	164

Liste des tableaux

Chapitre 2

Table 2.I MICs of <i>E. coli</i> XL1-Blue cells expressing TEM-1 β -lactamase with Tyr-105 replacements.....	53
Table 2.II Sequence alignment of residues 103–107 for major representatives of Class-A β -lactamase	56
Table 2.III Kinetic parameters for wild-type TEM-1 β -lactamase and Y105X mutant derivatives.	59

Chapitre 3

Table 3.I Identification of TEM-1 β -lactamase mutants selected on media containing 250 ng/mL CTX.	94
Table 3.II Minimum inhibitory concentrations of <i>E. coli</i> XL1-Blue cells containing wild-type or mutant β -lactamases.....	96
Table 3.III Kinetic parameters for wild-type TEM-1 β -lactamase and the combinatorial mutants.	99

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 Structure des classes d'antibiotiques β -lactames les plus communément répertoriées dans la littérature	12
Figure 1.2 Comparaison structurelle entre les peptidoglycanes et les antibiotiques β -lactames.....	21
Figure 1.3 Représentation de la β -lactamase TEM-1, illustrant les éléments de structures secondaires	24
Figure 1.4 Conservation de motifs chez la β -lactamase TEM-1	26
Figure 1.5 Représentation du site actif de la β -lactamase TEM-1	28

Chapitre 2

Figure 2.1 Structures of β -lactam antibiotics used in this study	52
Figure 2.2 Superimposition of residues 104–107 of 5 Class A β -lactamases crystal structures	62
Figure 2.3 Superimpositions of snapshots from a 200-ps molecular dynamics simulation of various Y105X mutants of TEM-1	65

Figure 2.4 Conformation of benzylpenicillin in the active site of wild-type TEM-1 (A) and mutant Y105G.....	66
--	----

Chapitre 3

Figure 3.1 Structure of the β -lactam antibiotics used in this study.....	84
--	----

Figure 3.2 Schematic representation of the active site of TEM-1 β -lactamase	87
---	----

Figure 3.3 Comparison of catalytic efficiencies of wild-type TEM-1 β -lactamase with the mutants	110
---	-----

Liste des abréviations

AMP:	<i>ampicilline</i>	k_{cat} :	<i>constante de vitesse d'une réaction enzymatique (turnover number)</i>
BZ:	<i>benzylpénicilline</i>		
CZ:	<i>céfazoline</i>	K_M :	<i>constante Michaelis-Menten (affinité d'une enzyme envers un substrat)</i>
CTX:	<i>céfotaxime</i>		
CAZ:	<i>ceftazidime</i>	NAG:	<i>N-acétyle-D-glucosamine</i>
CF:	<i>céphalothine</i>	NAM:	<i>acide N-acétyle-muramique</i>
CMI:	<i>concentration minimale inhibitrice</i>	PBP:	<i>Penicillin-binding protein</i>
D-Ala-D-Ala:	<i>D-alanyl-D-alanine</i>	SHV:	<i>β-lactamase SHV (classe A)</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>	[S]:	<i>concentration de substrat</i>
ESBL:	<i>Extended-spectrum β-lactamase</i>	TEM-1:	<i>β-lactamase TEM-1 (classe A)</i>
ε :	<i>coefficient d'extinction molaire</i>	V :	<i>vitesse d'une réaction enzymatique</i>
		Xaa:	<i>désigne toutes les possibilités d'acides aminés à une position de l'enzyme</i>

*Ce mémoire est dédié à mon père, Philippe et
à ma mère, Martine. Pour tout ce que vous
avez fait pour moi, tout ce que le mot
« merci » ne pourra jamais exprimer. Autant
l'éducation que vous m'avez donnée pouvait
paraître dure à travers les yeux d'un enfant,
autant je vous en serai reconnaissant pour le
restant de ma vie. Vous m'avez préparé au
monde et vous m'en avez ouvert les portes...*

Remerciements

Commencer une nouvelle étape dans la vie amène toujours son lot d'incertitudes, de craintes, mais aussi d'anticipation et d'excitation face à ce qui nous attend. Quand j'appris durant mon baccalauréat que je devrais effectuer un stage obligatoire en laboratoire, je me demandai comment j'y arriverais. Et j'appliquai chez Joelle. Dès notre premier contact et après avoir rencontré les membres du laboratoire, je compris qu'il y avait là plus qu'un groupe de recherche. Et le stage débuta. En quatre mois de travail au laboratoire, j'avais non seulement rencontré des collègues de travail stimulants, mais je m'étais fait de nouveaux amis, j'avais pris goût à la recherche et je voulais revenir y faire ma maîtrise. C'est fou comment quelques semaines passées dans un nouvel environnement vous changent et vous font voir bien des choses d'un autre œil. Moi, l'élève timide qui abhorrait le moment où je serais laissé à moi-même au laboratoire, je découvrais une indépendance jusqu'alors insoupçonnée.

Joelle fait plus qu'encadrer ses étudiants, elle leur fournit l'environnement et les outils nécessaires à leur réussite tout en leur laissant assez d'indépendance pour pouvoir grandir et éventuellement prendre leur envol. Joelle est plus qu'une directrice de recherche, c'est une personne avec laquelle on développe une amitié, quelqu'un qui n'hésite pas à participer aux activités du groupe, sauf peut-être depuis ce souper chez Eduardo... Je ne saurais te remercier assez pour ta disponibilité, tes encouragements et cette façon de donner des ordres qui, dans le fond, est plus une manière détournée de nous pousser à se dépasser (*Get to work !*). Quand j'eus Joelle comme professeur de chimie organique en deuxième année de baccalauréat, sans savoir que j'allais atterrir dans son laboratoire, je sus qu'elle ferait partie de ces profs qui laissent une marque indélébile, ceux qui te font dévier de ta trajectoire. Avoir passé mes trois dernières années à l'Université de Montréal dans son laboratoire fut plus qu'un privilège. Ce fut l'école de la science, l'école de la vie. Et ça, pour quelqu'un qui rêve de devenir enseignant, ça représente énormément. Et ça fait rêver. Merci Joelle.

Merci à toutes les personnes qui sont passées par le laboratoire au fil des ans : Andreea Schmitzer, Audrey Tousignant, Tan Wang, Jijun Hao, Audrey Nisole, Steve Gillet, Farah-Jade Dryburgh, Jessica Laroche, Krista Morley, Elena Fossati, Lucie Poulain, Jonathan Blanchet et Valerio Vinci (sans compter tous les stagiaires, surtout ceux qui portaient des pantalons sans trous). Merci pour l'aide au laboratoire, pour les discussions intéressantes, pour les activités qui furent toutes agréables en votre compagnie, pour les petits u, pour les niaiseries et les souvenirs à profusion qui sont dans ma mémoire gravés à jamais. Un grand merci également aux membres actuels et anciens du labo Keillor, nos voisins de l'aile F-500.

Un merci particulier à trois membres du laboratoire qui étaient là depuis le début et avec qui j'aurai passé beaucoup de temps ces trois dernières années. Merci à Nicolas Doucet, mon mentor et frère d'arme dans la lutte à la résistance bactérienne aux antibiotiques. Tes connaissances scientifiques, artistiques, politiques et informatiques (tu vois, là je suis capable de faire des images en haute résolution !) m'auront toujours impressionné : que ce soit pour engager un débat sur « l'heure » du dîner ou bien lors des nombreux : « Man, P-Y tu savais pas ça ? ». Ta passion pour la musique et les films (leur encodage bien entendu !) m'aura permis d'élargir mes horizons artistiques. Sans compter tous les protocoles détaillés pour encoder un CD ou un DVD dans les règles de l'art et sur la manière de rédiger sa liste... Tu es le genre de personne que j'aurais aimé côtoyer plus longtemps et ne voudrais certainement pas perdre de vue.

Merci à Jordan Volpato, éternel *entertainer*, imitateur inimitable, *overmouther* en puissance, mais surtout personnage fascinant pour sa multidisciplinarité, sa mémoire d'éléphant et ses commentaires à se rouler par terre. De cette première rencontre au Crocodile dans le cadre de Bol & Bolles, je sus que je rencontrais quelqu'un de particulier. Puis, de party en party, d'activité en activité, jusqu'à en arriver à devenir accro aux soirées Occupation Double, j'aurai passé des moments inoubliables en ta compagnie. Que ce soit pour sortir un cri bestial en plein restaurant ou simplement pour amener de la vie dans un

party, ta présence en public devrait être imposée, on se prendrait pas mal moins au sérieux. Alors peu importe où ton chemin te mènera, tout le monde t'entendra t'éloigner au loin...

Merci (quand même) à Roberto Chica. Tu n'es pas si étrange et bizarre que les gens le prétendent, tu as un caractère particulier, un sens de la répartie assez bien développé et une manière sympathique de constamment harceler les gens, du moins les Belges. Quoiqu'il en soit, ta rigueur et ta curiosité, ton intellect et ta persévérance pourraient faire de toi un excellent directeur de recherche. Je te promets de ne plus avoir de préjugés envers la *classic rock*, à condition que tu me promettes d'aller en Belgique pour ouvrir les yeux sur une réalité qui t'es inconnue. Tu y verras qu'il y a des Belges qui courent, certains n'hésitent pas à faire des *high five*, d'autres sont même très loquaces, tu t'y plairais je crois. *You know what I'm sayin' Bobby ? P !*

Pour tous ces moments passés ensemble. Vous m'aurez initié à la route des CDs entrecoupée d'un savoureux Basha, les nombreux BKs, ces soupers pas de classe sur Duluth. Tant d'histoires et de souvenirs impérissables qui auront rendu ces 3-4 dernières années si agréables. Vous aurez été plus que de simples collègues de travail : de bons amis.

Je ne saurais passer sous silence tous les amis que j'aurai eus à mes côtés durant mes études à Montréal. Je ne connaissais personne en arrivant ici il y a 6 ans et je repartirai le cœur et la tête gros de souvenirs. Cette bande d'amis, tellement disparate, aux personnalités si souvent contradictoires qui aura résisté à l'effritement des années aura été comme une arche sur les flots de nos études : solide dans les moments difficiles, légère et agréable par temps calme et finalement petit à petit délestée du poids de ceux partis vers d'autres rivages. Merci pour ce bel esprit de groupe qui me manquera à coup sûr.

Merci aux organismes subventionnaires pour le financement: les bourses de la faculté des études supérieures, ainsi que la Fondation Luigi Liberatore.

A scientific man ought to have no wishes, no affections, - a mere heart of stone.
Charles Darwin (1809-1882)

It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change.
Charles Darwin (1809-1882)

The tendency has always been strong to believe that whatever received a name must be an entity or being, having an independent existence of its own. And if no real entity answering to the name could be found, men did not for that reason suppose that none existed, but imagined that it was something peculiarly abstruse and mysterious.
John Stuart Mill (1806-1873)

La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité, le flambeau qui éclaire le monde.
Louis Pasteur (1822-1895)

Technology is the knack of so arranging the world that we do not experience it.
Max Frisch (1911-1991)

Love hides in molecular structures.
Jim Morrison (1943-1971)

Chapitre 1 – Introduction

Section 1.0 – Avant-propos

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est beaucoup plus vaste et complexe que ce dont il sera question au cours de ce mémoire. Étant donné l'étendue de la problématique et l'intérêt spécifique de ces travaux, l'emphase sera mise sur l'apparition de résistance causée par les β -lactamases de classe A et plus particulièrement par l'enzyme TEM-1. Les multiples causes de la résistance des bactéries aux antibiotiques de type β -lactames seront présentées. Il sera ensuite question des substrats de la β -lactamase, ainsi que de leur mode d'action, avant de rentrer dans la description de l'enzyme TEM-1. Bien que l'emphase de ce document soit mise sur la caractérisation de mutants de la β -lactamase TEM-1 ayant acquis une nouvelle spécificité de substrat et que la compréhension de cette analyse ne requiert pas une assimilation complète de la littérature entourant le sujet, il est toutefois pertinent de présenter une vue plus globale du sujet. Ainsi, certains concepts dont les diverses origines de résistance (non enzymatiques) et le mécanisme catalytique de l'enzyme, seront présentés brièvement, car leur compréhension est complémentaire à la présentation de thèmes-clefs présentés dans ce mémoire.

Section 1.1 – Historique

Les premières indications de traitement d'infections bactériennes par l'application topique d'agents aux propriétés antibiotiques remontent à plusieurs milliers d'années, du temps des grandes dynasties. Des écrits remontant jusqu'en 2500 avant notre ère, nous indiquent que les Chinois ainsi que les Égyptiens traitaient des blessures avec de la myrrhe, des moisissures provenant du soja, des concoctions de miel et de graisses ou encore de la malachite et du vert-de-gris qui contiennent des sels de soufre aux propriétés antiseptiques [1]. La première observation d'une activité antibactérienne rapportée dans la littérature fut

réalisée par Alexander Fleming en 1928, lorsqu'une moisissure de type *Penicillium notatum* ayant contaminé des colonies de staphylocoques sur une boîte de pétri eut entraîné leur lyse [2]. La pénicilline venait d'être découverte par accident. Tandis qu'antérieurement d'autres chercheurs avaient déjà observé des phénomènes similaires, Fleming fut le premier à conceptualiser le potentiel antibactérien de certains micro-organismes, sans toutefois capitaliser sur sa découverte. Avant l'avènement de la pénicilline, la toxicité des composés chimiothérapeutiques limitait leur diffusion à plus grande échelle. Entre le moment de la découverte de la pénicilline et sa mise en application clinique, un pathologiste allemand du nom de Gerhard Domagk qui testait des teintures contre certaines souches bactériennes, découvrit leur potentiel antibactérien en soignant des souris infectées aux streptocoques. On comprit plus tard que ce composé était métabolisé en sulfanilamide et ouvrait la voie au développement de nouveaux agents antibactériens, dont toute la classe des sulfonamides (*sulfa drugs*) [1]. L'arrivée de la Seconde Guerre mondiale entraîna un développement effréné de nouvelles molécules aux vertus chimiothérapeutiques dont nous exploitons encore le potentiel bénéfique sur notre santé. La benzylpénicilline (BZ; pénicilline G), faisant partie de la famille des β -lactames, fut le premier antibiotique naturel à être introduit en milieu hospitalier. Dès l'application clinique des premiers antibiotiques de la famille des β -lactames, ces agents antibactériens ont joui d'une utilisation abusive qui mena à une pression sélective responsable de l'apparition de multiples souches bactériennes résistantes à ces antibiotiques.

Section 1.2 – Problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques

Étant donné la pharmacopée mise à notre disposition, nous sommes en mesure de nous questionner sur la pertinence de développer de nouveaux agents antibactériens ou d'améliorer ceux déjà connus. La réponse à cette question découle de faits alarmants qui

ont propulsé la recherche pour de nouveaux antibiotiques. Six ans avant l'introduction clinique de la BZ, Abraham et Chain découvraient une souche de la bactérie *Escherichia coli* capable d'hydrolyser le noyau β -lactame de l'antibiotique (Figure 1.1), inactivant ce dernier [3]. Les premiers comptes rendus d'isolats bactériens provenant de milieux hospitaliers démontraient le rapide développement de mécanismes de résistance aux antibiotiques prescrits [4]. Non seulement la prévalence de souches résistantes croissait, mais la dissémination de ce phénotype à travers le règne bactérien rendait la problématique graduellement insurmontable. L'année de l'approbation de la pénicilline aux États-Unis (1946), à peine plus de 10% d'isolats de *Staphylococcus aureus* démontraient une résistance à l'antibiotique. Cette proportion grimpa à près de 40% l'année suivante pour atteindre 60% en 1948 et 80% en 1953 [4]. Il était clair que le monde développé allait subir une pandémie d'infections bactériennes associées aux hôpitaux. Il fallut patienter jusqu'à la seconde moitié du XX^{ième} siècle avant l'introduction d'une nouvelle génération de pénicillines, ainsi que des céphalosporines [5] (Figure 1.1). Ces dernières, quoique faisant partie de la classe des β -lactames, s'avèrent plus efficaces que les pénicillines, notamment grâce à une meilleure perméabilité à travers la membrane des souches de type Gram-négatif [4]. Dans les années qui suivirent, d'autres antibiotiques furent approuvés afin d'élargir le spectre d'action. Mais, comme dans le cas des pénicillines, l'apparition de souches résistantes rendait futiles les efforts pour contrecarrer ce phénomène. Bien que la résistance bactérienne aux antibiotiques soit un enjeu d'envergure aux origines multiples et complexes, ce document se concentrera sur la résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactames, ainsi que sur la classe d'enzymes responsables de ce phénomène, soient les β -lactamases.

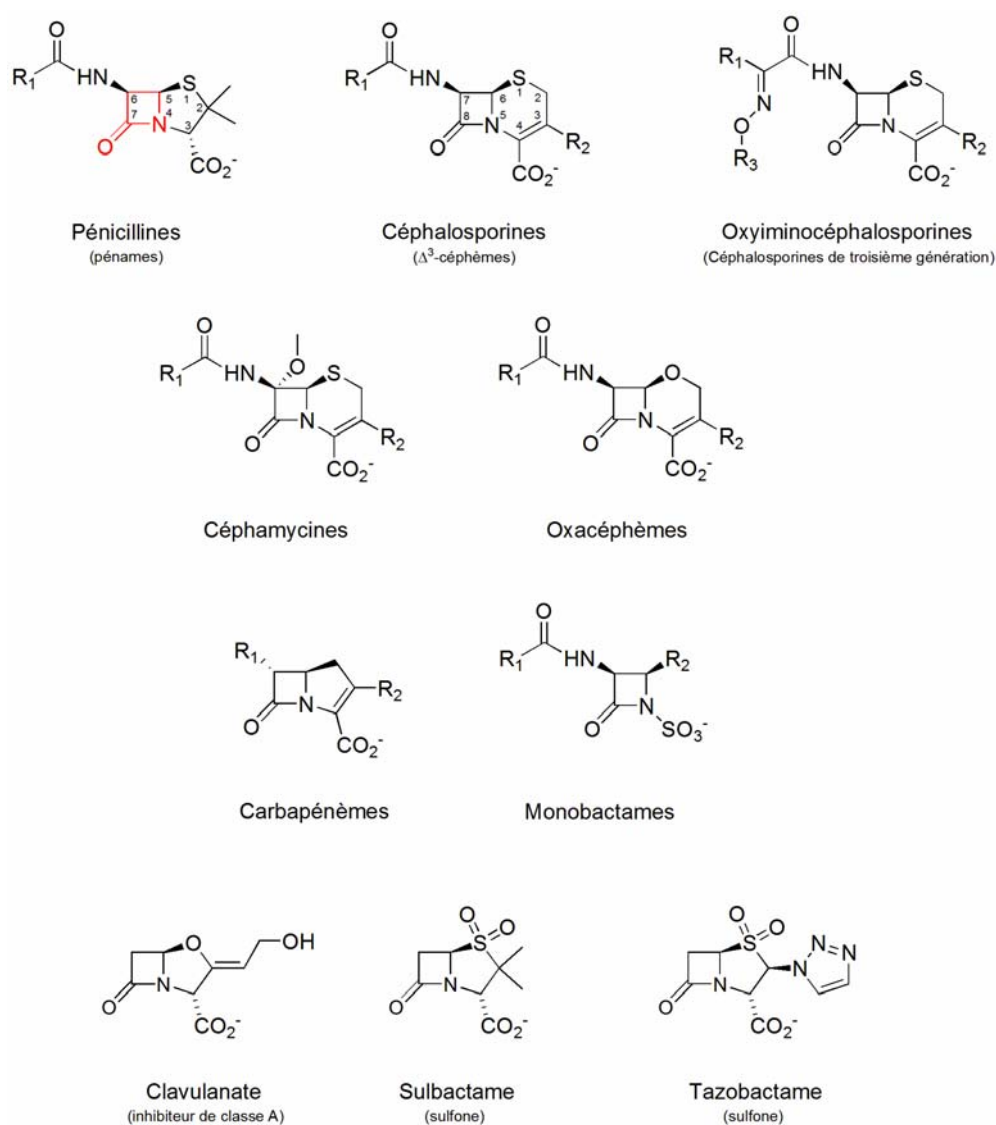


Figure 1.1 Structure des classes d'antibiotiques β -lactames les plus communément répertoriées dans la littérature. Toutes les structures ont en commun le noyau β -lactame (rouge) dont le lien amide représente le site de clivage par les β -lactamases. Les trois structures du bas sont des inhibiteurs et se subdivisent en 2 classes, soient les inhibiteurs de classe A et les sulfones. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, USA).

Section 1.3 – Les mécanismes de résistance aux antibiotiques de type β -lactames

Avant toute intervention humaine, les micro-organismes vivaient en équilibre avec leur environnement depuis environ 3,5 milliards d'années d'évolution [4]. Cependant, la tendance des humains à aseptiser leur environnement a mené à une perturbation de cet équilibre, entraînant ainsi un combat acharné avec ces organismes. Depuis l'avènement des antibiotiques, de nombreux micro-organismes ont développé diverses stratégies afin de déjouer le potentiel d'action de ces molécules. Les mécanismes de résistance sont presque aussi nombreux que les classes de molécules aux propriétés antibiotiques. Bien que l'emphase de ce document soit mise sur la famille des β -lactames, d'autres classes d'antibiotiques comme les glycopeptides, les aminoglycosides, les macrolides, les tétracyclines, les quinolones, les sulfonamides et les analogues de l'acide folique visent d'autres cibles [6,7]. Le phénomène de résistance aux antibiotiques a plusieurs origines. On soupçonne certains organismes, qu'ils soient fungus ou bactéries, d'avoir développé des stratégies de survie basées sur la synthèse d'un antibiotique particulier afin de se protéger contre des agents pathogènes. Ces mêmes organismes sont ainsi contraints de développer un moyen d'échapper à l'action de l'antibiotique afin d'éviter le suicide de la cellule. Cela permet aux organismes de se débarrasser d'autres organismes avec lesquels ils entrent en compétition pour les ressources environnementales [4]. Depuis l'introduction des antibiotiques en milieu hospitalier, la rapidité avec laquelle les micro-organismes ont acquis un profil de résistance envers certains agents antibactériens est déconcertante (Annexe 1). Avant que l'on ne prenne pleine mesure de l'ampleur de la problématique existante, l'utilisation à outrance de certains antibiotiques a mené tout droit à l'établissement d'une pression sélective favorisant l'émergence de souches résistantes à un point tel que des souches résistantes aux antibiotiques β -lactames ont même été prélevées chez des patients n'ayant jamais été mis en contact avec cette classe d'antibiotiques [4]. Une mauvaise

gestion de la problématique a entraîné une sélection clinique des souches. Celles-ci sont responsables de l'amplification des gènes de résistance, autrefois relativement rares et qui sont maintenant largement disséminés à travers la population bactérienne.

Section 1.3.1 – Perméabilité membranaire

Plusieurs mécanismes ont été mis au point afin de réprimer le potentiel antibactérien des antibiotiques. La première barrière rencontrée par une molécule antibiotique est la paroi cellulaire. La perméabilité de la membrane externe des bactéries aux antibiotiques relève de multiples facteurs physiques et biochimiques [8]. De manière générale, les antibiotiques β -lactames diffusent à travers la membrane plasmique en empruntant la voie des porines qui est en soi un mécanisme non spécifique [9]. Plusieurs espèces sont reconnues pour exhiber différentes perméabilités membranaires, notamment celle de *Pseudomonas aeruginosa* dont la perméabilité aux céphalosporines est réduite d'environ deux ordres de grandeur en comparaison à celle de *E. coli* [9]. De plus, la pénétration des antibiotiques à travers les canaux membranaires est grandement influencée par l'hydrophobie de la molécule, plutôt que par son poids moléculaire [10]. Dans les cas de *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*, la résistance est causée par une réduction de la perméabilité membranaire, due à une perte de porines [4]. Il est donc compréhensible qu'un certain niveau de résistance intrinsèque, quoique non spécifique, soit observé chez ces souches bactériennes. Certaines souches exploitent plusieurs moyens afin d'élever leur niveau de résistance : un isolat clinique de *Klebsiella pneumoniae* identifié comme étant résistant à certains antibiotiques β -lactames exprimait une β -lactamase à large spectre d'action en plus d'avoir éliminé une porine associée à sa membrane externe [11]. La perméabilité membranaire n'étant qu'un moyen de ralentir l'entrée d'une molécule à travers la membrane plasmique d'un organisme, l'antibiotique finira éventuellement par atteindre sa concentration effectrice à l'intérieur de la cellule. De plus, ce phénomène n'explique pas entièrement les niveaux de résistance observés chez certains organismes.

Section 1.3.2 – Pompes à efflux

Comme le modèle de perméabilité membranaire n'explique pas l'augmentation de résistance envers différentes classes d'antibiotiques (β -lactames, fluoroquinolones, tétracycline, *etc.*), l'existence d'un autre mécanisme par lequel les bactéries acquièrent une résistance est nécessaire. Une seconde voie, menant à la sécrétion de la molécule antibiotique à l'extérieur de la cellule bactérienne, fait intervenir plusieurs protéines composant un système organisé d'export extracellulaire. Chez les bactéries de type Gram-négatif, l'existence d'un second feuillet à la membrane plasmique représente une barrière de plus à surmonter afin que la cellule excrète l'antibiotique en dehors de l'espace périplasmique. Ces systèmes de pompes retrouvés chez les bactéries de type Gram-négatif nécessitent la juxtaposition d'un transporteur (une protéine associée à la membrane cytoplasmique) et d'un canal localisé dans la membrane externe afin de permettre l'excrétion d'une molécule indésirable du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en transitant par le périplasme [12]. *Pseudomonas aeruginosa* possède plusieurs systèmes de pompes à efflux, dont MexAB-OprM [6]. La délétion de ce système entraîne une hypersensibilité de la souche envers les antibiotiques β -lactames, tandis que sa surexpression provoque une augmentation substantielle de son niveau de résistance [12]. Fonctionnel envers une vaste gamme de substrats, ce système de transport actif nécessite une bonne régulation afin d'éviter la sécrétion de métabolites essentiels à la cellule.

Section 1.3.3 – Modification des cibles des antibiotiques β -lactames

Tandis que les deux premiers mécanismes visaient à empêcher le rapprochement d'un antibiotique et de sa cible, d'autres stratagèmes ont été développés par les micro-organismes afin d'échapper à l'activité antibactérienne de ces antibiotiques. Puisque la résistance de plusieurs souches bactériennes ne peut être expliquée par les mécanismes

présentés ci-dessus, celle-ci doit donc être causée par un autre phénomène. Ainsi, les modifications des cibles des antibiotiques sont un mécanisme important de résistance pour lequel plusieurs exemples sont connus. À titre d'exemple, les antibiotiques β -lactames inactivent les *Penicillin-binding proteins* (PBPs) qui sont responsables de la biosynthèse de la paroi de peptidoglycane, essentielle au maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire en la protégeant des variations de pression osmotique [11]. Le peptidoglycane est formé de longues molécules de polysaccharides (glycanes) qui sont réticulées par de courtes chaînes peptidiques. Les molécules de glycanes ont une structure générale consistant en une alternance de groupements *N*-acétyle-D-glucosamine (NAG) et d'acide *N*-acétylmuramique (NAM) [5]. Les premières étapes de la synthèse du peptidoglycane, lorsque ce dernier n'est pas réticulé, ne sont pas affectées par les antibiotiques β -lactames. Par contre, le processus de réticulation par transpeptidation est sensible aux β -lactames. Les PBPs constituent une famille d'enzymes qui seraient, selon toute vraisemblance, les parents des β -lactamases connues actuellement. Ces deux classes d'enzymes découleraient fort probablement d'une évolution divergente où certaines similarités ont été conservées entre les deux, notamment un certain niveau de conservation de séquence, de leur structure tertiaire, de certains motifs structuraux ainsi que de la fonction d'acylation de leur substrat respectif sur un résidu sérine du site actif [13,14]. Il est aussi important de noter que les PBPs ne partagent à peu près aucune similitude (quant à leur structure primaire et tertiaire) avec d'autres protéases à sérine bien connues [13]. Le processus évolutif des PBPs en β -lactamases requiert la perte d'interactions avec le peptidoglycane, mais surtout l'acquisition d'une activité de désacylation qui permet à l'enzyme de se libérer du produit inerte de la réaction [11,13].

Ainsi, certains organismes ont mis au point des mécanismes de modification de leurs PBPs afin de réduire le potentiel délétère des antibiotiques [13]. Il a été observé que certains entérocoques résistants à la pénicilline surexprimaient une PBP particulière, caractérisée par une faible affinité envers les β -lactames [15]. L'inactivation de toutes les

autres PBPs (*E. coli* en exprime 7 différentes [5]) par une concentration saturante de pénicilline indique que la PBP surexprimée est capable de pallier la perte des autres. La modification de la cible de l'antibiotique a donc permis d'outrepasser la fonction d'inactivation de ce dernier. Un autre exemple de modification de cible concerne la vancomycine (ne faisant pas partie des antibiotiques β -lactames mais qui interfère aussi avec la synthèse de peptidoglycane) [6] : lors de l'étape de réticulation du peptidoglycane, une souche résistante à la vancomycine a tendance à utiliser préférentiellement le pentapeptide se terminant par la séquence peptidique D-alanyl-D-lactate au lieu de D-alanyl-D-alanine sur laquelle la vancomycine se lie fortement [4].

Section 1.3.4 – Modification enzymatique de l'antibiotique et transfert de matériel génétique

De nombreux mécanismes mènent à l'accroissement du niveau de résistance chez un micro-organisme: transfert de groupement acyle dans le cas du chloramphénicol ou les aminoglycosides, transfert de groupement phosphoryle pour les macrolides, les aminoglycosides ou la rifamycine ou encore des réactions d'oxydo-réduction inactivant par exemple la tétracycline [7]. Le mécanisme sur lequel l'emphase sera mise résulte de l'hydrolyse des antibiotiques β -lactames par une famille d'enzymes, les β -lactamases. La dégradation des antibiotiques β -lactames par les β -lactamases constitue le principal mécanisme par lequel les bactéries acquièrent un caractère de résistance. La production d'une enzyme inductible permet à la bactérie de répondre rapidement à un stimulus, lors d'une exposition à un antibiotique.

Les β -lactamases catalysent l'hydrolyse irréversible du lien amide du noyau β -lactame (Figure 1.1), inactivant ce dernier [16]. Les β -lactamases sont reconnues pour altérer leur spectre de reconnaissance aux antibiotiques en adoptant différentes stratégies. Afin d'augmenter son taux d'hydrolyse, une cellule peut exprimer le gène de la β -lactamase

sous le contrôle d'un promoteur fort, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse de l'enzyme [17]. Également, il est maintenant largement reconnu que l'application d'une pression sélective entraîne la sélection d'enzymes mutantes caractérisées par une altération de leur spectre de reconnaissance de substrats, favorisant ainsi l'hydrolyse de celui pour lequel les mutants ont été sélectionnés [18].

L'acquisition par une bactérie d'une stratégie de résistance à une classe d'antibiotiques, bien qu'étant problématique, ne s'avère pas une menace pour la santé publique et se limite à l'individu qui en est atteint. Par contre, la dissémination de ces caractères de résistance représente un risque accru pour la population. Les gènes de résistance sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles, *e.g.* des plasmides et des transposons, et le transfert de ce matériel chez les bactéries n'est pas limité à une espèce en particulier [11]. Non seulement des micro-organismes d'origines différentes peuvent s'échanger de l'information génétique, mais ils le font en concomitance avec d'autres gènes de résistance, notamment pour les aminoglycosides [19-21].

Finalement, afin d'acquérir un large spectre de résistance contre une multitude d'antibiotiques, certaines souches expriment différentes β -lactamases, chacune avec une spécificité qui leur est caractéristique. Ainsi, il n'est pas rare que l'identification d'isolats cliniques révèle non seulement la présence d'une β -lactamase chromosomique spécifique à la souche, mais aussi de plusieurs enzymes plasmidiques, dont parfois à large spectre d'action (*extended-spectrum β -lactamases*, ESBLs) [4,22].

L'application des antibiotiques β -lactames dans le milieu clinique a favorisé l'établissement d'une pression sélective, menant au développement de souches résistantes. Il est alarmant de réaliser à quelle vitesse la résistance aux antibiotiques s'est propagée car en 1982, à peine un an après l'approbation du céfotaxime (CTX) comme agent antibactérien aux États-Unis, une souche résistante au CTX était identifiée en Argentine [4]. L'année suivante, une souche résistante au CTX était également mise au jour en

Allemagne par le biais d'une variante de la β -lactamase SHV-1 (très répandue parmi les entérocoques), dénommée SHV-2 [19]. Ces β -lactamases ayant acquis un profil de résistance envers des céphalosporines de troisième génération (Figure 1.1) sont désignées *extended-spectrum β -lactamases* (ESBLs). Cela démontre la rapidité avec laquelle ces mutants évoluent, bien que la transmission rapide de ces gènes de résistance puisse aussi être à l'origine de tels foyers d'infections.

Section 1.4 – Les antibiotiques β -lactames

Les β -lactames représentent à peu près 55 % de tous les antibiotiques utilisés de nos jours [11]. Un grand avantage découlant de la prescription des antibiotiques β -lactames dans les cas d'infections bactériennes résulte du fait que ces molécules, quoique toxiques pour les bactéries, ne le sont pas envers les cellules eucaryotes, dont la membrane cytoplasmique est dépourvue de peptidoglycane [5]. Le noyau β -lactame à quatre membres est la seule structure commune à cette classe d'antibiotiques (Figure 1.1). Les divers groupements fonctionnels pouvant s'y greffer caractérisent la diversité de ces molécules. La grande famille des antibiotiques β -lactames se subdivise en sous-catégories, différenciées au niveau structurel : pénicillines, céphalosporines, oxyiminocéphalosporines, céphamycines, oxacéphèmes, carbapénèmes, monobactames et les inhibiteurs clavulanate, sulbactame et tazobactame (Figure 1.1) [5]. Quoique certaines de ces molécules ciblent spécifiquement un type de micro-organisme, d'autres ont un spectre très large et ne se limitent pas à un genre bactérien. Les pénicillines et les céphalosporines étant les substrats les plus répandus, l'emphasis sera mise sur ceux-ci. De par la rareté du noyau β -lactame dans la nature et de son caractère inhabituel, il avait été proposé que la réactivité de ces antibiotiques était due à la tension contenue dans le cycle β -lactame ou à une réduction de la résonance de l'amide du cycle, bien que ces deux hypothèses aient été réfutées [5,23].

Ainsi, la géométrie et la structure des β -lactames n'en font pas des antibiotiques plus réactifs et donc ne sont pas corrélées à l'activité biologique de ces molécules.

Section 1.4.1 – Le mode d'action des antibiotiques β -lactames

Les β -lactames appartiennent à une classe d'antibiotiques dénommée *mechanism-based inactivators* (inactivateurs basés sur le mécanisme), dont le *modus operandi* consiste à exploiter le processus catalytique de la cible de l'antibiotique (PBPs) afin d'initier le mécanisme d'inhibition. Cette inhibition consiste non seulement en la formation d'un lien covalent irréversible entre une PBP et une molécule antibiotique, mais le produit de cette réaction est non productif [23]. Les β -lactames agissent donc au niveau de la biosynthèse du peptidoglycane, spécifiquement lors de la réaction de transpeptidation, catalysée par les PBPs. La réaction catalytique commise par les PBPs procède *via* une sérine en son site actif. Le substrat naturel des PBPs consiste en un pentapeptide lié aux chaînes de peptidoglycane et portant la séquence : L-Ala-D-Glu-L-Xaa-D-Ala-D-Ala (où Xaa représente toutes les possibilités d'acides aminés) (Figure 1.2) [24]. Tipper et Strominger avaient démontré, il y a de cela plus de quarante ans, que la configuration du noyau β -lactame mimait la conformation de l'extrémité carboxy-terminale de ce pentapeptide (*i.e.* D-Ala-D-Ala) (Figure 1.2) [24]. Ce mimétisme permet donc à la pénicilline de se substituer au résidu pénultième de ce pentapeptide. La sérine catalytique procède par attaque nucléophile sur le carbonyle du β -lactame, résultant en une espèce acyl-enzyme non productive et donc à l'inactivation de la PBP, dû à son incapacité à déacyler le substrat antibiotique [24,25]. De par leur fonction, les PBPs portent aussi le nom de D-Ala-D-Ala-transpeptidases (ou DD-transpeptidases). Il est nécessaire de préciser que les antibiotiques β -lactames n'exercent leur activité antibactérienne que sur les cellules qui sont en phase de croissance, c'est-à-dire lorsqu'elles ont besoin de renouveler leur structure de peptidoglycane (action bactéricide) et non pas sur les cellules en phase stationnaire (action bactériostatique).

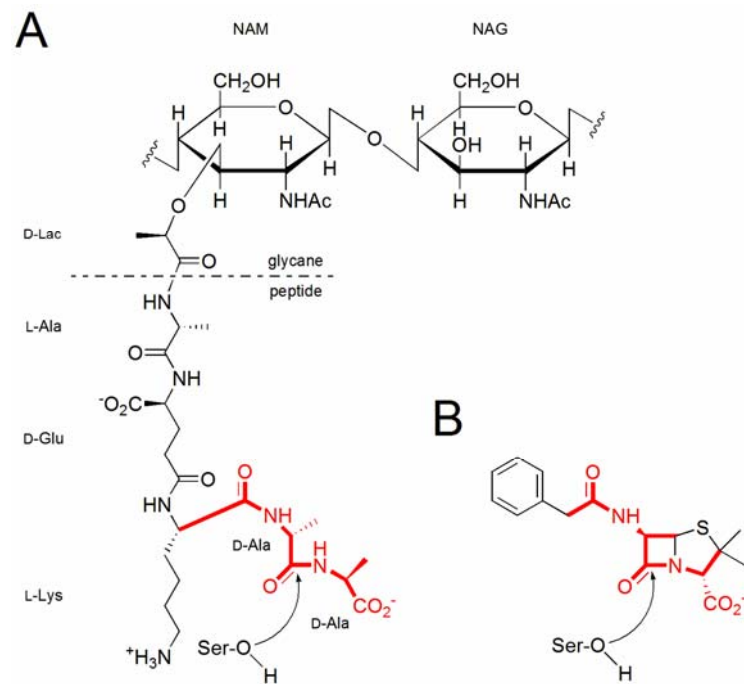


Figure 1.2 Comparaison structurelle entre les peptidoglycane et les antibiotiques β -lactames. (A) Structure générale des peptidoglycane retrouvés chez les procaryotes. La structure de glycanes est universelle et consiste en une alternance de résidus NAM et NAG. Les chaînes polypeptidiques responsables de la réticulation sont ancrées aux résidus NAM. La composition de ces pentapeptides varie selon les espèces bactériennes. Est illustré par la flèche, le site de l'attaque nucléophile réalisée par la sérine catalytique des PBPs, provoquant le départ du groupement D-Ala terminal lors de la réaction de transpeptidation. (B) La structure de la BZ permet d'illustrer le mimétisme de l'extrémité carboxy-terminale du peptidoglycane exercé par le groupement carbonyle du noyau β -lactame dans le processus d'inactivation des PBPs. Les structures communes aux deux entités sont surlignées en rouge. L'acylation d'une PBP ou d'une β -lactamase se fait par l'entremise d'une attaque nucléophile de la sérine catalytique (Ser-OH) sur le groupement carbonyle du pentapeptide ou du β -lactame. Figure adaptée de [5,25,64,65]. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, USA).

Section 1.5 – Les β -lactamases

Les β -lactamases (EC 3.5.2.6), appartenant à la grande famille des hydrolases d'amides cycliques, constituent le moyen le plus répandu par lequel les bactéries acquièrent un caractère de résistance face aux antibiotiques β -lactames. Ces enzymes sont synthétisées dans le cytoplasme de la cellule sous forme immature. La présence d'un peptide signal à leur extrémité amino-terminale guide leur translocation vers le périplasme de la cellule où elles exercent leur activité antibactérienne suite au clivage de cette séquence [26]. Les β -lactamases sont subdivisées en quatre catégories selon leur homologie de séquence [27]. Les classes A, C et D sont constituées d'enzymes dont l'activité catalytique est centrée sur un résidu sérine, tandis que la classe B consiste en des métallo-enzymes. Les β -lactamases à sérine impliquent la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme en opposition aux enzymes de la classe B qui ne forment que des intermédiaires non covalents, *via* la coordination d'un cation divalent, typiquement Zn^{2+} , malgré qu'il a été démontré que l'enzyme était aussi fonctionnelle en présence de Cd^{2+} et de Co^{2+} [22]. La majorité des β -lactamases peuvent être exprimées à partir d'un gène chromosomique ou plasmidique, ce qui assure, non seulement une réponse rapide suite à un stimulus (exposition à un antibiotique), mais aussi la capacité d'exprimer différentes variantes de la β -lactamase par une seule cellule. Étant donné le nombre important de variantes de la β -lactamase, ce document se penchera plus spécifiquement sur les enzymes de la classe A qui sont les plus répandues parmi les β -lactamases à sérine.

Section 1.5.1 – TEM-1, une β -lactamase de classe A

Les β -lactamases appartenant à la classe A, en plus de constituer la plus grande classe de β -lactamases à sérine, sont aussi les mieux caractérisées au point de vue de leur mécanisme catalytique [11]. Les enzymes de cette classe, distinguées par une variabilité au

niveau de leur séquence, démontrent également des différences dans leur profil d'hydrolyse des substrats [28]. Un simple exemple permet d'illustrer la manière avec laquelle la nature a permis l'évolution et l'optimisation de la fonction des β -lactamases de classe A envers certains substrats classiques. Les deux étapes majeures dans le processus d'inactivation des antibiotiques sont l'acylation du substrat par l'enzyme et la désacylation de l'acyl-enzyme. Aucune de ces étapes n'est limitante lors de la catalyse. La vitesse de la réaction dépend de la diffusion du substrat à l'intérieur du site actif et du produit en dehors du site actif [11,13]. Cela indique donc, en opposition à la majorité des enzymes, que le bris et la formation de liens covalents entre les espèces impliquées dans la catalyse ne sont pas limitants et que la progression de la réaction n'est limitée que par l'approche du substrat [29].

La première souche bactérienne exprimant la β -lactamase TEM-1 fut isolée à Athènes en 1963 chez une jeune patiente dénommée Temoniera, qui donna son nom à l'enzyme. TEM-1, identifiée comme une pénicillinase, était responsable de l'augmentation de l'activité de la souche envers la pénicilline et l'ampicilline [30]. Le gène codant pour la β -lactamase est généralement situé sur le transposon Tn3, permettant ainsi au gène de migrer vers différentes espèces bactériennes [31]. La dissémination de ce gène de résistance encodant pour TEM-1, notamment chez diverses populations bactériennes déjà porteuses d'une résistance intrinsèque, a mené à une multiplication des souches résistantes. Non seulement différentes variantes de l'enzyme étaient identifiées chez des isolats cliniques, mais leur spécificité de substrat était variable, ce qui rendait la problématique d'autant plus complexe. Cette propagation effrénée a fait en sorte que la β -lactamase TEM-1 est devenue la principale enzyme responsable de cette acquisition de résistance parmi les entérocoques cliniques [4]. En date du mois de décembre 2006, 155 variantes de la β -lactamase TEM-1 étaient répertoriées (Annexe 1).

La β -lactamase TEM-1 est une protéine globulaire monomérique composée de 263 acides aminés (Figure 1.3).

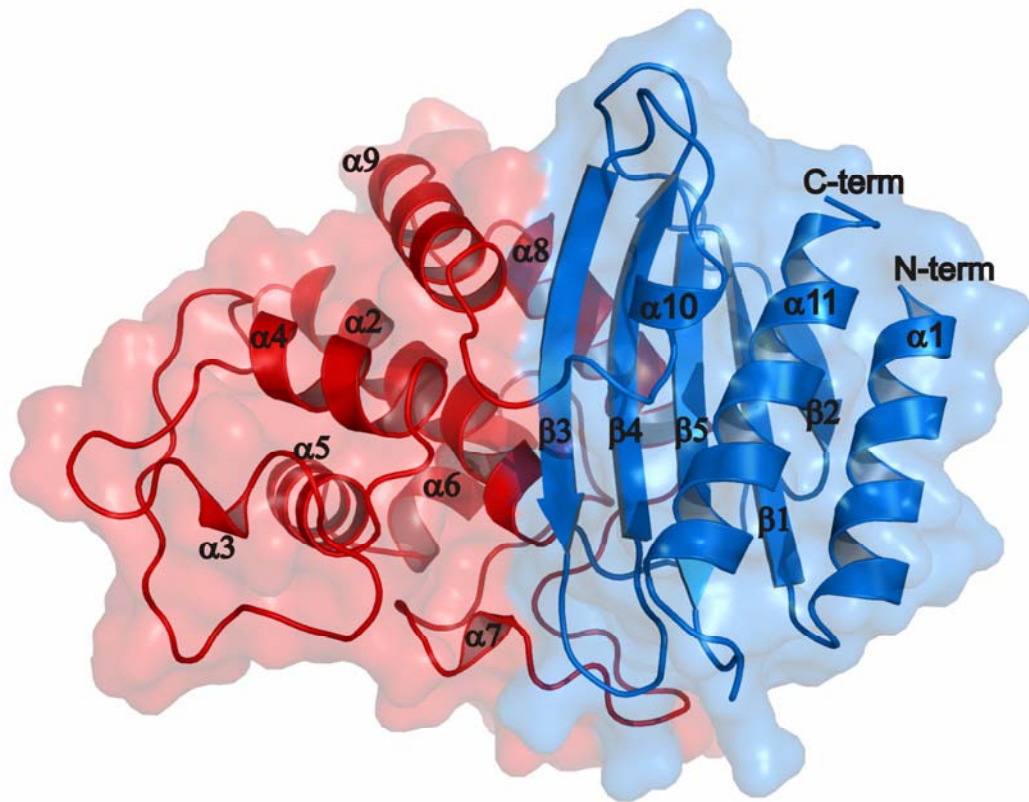


Figure 1.3 Représentation de la β -lactamase TEM-1, illustrant les éléments de structures secondaires tels qu'identifiés précédemment [32]. Les deux domaines, α et α/β , de l'enzyme sont respectivement colorés en rouge et bleu. Les structures secondaires, hélices α et brins β , sont respectivement identifiées $\alpha 1$ - $\alpha 11$ et $\beta 1$ - $\beta 5$. Coordonnées atomiques 1BTL (Brookhaven Protein Data Bank). Figure générée avec le logiciel PyMol [66].

Il est généralement accepté de décrire cette enzyme comme étant formée par deux domaines : un domaine formé de huit hélices α ($\alpha 2$ à $\alpha 9$) et un second formé d'un feuillet de cinq brins β antiparallèles ($\beta 1$ à $\beta 5$) sur lequel trois hélices α ($\alpha 1$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$) sont apposées *via* une surface hydrophobe [32]. Le site actif de l'enzyme consiste en un sillon

formé par la rencontre de ces deux domaines, retenus ensemble par deux régions charnières impliquées dans la formation d'interactions électrostatiques et de ponts hydrogène, empêchant ainsi tout changement conformationnel majeur [32].

L'analyse de diverses structures cristallines de β -lactamases de classe A révèle une conservation de certains motifs fonctionnels et structuraux qui sont aussi généralement retrouvés parmi toutes les enzymes ayant la pénicilline comme substrat [4,16] (Figure 1.4). Le premier de ces motifs est formé de la tétrade Ser⁷⁰-Xaa-Xaa-Lys⁷³ (résidus 70-73; numérotation des acides aminés selon Ambler [33]) où la sérine est le résidu catalytique (Ser-70) situé à l'extrémité d'une hélice α . À un tour d'hélice en aval de la sérine catalytique, se situe Lys-73, un résidu catalytique essentiel à l'activation de Ser-70 qui est aussi impliqué dans le transfert de protons afin de régénérer Glu-166 pour que cette dernière agisse comme base générale dans l'étape de désacylation (Annexe 2) [34].

Le second motif est formé du consensus Ser(Tyr)¹³⁰-Xaa-Asn¹³² et est généralement nommé boucle SDN (résidus 130-132). Cette triade permet, *via* un pont hydrogène avec Lys-234, de stabiliser la cavité du site actif (Figure 1.4) [4]. En plus d'être impliqué dans le transfert de protons lors de l'étape d'acylation, le groupement hydroxyle du résidu en position 130 interagit avec le groupement carboxylate des pénicillines et est donc impliqué dans la liaison du substrat [35]. En absence de substrat, le résidu Asn-132 forme un pont hydrogène avec le carbonyle de la chaîne principale du résidu en position 104, contribuant ainsi à une stabilisation supplémentaire du motif SDN [36]. Chez les enzymes de classe A, la chaîne latérale de l'acide aspartique en position 131 s'enfonce vers le cœur de la protéine en formant plusieurs ponts hydrogène et sa conservation provient du fait qu'elle stabiliserait l'enzyme et plus particulièrement la boucle SDN [35].

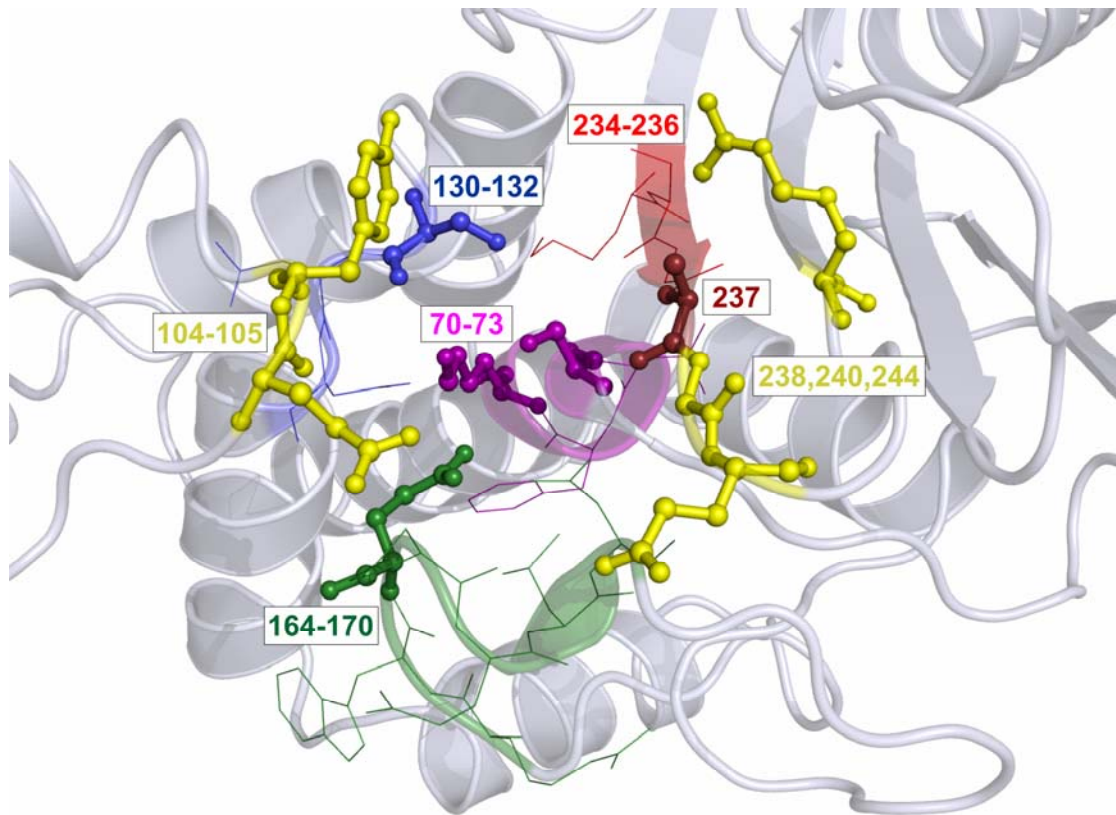


Figure 1.4 Conservation de motifs chez la β -lactamase TEM-1. Les r sids composant ces éléments sont représentés en lignes, sauf les r sids catalytiques (Ser-70, Lys-73, Ser-130, Glu-166; balles et bâtonnets) et sont identifiés comme suit : Ser⁷⁰-Xaa-Xaa-Lys⁷³ (mauve), Ser(Tyr)¹³⁰-Xaa-Asn¹³² (bleu), Arg¹⁶⁴-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Leu-Asn(Ser)¹⁷⁰ (vert) et Lys(His)²³⁴-Thr(Ser)-Gly²³⁶ (rouge). La poche oxyanionique est constituée du groupement hydroxyle de Ser-70 et des groupements amino des chaînes principales de Ser-70 et Ala-237 (rouge foncé). Les r sids ciblés pour la mutagenèse combinatoire, décrite au chapitre 3 (Glu-104, Tyr-105, Gly-238, Glu-240 et Arg-244), sont en jaune et permettent de les situer par rapport au reste des éléments conservés chez les β -lactamases. Coordonnées atomiques 1BTL (Brookhaven Protein Data Bank). Figure générée avec le logiciel PyMol [66].

Une troisième structure portant la séquence Arg¹⁶⁴-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Leu-Asn(Ser)¹⁷⁰ (résidus 164-170) est hautement conservée parmi les enzymes de classe A et forme une des parois du site actif (Figure 1.5). Ce motif, contenu dans la boucle Ω (nommée ainsi de par sa forme et constituée des résidus 161-179), comprend notamment Glu-166, essentiel lors de la désacylation du produit de la réaction (Annexe 2) et dont l'orientation dépend de la conformation *cis* du lien peptidique avec Pro-167, ainsi que de la formation d'un pont hydrogène avec Asn-170 [32]. La topologie de ce motif est également essentielle au bon positionnement d'une molécule d'eau responsable de l'attaque nucléophile de l'intermédiaire acyl-enzyme dans l'initiation de la désacylation [4]. Certaines β -lactamases de classe A ne conservent pas toutes les interactions (électrostatiques ou ponts hydrogène) généralement observées au sein de la boucle Ω . Ainsi, TEM-1 présente une boucle Ω plus rigide que celle du mutant D179N de la β -lactamase PC1 et cette différence résulte de la perte d'un pont salin chez PC1 [32].

Le quatrième motif, Lys(His)²³⁴-Thr(Ser)-Gly²³⁶ (résidus 234-236) est mieux connu sous le nom de triade KTG. Celle-ci forme une paroi du site actif de l'enzyme et contient le résidu Lys-234, impliqué dans l'étape initiale de reconnaissance du substrat ainsi que dans la stabilisation de l'état de transition [37] et le résidu Ser/Thr-235 qui joue un rôle critique dans l'hydrolyse des céphalosporines [38].

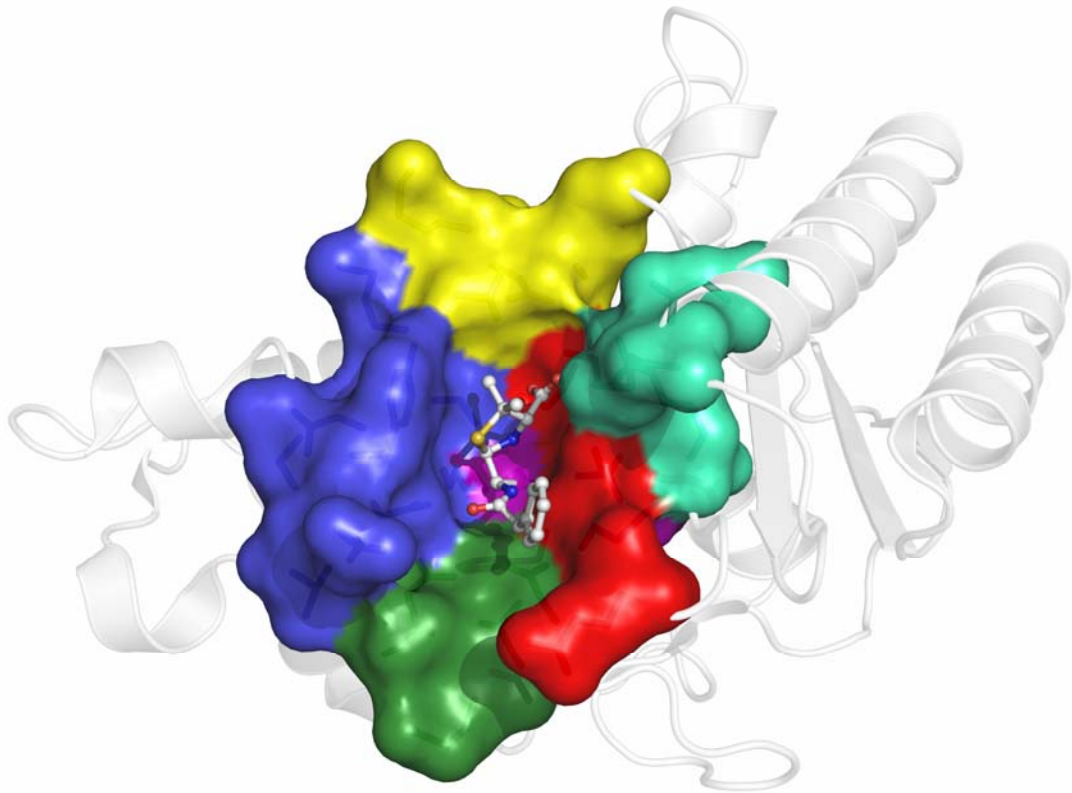


Figure 1.5 Représentation du site actif de la β -lactamase TEM-1. Les parois du site actif sont représentées selon leur surface de Connolly, définie par un rayon de solvant de 1.6 Å. Les parois sont définies comme suit : résidus 69-73 (mauve); 103-106 et 129-132 (bleu); 166-170 (vert); 214-218 (jaune); 234-239 (rouge); 243, 270 et 274 (vert-cyan). La BZ, représentée en balles et bâtonnets, est colorée par types d'atomes et sert à illustrer la proximité du substrat aux résidus désignés à être mutés. Coordonnées atomiques 1FQG (Brookhaven Protein Data Bank). Figure adaptée de [67] et générée avec le logiciel PyMol [66].

Finalement, la poche oxyanionique est le dernier de ces motifs et serait essentiel au bon positionnement du substrat dans la cavité du site actif. Cette structure est formée par le groupement hydroxyle de Ser-70 et des groupements amino des chaînes principales de Ser-70 et Ala-237 (qui contactent aussi le carbonyle du noyau β -lactame *via* des ponts hydrogène) (Figure 1.4). Pendant le processus catalytique, lors de la formation des intermédiaires tétraédriques, une charge négative se développe sur l'oxygène du groupement carbonyle du noyau β -lactame (Annexe 2; D et F). La poche oxyanionique permet de stabiliser cette charge négative par l'entremise de liens hydrogène [16]. Non seulement ces motifs ont été identifiés par comparaison de structures primaires et tertiaires chez toutes les enzymes hydrolysant les pénicillines, mais les résidus composant ces motifs semblent être impliqués dans la reconnaissance du substrat ainsi que dans la catalyse, du moins indirectement [16].

Malgré la conservation de certains motifs, les β -lactamases de classe A démontrent une vaste diversité de séquence ainsi que de leurs propriétés catalytiques. Une multitude de structures cristallines ont été déterminées en présence ou non de substrat [32,39-42] et la fonction de nombreux résidus a été sondée par des études de mutagenèse [11,22]. En terme de leur profil de résistance et de leurs caractéristiques cinétiques, la population des β -lactamases de classe A se subdivise en trois groupes prédominants : TEM/SHV (pénicillinases parentales), PER/OXA/TOHO (céphalosporinases) et CTX-M (NMC-A; carbapénemases) [11,43]. Bien que les β -lactamases aient joui d'une attention particulière, conséquence de la problématique reliée à leur fonction et du fait que de nouvelles variantes de TEM, SHV ou d'autres enzymes de classe A sont continuellement identifiées en milieu hospitalier, de nombreuses incertitudes persistent quant à l'altération de leur spectre de résistance et de leurs paramètres catalytiques menant notamment aux ESBLs.

Section 1.6 – La résistance bactérienne conférée par la β -lactamase TEM-1 : survol du mécanisme réactionnel

Bien que de nombreuses structures cristallines de différentes β -lactamases, soient libres [32,39,44-48] ou cocrystallisées en présence d'une molécule de substrat ou d'inhibiteur [40-42,49-54] aient été résolues, certaines incertitudes persistent quant aux détails mécanistiques de la catalyse. L'analyse de la structure tridimensionnelle d'enzymes mutantes permet d'apporter des éléments de réponse quant au rôle possible joué par les résidus désignés à être mutés. Que ce soit au niveau structurel ou purement mécanistique, l'implication des résidus peut être multiple et se complexifie dans la mesure où ces acides aminés interagissent entre eux et avec le substrat dans un contexte combinatoire.

En dépit des structures cristallines disponibles, même à des résolutions très élevées [40,55], certains détails de la catalyse échappent encore à notre compréhension. Le principal résidu catalytique est la sérine 70, dont l'activation permet la liaison du substrat à l'enzyme. Le processus catalytique se divise en deux étapes distinctes : l'acylation du substrat et la désacylation du produit de la réaction (Annexe 2). Tandis que la désacylation semble bien assimilée, l'acylation demeure quelque peu obscure, notamment à cause du nombre de résidus situés en périphérie du substrat dans le site actif pouvant agir comme base générale dans l'initiation du processus catalytique. Lors de la désacylation, il s'avère qu'il y a consensus autour de l'implication de Glu-166 comme base générale dans l'activation d'une molécule d'eau qui irait attaquer l'intermédiaire acyl-enzyme, afin de libérer le produit de réaction, suite à la réorganisation de l'intermédiaire tétraédrique (Annexe 2; E-F-G) [13,42]. D'ailleurs, afin de piéger un intermédiaire acyl-enzyme à des fins d'analyses structurales par exemple, la substitution du résidu Glu-166 par une asparagine permet d'interrompre le mécanisme réactionnel à l'étape de l'enzyme acylée [42,56]. Il est fort probable que l'acylation procède aussi *via* une activation d'une molécule d'eau par une base générale, mais l'identité du résidu responsable de cette étape demeure

contentieuse; ainsi, de nombreux groupements fonctionnels à proximité de l'antibiotique dans le site actif pourraient remplir cette fonction. Un récent article paru du laboratoire de S. Mobashery démontre, avec clarté, que l'acylation du substrat antibiotique de l'enzyme procéderait *via* une double participation des résidus Lys-73 et Glu-166 qui ont chacun le potentiel d'agir comme base générale afin d'activer le principal résidu catalytique, Ser-70 [34].

Ce progrès en direction de l'élucidation du mécanisme réactionnel ne permet cependant pas d'expliquer les variations dans le comportement cinétique de mutants de la β -lactamase TEM-1. Le principal défi dans la lutte contre l'émergence de résistances bactériennes concerne la compréhension du phénomène des β -lactamases à large spectre (ESBLs) et passe par la caractérisation de ces mutants multirésistants. La complexité, non seulement d'anticiper les effets d'une mutation, mais de prévoir comment cette substitution se comportera dans un contexte de mutations combinatoires, pousse les chercheurs à explorer diverses avenues afin de clarifier l'influence des mutations sur les différents aspects de la catalyse.

Section 1.7 – Mutagenèse combinatoire sur les β -lactamases de classe A

Depuis que les outils de la biologie moléculaire nous ont permis de générer une variété impressionnante de différents mutants, on répertorie beaucoup d'études de mutagenèse sur les β -lactamases ayant comme objectif de clarifier certains aspects de leur mécanisme catalytique, ainsi que de leur spécificité de substrats. Récemment, on a vu apparaître une tendance penchant vers la combinaison des sites mutés, permettant ainsi une exploration plus approfondie de l'espace séquentiel. La composante la plus problématique du phénomène de la résistance des bactéries aux antibiotiques demeure l'apparition de

souches à large spectre de résistance (ESBLs), notamment aux antibiotiques de nouvelles générations. La compréhension du phénomène de la résistance des bactéries aux antibiotiques, surtout dans le cas des ESBLs, passe très souvent par des analyses de mutagenèse ou de modélisation moléculaire. L'apparition d'une activité ESBL est le fruit de la substitution de seulement quelques acides aminés, la majorité d'entre eux se regroupant dans la région du site actif, sans toutefois être directement impliqués dans la catalyse [16]. Ces résidus sont les suivants : Gln-39, Ala-42, Glu-104, Arg-164, Ala-237, Gly-238, Glu-240 et Thr-265 [16]. De nombreux isolats cliniques identifiés à la suite d'un nouveau profil de résistance expriment une variante de la β -lactamase dont plusieurs résidus potentialisateurs de l'activité ESBL sont mutés. Lorsque plusieurs mutations sont combinées sur le même gène, on parle alors d'effets combinatoires ou compensatoires des mutations qui peuvent être avantageux ou néfastes à l'activité de l'enzyme.

La combinaison de plusieurs substitutions sur une même enzyme mène à une variété de différents effets possibles qui dépendent du degré d'interaction entre les résidus mutés [61,62]. Ainsi, deux acides aminés agissant indépendamment sur la réaction catalysée démontreront des effets additifs simples, tandis qu'une additivité partielle révélera une coopérativité limitée. Lors d'une forte interaction entre des résidus mutés (formation de liens électrostatiques ou changement de conformation), une certaine synergie est observée. Finalement, il y a antagonisme lorsque les résidus exhibent des effets opposés, c'est-à-dire qu'une mutation permette, par exemple, de récupérer partiellement une perte d'activité causée par une précédente mutation. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est pratiquement impossible, sur un plan théorique, de pouvoir anticiper les effets de l'introduction de diverses mutations dans un contexte combinatoire.

Section 1.8 – Objectifs et présentation de la recherche

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de la β -lactamase TEM-1 et par extension le phénomène de résistance aux antibiotiques et d'expliquer le rôle de différents résidus localisés autour du site actif de l'enzyme, celle-ci fut sujette à des analyses par mutagenèse dirigée, suivie d'une caractérisation fonctionnelle des mutants.

Dans un premier temps, l'emphase a été mise sur le résidu Tyr-105 qui fut muté par saturation (introduction de toutes les possibilités d'acides aminés naturels à la position déterminée). Ce contexte de mutation ponctuelle permet de mettre en évidence le rôle joué par ce résidu dans les diverses étapes de reconnaissance et de stabilisation du substrat et la catalyse proprement dite ou encore au niveau structurel. Le second projet consiste en la mutation du résidu 105 en combinaison avec les résidus 104, 238, 240 et 244 qui forment des parois du site actif (Figures 1.4 et 1.5), afin de sonder les effets combinatoires entre deux régions opposées du site actif de l'enzyme. Cette dernière analyse se penche principalement sur le développement de l'activité ESBL.

Par différentes techniques *in vitro* de mutagenèse dirigée, les mutants furent générés et ensuite caractérisés afin de déterminer leur sensibilité envers différents antibiotiques β -lactames. Nous nous sommes penchés notamment sur le développement de résistance envers un substrat non naturel de l'enzyme possédant un large spectre d'action, le CTX. Ensuite, les paramètres cinétiques des enzymes mutantes furent calculés afin d'analyser les répercussions des mutations simples (lorsque possible), ainsi que leurs effets combinées sur le comportement de l'enzyme : l'affinité des différents substrats, ainsi que leur taux d'hydrolyse. Les résultats sont présentés en deux chapitres, sous forme de deux articles résumant mes travaux de recherche et sont suivis d'une conclusion générale.

Section 1.9 – Justification des méthodes expérimentales

Les deux projets dont il est question dans les prochains chapitres mettent en évidence une série de techniques expérimentales dont le choix fut minutieusement défini. Dans le but de justifier le choix des différents protocoles et des méthodes mises en application, cette section présente les techniques appliquées aux projets, à la fois pour la création des mutants, ainsi que pour la caractérisation de ceux-ci.

Section 1.9.1 – Biologie moléculaire et design semi-rationnel

Les outils que nous offrent le domaine de la biologie moléculaire s'avèrent être d'une praticité déconcertante dans la génération d'une vaste diversité de mutants. La mutagenèse dirigée par saturation permet, sur une échelle de temps restreinte, d'obtenir plusieurs millions de différentes combinaisons de mutants. Le design semi-rationnel désigne une approche de la mutagenèse dirigée alliant le côté rationnel du choix des résidus à muter et le caractère aléatoire de l'emploi de codons dégénérés [63]. Cette technique fut appliquée au projet de mutagenèse combinatoire présenté au chapitre 3. La β -lactamase TEM-1 a l'avantage d'avoir été cristallisée à maintes reprises, ce qui nous a permis de sélectionner rationnellement les résidus du site actif qui allaient être mutés au cours de notre analyse. Par contre, le rôle précis de plusieurs résidus ciblés n'étant pas absolument défini, nous avons introduit une composante aléatoire par l'emploi d'amorces contenant des codons dégénérés, permettant l'introduction de toutes les possibilités d'acides aminés aux positions sélectionnées. Cette approche semi-rationnelle permet d'explorer plus en profondeur l'espace séquentiel afin d'identifier des mutants actifs portant une combinaison de mutations qu'il n'y aurait pas été possible de prédire autrement. La sélection des mutants par pression sélective nous permet de cribler la librairie de mutants pour la caractéristique

recherchée (résistance à un antibiotique dans ce cas-ci). La biologie moléculaire comprend aussi le séquençage des mutants, afin de déterminer les mutations qui furent introduites suite aux réactions PCR mutagènes. Comme il fut mentionné ci-dessus, les étapes de biologie moléculaire ne sont que des outils, représentant en quelque sorte le canevas de notre recherche. Aucun résultat ne découle directement de ces expérimentations, mais elles nous servent à obtenir la matière première pour les étapes subséquentes de caractérisation des mutants. Sont aussi incluses dans ce domaine, les étapes d'isolation et de purification des enzymes mutantes. Cette étape est requise dans la détermination des paramètres cinétiques, alors que la constante de vitesse, k_{cat} , dépend aussi de la concentration d'enzyme.

Section 1.9.2 – Concentrations minimales inhibitrices

La caractérisation des mutants suit un processus logique qui commence systématiquement par la détermination du niveau de résistance *in vivo* des mutants sélectionnés face à un éventail de différents substrats antibiotiques. Cette première caractérisation permet d'orienter le choix de certains mutants d'intérêt qui seront ensuite analysés plus en détails. Cette technique, quoique relativement imprécise, permet une évaluation grossière mais rapide des profils de résistance des différents mutants. Par contre, étant donné que les résultats découlant de cette technique sont dépendants de multiples facteurs hors de notre contrôle (variabilité dans l'expression protéique, mécanismes secondaires de résistance), nous ne pouvons pas les corrélérer directement à l'identité des mutations, afin de pouvoir expliquer leur rôle sur la fonction de l'enzyme. Pour ce faire, nous devons déterminer les paramètres cinétiques des mutants qui auront été isolés et purifiés.

Section 1.9.3 – Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique, effectuée par des mesures spectrophotométriques de l'hydrolyse d'une variété d'antibiotiques par les mutants permet la détermination de leur taux de catalyse, ainsi que de leur affinité envers les différents substrats pour lesquels ils sont testés. La cinétique est le cœur de la caractérisation des mutants car elle nous renseigne directement sur l'effet des mutations sur l'activité de l'enzyme : la vitesse d'hydrolyse des antibiotiques (k_{cat}) et l'affinité productive des mutants envers les différents substrats (K_M). La comparaison des valeurs obtenues entre les mutants, l'enzyme native et d'autres mutants déjà analysés au cours d'études précédentes permet de tirer certaines conclusions quant au rôle présumé des mutations introduites. Cette caractérisation fonctionnelle des mutants pourra être complétée d'une analyse structurale, réalisée par des analyses de dynamique moléculaire *in silico*.

Section 1.9.4 – Modélisation moléculaire

Afin d'apporter une explication structurale aux résultats expérimentaux, des structures cristallines connues sont utilisées comme point de départ à partir desquelles les mutations d'intérêt sont modélisées. Différents algorithmes et champs de force sont appliqués au système afin de simuler les processus dynamiques des résidus étudiés. Comme son nom l'indique, la modélisation moléculaire ne constitue qu'un modèle afin d'expliquer les observations faites *in vivo* et *in vitro* et n'est en rien un gage de la réalité. La puissance de calcul que nous fournissent les ordinateurs peuvent, dans un laps de temps assez restreint, explorer l'espace conformationnel d'un mutant, afin d'identifier un conformère dont la structure permettrait d'amener des éléments de réponse quant à son comportement cinétique, par exemple. L'intervention humaine dans le choix des logiciels et l'application des protocoles peuvent toutefois biaiser le système et potentiellement invalider les

conclusions que l'on pourrait en tirer. Cette technique peut néanmoins permettre de concilier les observations expérimentales aux analyses de dynamiques et donc parvenir à une meilleure interprétation des résultats. Les études de modélisation moléculaire rapportées dans ce mémoire furent entreprises par Nicolas Doucet, étudiant au doctorat dans le groupe de recherche de Joelle Pelletier.

Chapitre 2 – Résultats

Mutagenèse par saturation à la position 105 de la β -lactamase TEM-1 : Importance de la tyrosine dans la discrimination et la stabilisation des substrats

Article 1. Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its Importance in Substrate Stabilization and Discrimination in TEM-1 β -Lactamase

“Reprinted with permission from: Nicolas Doucet, Pierre-Yves De Wals and Joelle N. Pelletier. “Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its Importance in Substrate Stabilization and Discrimination in TEM-1 β -Lactamase” *J. Biol. Chem.*, **279** (44), 46295-46303 (2004). © 2004, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Reprinted with permission from The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.”

Section 2.1 – Présentation de l'article et mise en contexte

Dans le but de mieux comprendre les effets de mutations sur la spécificité de substrats et la catalyse enzymatique menant à la résistance aux antibiotiques de type β -lactames, de nombreuses études de mutagenèse ont été entreprises sur les β -lactamases de classe A.

Au cours des deux dernières décennies, différents groupes de recherche ont entrepris de clarifier certains détails du mécanisme réactionnel de la β -lactamase TEM-1 en ciblant spécifiquement certains résidus principalement situés dans l'environnement du site actif. La Tyr-105, directement située dans l'environnement du substrat dans le site actif de l'enzyme, fait partie des résidus de TEM-1 ayant peu été étudiés. Sa chaîne latérale aromatique et planaire délimite le site de liaison du substrat en formant une face du site actif (Figure 1.5). Certains auteurs avançaient la possibilité de l'existence de forces de van der Waals ou d'interactions hydrophobes avec le substrat ou un inhibiteur [68]. Étant donné la conservation du résidu Tyr-105 parmi les β -lactamases de classe A et une incertitude quant à son rôle, nous avons entrepris de muter cet acide aminé par saturation et de caractériser les mutants qui en résultent.

La mutagenèse dirigée par saturation de sites a été réalisée à la position 105 de la β -lactamase TEM-1 afin de générer toutes les possibilités de mutants (19 plus le natif). Le niveau de résistance des mutants à différents antibiotiques β -lactames a été évalué en procédant à des tests de CMI *in vivo*. Afin de sonder le profil de reconnaissance et d'hydrolyse de substrats, différents antibiotiques ont été utilisés : à la fois des pénicillines et des céphalosporines de première génération reconnues par l'enzyme native. Afin de préciser le rôle du résidu en position 105, nous avons déterminé les paramètres cinétiques de certains mutants d'intérêt, sélectionnés sur la base de leurs résultats de résistance *in vivo* afin de les comparer à ceux de l'enzyme native. Dans le but de corréler les données

expérimentales obtenues à la fois *in vivo* et *in vitro*, et de proposer une base structurale à ces observations, des simulations de dynamiques moléculaires ont été réalisées sur certains mutants. Ces travaux ont démontré l'implication de ce résidu dans la sélectivité des substrats et dans leur liaison au site actif par la formation d'un mur stabilisateur, prévenant toute interaction stérique défavorable.

Ma participation à ce projet a débuté par le criblage de transformants, afin d'identifier deux mutants manquant à la banque, Y105A et Y105K. De plus, un test d'expression protéique a révélé que la production de l'enzyme mutante Y105M était déficiente, possiblement à cause d'un problème au niveau du promoteur du gène. J'ai obtenu ce mutant par sous-clonage pour ensuite entreprendre des essais de CMI en présence de quatre substrats différents, soient deux pénicillines et deux céphalosporines de première génération. Bien que la méthodologie de l'essai ait été développée par Nicolas Doucet, tous les résultats de CMI ont été obtenus par moi-même.

L'utilisation du terme « *apoenzyme* » au cours du chapitre 2 est incorrecte et aurait dû être remplacé par « *free enzyme* » ou « *unbound state* » avant la publication de l'article. Effectivement, « *apoenzyme* » désigne une enzyme qui n'est liée par aucun cofacteur ou groupement prosthétique, à l'inverse d'une « *holoenzyme* » (forme active). Par contre, la β -lactamase ne possède aucun cofacteur et ne peut ainsi donc pas porter l'appellation *apoenzyme*.

**Site-saturation Mutagenesis of Tyr-105 Reveals Its
Importance in Substrate Stabilization and
Discrimination in TEM-1 β -Lactamase**

Nicolas Doucet¹, Pierre-Yves De Wals¹, & Joelle N. Pelletier^{1,2}

¹Département de biochimie et ²Département de chimie

Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-ville

Montréal (Québec)

H3C 3J7 CANADA

J. Biol. Chem., 2004, **279** (44), 46295-46303

ABSTRACT

The conserved Class A β -lactamase active site residue Tyr-105 was substituted by saturation mutagenesis in TEM-1 β -lactamase from *Escherichia coli* in order to clarify its role in enzyme activity and in substrate stabilization and discrimination. Minimum inhibitory concentrations were calculated for *E. coli* cells harboring each Y105X mutant in the presence of various penicillin and cephalosporin antibiotics. We found that only aromatic residues as well as asparagine replacements conferred high *in vivo* survival rates for all substrates tested. At position 105, the small residues alanine and glycine provide weak substrate discrimination as evidenced by the difference in benzylpenicillin hydrolysis relative to cephalothin, two typical penicillin and cephalosporin antibiotics. Kinetic analyses of mutants of interest revealed that the Y105X replacements have a greater effect on K_m than k_{cat} , highlighting the importance of Tyr-105 in substrate recognition. Finally, by performing a short molecular dynamics study on a restricted set of Y105X mutants of TEM-1, we found that the strong aromatic bias observed at position 105 in Class A β -lactamases is primarily defined by a structural requirement, selecting planar residues that form a stabilizing wall to the active site. The adopted conformation of residue 105 prevents detrimental steric interactions with the substrate molecule in the active site cavity and provides a rationalization for the strong aromatic bias found in nature at this position among Class A β -lactamases.

INTRODUCTION

During the past decades, β -lactamase production (EC 3.5.2.6) has become a significant problem in bacterial strain resistance to widely used clinical antibiotics. Among these enzymes, the prevalent type has always been the Class A active site serine hydrolase β -lactamases, which have become model enzymes extensively studied by protein

engineering with respect to site-directed or combinatorial mutagenesis (1-5), structure determination (6-10), and molecular simulations (11-13). Over the years *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase has become an impressive example of the rapid evolution rate of proteins occurring within natural bacterial isolates subjected to selective pressure. Ever since the clinical introduction of β -lactam compounds and the discovery of TEM-1 β -lactamase, both in the 1940s (14), natural mutations have generated a large number of single and multiple mutants of this enzyme (for an extensive list see Annexe 1).

The high rate of occurrence of mutated enzymes capable of hydrolyzing higher generation cephalosporins has stimulated research of β -lactamase adaptation to these new substrates in order to understand the molecular basis of this evolutionary chain of events. Consequently, a number of studies have successfully predicted the *in vitro* appearance of new mutations conferring resistance before their appearance in natural isolates (for an overall view, see Ref 1). To provide more information regarding these mutations in enzyme catalysis and/or substrate stabilization, multiple mutagenesis replacements have been undertaken in Class A β -lactamases to residues in close proximity to the active site cavity that are most likely to be in direct contact with the substrate, allowing for modified catalytic parameters (2–4). In conjunction with the SDN loop (3), the Class A conserved residue Tyr-105 delineates one of the edges of the active site cavity of TEM-1 as a result of the position of its side chain near the thiazolidine ring of penicillin substrates and the dihydrothiazine ring of cephalosporin substrates. To date, two independent mutagenesis studies were performed to modify Tyr-105 to Phe and Cys on the Class A β -lactamases of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus*, respectively (15, 16). The *B. licheniformis* Y105F mutant displayed a 52% catalytic efficiency toward benzylpenicillin compared with its corresponding wild-type enzyme. Based on these results, the Y105F mutation rules out a critical role of the hydroxyl group of the wild-type Tyr residue toward enzyme activity or stability. Moreover, the *B. cereus* Y105C mutant displayed native-like catalytic activity

under standard nitrocefin assay conditions, demonstrating that the aromatic moiety at this position is not essential for enzyme activity or stability.

On the other hand, the location and the strong conservation of aromatic character of this residue among Class A β -lactamases suggest that residue 105 may play a role in substrate recognition and/or stabilization. This hypothesis is based on crystallographic data of many Class A enzymes showing that the Tyr-105 side chain is significantly displaced upon binding of substrates or mechanism-based inhibitors as a result of a flipping motion (7, 17–21). In fact, it has been suggested that the Tyr-105 side chain may “stack” with the thiazolidine ring of penicillins (21, 22) as well as form van der Waals and hydrophobic interactions with the benzyl side chains of substrates (7, 12) or inhibitors (18, 19), suggestive of its active participation in substrate and inhibitor positioning at the active site. As a result of this characteristic, residue 105 has been considered a determinant of susceptibility to mechanism-based inhibitors (23).

To our knowledge, apart from the Y105F and Y105C mutations (15, 16), no further site-directed mutagenesis studies have been undertaken specifically at this critical active site position. Huang *et al.* (24) previously reported a three-codon-based combinatorial mutagenesis for the entire gene of TEM-1 but conducted no detailed analysis of residue 105 with respect to substrate recognition. Nevertheless, their results suggest that only the Y105H mutant is able to confer wild-type activity for ampicillin upon selecting for survival in the presence of 1 mg/ml antibiotic. However, these Y105X mutations were performed only with other simultaneous mutations at positions 103 and 104. Although the high activities observed with the Y105F and Y105C mutants suggest that hydrophobicity may be a determining factor at this active-site position, the effects of variables such as side-chain volume, polarity, and flexibility at this position have not been specifically addressed.

Thus, the importance of sequence conservation at position 105 is unclear, and the role of residue 105 has yet to be elucidated in detail with respect to enzyme stability and

substrate stabilization and discrimination for Class A β -lactamases. Consequently, to clarify the importance of residue 105 in TEM-1 β -lactamase as well as its potential role in other Class A β -lactamases, we performed saturation mutagenesis at position 105 on TEM-1. *In vivo* antibiotic susceptibility tests and *in vitro* kinetic studies were carried out using penicillin as well as first- and third-generation cephalosporin substrates to assess the impact of the mutations on substrate recognition and enzyme catalysis. Finally, molecular modeling studies of mutants of interest were undertaken to evaluate the structural importance of residue 105 in substrate stabilization. Our results identify residue 105 as a weak substrate determinant of TEM-1 β -lactamase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Restriction and DNA-modifying enzymes were purchased from MBI Fermentas (Burlington, ON) and New England Biolabs, Ltd. (Mississauga, ON). Ampicillin was obtained from BioShop Canada, Inc. (Burlington, ON), and benzylpenicillin, cephalothin, cefazolin, cefotaxime, and Fast-Flow DEAE-Sepharose were purchased from Sigma-Aldrich. Nitrocefin was purchased from Calbiochem.

Bacterial Strains and Plasmids—*E. coli* XL1-Blue (*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1*, *lac F'* [*proAB*⁺, *lacI*^f, *lacZ* Δ *M15*, Tn10(*tet*^r)] was used for the propagation and expression of all plasmids. Plasmid pQE32Chl in which the *bla*_{TEM-1} gene of pQE32 (Qiagen, Mississauga, ON) was replaced by a chloramphenicol acetyltransferase gene was a generous gift from François-Xavier Campbell-Valois and Stephen W. Michnick (Département de Biochimie, Université de Montréal, QC) and was used for protein expression. It was maintained using 12.5 μ g/ml chloramphenicol (Chl).¹ Plasmid pBR322, which contains the wild-type *bla*_{TEM-1} gene (without the V84I and A184V mutations) was

kindly provided by Luis A. Rokeach (Département de Biochimie, Université de Montréal, QC).

Oligonucleotides and Saturation Mutagenesis—Oligonucleotide primers used for mutagenesis were synthesized by Alpha DNA (Montréal, QC) and Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Oligonucleotide primers used for DNA sequencing were synthesized by Li-Cor Biotechnology (Lincoln, NB). The Y105X mutants of TEM-1 were constructed using the site overlap extension mutagenesis method (25). The 861-bp *bla*_{TEM-1} gene was PCR-amplified from plasmid pBR322 using the terminal oligonucleotides BamHITEMF (5'-CACACAGGATCCACATGAGTATTCAACATTTCCGT-3') and TEMHindIIIR (5'-ACACACAAGCTTTTACCAATGCTTAATCAGTGA-3') containing the BamHI and HindIII restriction sites (underlined), respectively. The 19-amino acid possibilities at codon 105 were introduced by a set of three complementary pairs of degenerate oligonucleotides (only the coding strands are shown): TEM105NTSF (5'-ATGACTTGGTTGAGNTSTCACCAGTCACAG-3'), TEM105NGSF (5'-ATGACTTGGTTGAGNGSTCACCAGTCACAG-3'), and VMS105F (5'-ATGACTTGGTTGAGVMSTCACCAGTCACAG-3'). The use of three separate degenerate oligonucleotides encoding the possibilities NTS, NGS, and VMS instead of a single NNS codon was justified by the elimination of the wild-type tyrosine residue as well as the three stop codons.

The recombinant TEM genes were digested with BamHI/HindIII and cloned into BamHI/HindIII-digested and calf intestinal alkaline phosphatase-treated pQE32Chl before electroporation into *E. coli* XL1-Blue cells. Colonies were individually picked after selection on a Luria-Bertani (LB) medium containing 12.5 µg/ml Chl, and the sequence of each mutant was confirmed by the dideoxy chain termination method with the Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (Upstate Biotechnology Corp., Cleveland, OH) using a dye-labeled primer and a Li-Cor automated sequencer (Lincoln, NB).

Expression and Purification of Mutant β -Lactamases—An overnight culture of each XL1-Blue/pQE32Chl-TEM(Y105X) clone was used to inoculate 50 ml of LB that was grown with agitation at 37 °C until $A_{600\text{ nm}} = 0.6$. After the addition of 1 mM (final concentration) isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside, the cultures were propagated for an additional 3 h. After induction, the cells were pelleted by centrifugation (30 min, 3000 $\times g$, 4 °C), resuspended in 10 ml of 10 mM Tris-Cl buffer, pH 7.0, and separated in 1-ml aliquots. A gentle lysis of the outer membrane of *E. coli* was performed by 3–4 1.5-min freeze-thaw cycles using a dry ice/ethanol and a 37 °C water bath followed by a centrifugation (15 min, 20,000 $\times g$, 4 °C) to collect the supernatant.

Purification of TEM(Y105X) mutants of interest was performed according to the following single-step anion-exchange chromatography procedure. All steps were undertaken at 4 °C with a flow rate of 1 ml/min on a System Gold high performance liquid chromatography apparatus (Beckman Coulter Canada, Inc., Mississauga, ON). Supernatant (10 ml) was applied to a DEAE-Sepharose column (2 \times 25 cm) followed by a wash of 2.5 column volumes with 10 mM Tris-Cl, pH 7.0, buffer. Mutant enzymes were eluted with a linear gradient of 10–150 mM Tris-Cl, pH 7.0, buffer (1.5 column volume), and a subsequent wash with the same buffer was finally performed (2.5 column volumes). Fractions containing β -lactamase activity were identified by a qualitative nitrocefin hydrolysis test and pooled for subsequent analysis. Aliquots of each clone were analyzed by SDS-PAGE gel, and the purity was estimated in all cases to be between 80 and 90% using the public domain image analysis software Scion Image (National Institutes of Health, rsb.info.nih.gov/nih-image). The column was regenerated by applying 5 volumes of 8 M urea followed by 5 volumes of 10 mM Tris-Cl, pH 7.0, buffer between each purification. No significant β -lactamase activity carryover was detected by nitrocefin assay upon running a mock purification (cells expressing no TEM-1 β -lactamase) following a purification of the native TEM-1.

Antibiotic Susceptibility—Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilutions according to Cantu *et al.* (26). The ranges of antibiotic concentrations tested were as follows (by stepwise 2-fold increases): 125–4000 $\mu\text{g/ml}$ for benzylpenicillin and ampicillin, 4–500 $\mu\text{g/ml}$ for cephalothin, 1–125 $\mu\text{g/ml}$ for cefazolin, and 4–500 ng/ml for cefotaxime. Each MIC determination was performed at least in triplicate in independent experiments.

Enzyme Kinetics—The kinetic constants K_m and k_{cat} for benzylpenicillin and cephalothin were determined at room temperature in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, for the mutants presented in Table 2.III. The following extinction coefficients (27) and concentration ranges were used: $\Delta\epsilon_{232 \text{ nm}} = 1100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for benzylpenicillin (50–200 μM) and $\Delta\epsilon_{262 \text{ nm}} = 7960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cephalothin (30–300 μM). Substrate hydrolysis was monitored according to initial steady-state velocities for a minimum of six substrate concentrations generally flanking the K_m values (when the molar extinction coefficients and the K_m value allowed it) using a Cary 100 Bio UV-visible spectrophotometer (Varian Canada, Inc., Montréal, QC). For each assay the concentration of enzyme was kept at least 500 times lower than substrate for benzylpenicillin (BZ) and was generally 50 times lower for cephalothin (CF). The kinetic parameters were determined from the rates of hydrolysis calculated from the initial linear portion of the curve and fitted to a Lineweaver-Burk ($1/[S]$ versus $1/[V]$) and a Hanes ($[S]$ versus $[S]/V$) plot. In most cases initial rates were also analyzed with the software Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA) by a non-linear regression curve corresponding to the Michaelis-Menten equation. The k_{cat} parameter was determined using the equation $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E]$, where the concentration of enzyme was determined by a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) taking into account its purity, estimated as described above.

Computer Modeling—All computations were performed with the InsightII package, version 2000 (Accelrys, San Diego, CA). The BIOPOLYMER module was used to modify molecular structures, and all energy minimizations and molecular dynamics calculations

were performed with the DISCOVER module using the consistent valence force field. The dynamic trajectories were analyzed using the DECIPHER module. We performed the simulations with the coordinates of an acyl-enzyme intermediate of TEM-1 complexed with benzylpenicillin (BZ), and we created an acyl-enzyme model of TEM-1 complexed with CF to compare the behavior of this substrate with that observed for BZ over the course of a 200-ps dynamics. We also conducted molecular dynamics studies using the coordinates of an apoenzyme structure of TEM-1 with residue 105 mutated, to assess conformation before substrate binding. Comparison of these systems (BZ acyl-enzyme, CF acyl-enzyme, and apoenzyme) allowed for the evaluation of the conformation of residue 105 before and after substrate recognition.

The 1.8-Å crystallographic structure of the *E. coli* TEM-1 β -lactamase (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, code 1BTL) (28) was used for the starting coordinates for apoenzyme calculations, and the 1.7-Å crystallographic structure of a E166N deacylation-defective mutant of the same enzyme (PDB code 1FQG) (8) was used for the starting coordinates for calculations involving benzylpenicillin-bound enzyme. The crystallographic water molecules of both enzymes were conserved. The active site SO_4^{2-} molecule was deleted from 1BTL, and the E166N mutation of 1FQG was reverted to wild-type. Hydrogen atoms were added at the normal ionization state of the amino acids at pH 7.0. For 1FQG, the atomic potentials of the BZ substrate were fixed according to the consistent valence force field atom types recommended by the manufacturer. These coordinates served as the starting points for all the subsequent calculations in presence (1FQG) or absence (1BTL) of BZ.

The Y105G, Y105L, Y105N, Y105Q, Y105R, and Y105W mutations were introduced. Before minimization, the tryptophan side chain was repositioned according to the crystal structure of the structurally homologous Class A PER-1 β -lactamase (PDB code 1E25) (9). Residues contained in a simulation area within 15 Å from any atom of BZ (1FQG) or residue 105 (1BTL) were allowed to move as well as the loop encompassing

residues 96–116, with the remainder of the protein being fixed. A layer of 5 Å of explicit water was added to the surface of this assembly, and a nonbonded cutoff of 20 Å was fixed to reduce the time of calculation. Each structure was energy-minimized by applying 100 steps of steepest descents followed by a conjugate gradient minimization until convergence of 0.001 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. A short molecular dynamics simulation was performed starting from the energy-minimized structures. Accordingly, the molecular system was allowed to equilibrate at 310 K for 100 fs followed by the actual simulation to explore conformational space for 200 ps at the same temperature (time step = 1 fs). Snapshots were taken each picosecond, generating 201 different conformers. At this point the trajectories obtained for each mutant were analyzed.

To create the acyl-enzyme intermediate models of TEM-1 with cephalothin (TEM-CF and Y105G-CF), the atomic coordinates of CF were taken from the crystal structure of an acyl-enzyme intermediate of TOHO-1 β-lactamase (PDB code 1IYP) (10) and fitted to the 1.8-Å crystallographic structure of the *E. coli* TEM-1 β-lactamase (PDB code 1BTL). The active site SO₄²⁻ molecule was deleted from 1BTL, and the CF substrate was positioned according to BZ in 1FQG by applying torsions to the Cβ-Oγ bond of Ser-70. Hydrogen atoms were adjusted to pH 7, and the atomic potentials of CF were adjusted as described herein. An energy minimization was performed on this structure by applying 100 steps of steepest descents followed by a conjugate gradient minimization until convergence of 0.001 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. This structure served as the starting coordinate for all subsequent steps of minimization and dynamics studies, which were performed as described above.

RESULTS

Antibiotic Susceptibility—We mutated position 105 (Tyr) of TEM-1 β-lactamase to the 19 other possibilities and confirmed through DNA sequencing of the entire gene that no

secondary mutations had occurred. To assess the effect of the Y105X replacements on the capacity of TEM-1 to hydrolyze penicillin-type and cephalosporin antibiotics, MICs were calculated for *E. coli* XL1-Blue cells alone or expressing TEM-1 mutants. The antibiotics used are presented in Fig. 2.1. Table 2.I presents MIC values determined for all mutants toward two classical penicillin-type substrates, BZ and ampicillin (AMP) as well as two typical first-generation cephalosporins, cephalothin (CF) and cefazolin (CZ). Thus, *in vivo* cell survival at higher antibiotic concentrations reflects a higher rate of hydrolysis by the enzyme. Because they are performed *in vivo*, MIC values serve as points of comparison rather than precise values and do not directly correlate with the K_m or k_{cat} parameters of each mutant enzyme. They nevertheless offer a rapid, qualitative assessment of the efficiency of mutants and allow for the identification of mutants deemed to be the most interesting with respect to detailed kinetic analysis.

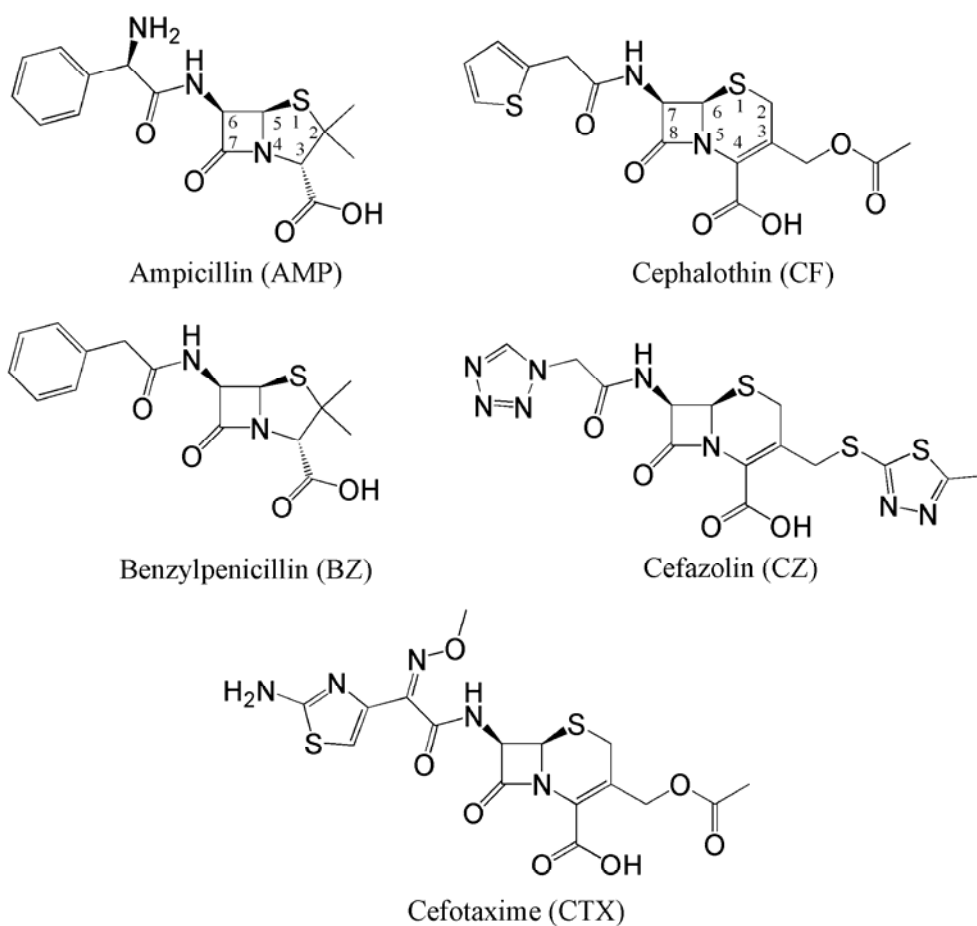


Figure 2.1 Structures of β -lactam antibiotics used in this study. Ampicillin and benzylpenicillin are classical penicillins, whereas cephalothin and cefazolin are first-generation cephalosporins. Cefotaxime is a third-generation cephalosporin.

Table 2.I MICs of *E. coli* XL1-Blue cells expressing TEM-1 β -lactamase with Tyr-105 replacements.

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Benzylpenicillin (BZ) Amino Acid 105 ^a	Ampicillin (AMP) Amino Acid 105
7500		A
4000	<u>A</u> , F , G, H , <i>N</i> , W , Y	F , <i>N</i> , W , Y
2000	C, K , M, P, Q, S	C, D , G, H , K , L, P, Q, S, T, V
1000	E , I, L, R , T, V	E , I, M
500	D	R
125	None ^b	None

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Cephalothin (CF) Amino Acid 105	Cefazolin (CZ) Amino Acid 105
250		W
125	W , Y	
63	F , H , <i>N</i>	H , Y
32	D , M, P	F , <i>N</i>
16	<u>A</u> , C, E , G, I, K , L, Q, R , S, T, V, None	G, P
8		<u>A</u> , C, E , I, K , M, Q, R , S, T, V
4		D , L, None

^a Aromatic residues are boxed in bold, and charged residues are boxed in white. Residues Asn and Gln are in italics, and Ala and Gly are underlined.

^b *E. coli* XL1-Blue.

As seen in Table 2.I, the range of resistance is higher for the penicillin substrates (500–4000 $\mu\text{g/ml}$ for BZ and 500–7500 $\mu\text{g/ml}$ for AMP) than for the cephalosporin substrates (16–125 $\mu\text{g/ml}$ for CF and 4–250 $\mu\text{g/ml}$ for CZ). This result was expected since Class A β -lactamases hydrolyze penicillins much more efficiently than cephalosporins, the latter having been historically developed to counteract the appearance of natural resistance to penicillins (29, 30). Nonetheless, the 20 mutants allow for a comparable breadth of resistance with respect to these four substrates. Thus, the ratio between the least and the most active mutants for BZ hydrolysis is approximately one order of magnitude (500 $\mu\text{g/ml}$ relative to 4000 $\mu\text{g/ml}$), similar to that observed for CF hydrolysis (16 $\mu\text{g/ml}$ relative to 125 $\mu\text{g/ml}$). AMP and CZ allow for slightly broader ranges but remain in the same range of resistance as BZ and CF, respectively.

This breadth of resistance illustrates that position 105 replacements can alter enzyme efficiency up to a factor of 10-fold. Nonetheless, this relatively weak effect confirms previous observations suggesting that position 105 cannot be considered essential for enzyme catalysis in Class A β -lactamases (15, 31). To understand the source of the effect, we examined the following hypotheses; (a) disparity in enzyme solubility conferred by the Y105X replacements, (b) changes in periplasmic localization efficiency of some Y105X mutants, (c) an active site cavity disruption modifying substrate recognition or catalytic turnover. We verified that the mutations at position 105 have little effect on solubility and on periplasmic localization by quantifying the soluble expression levels for each Y105X mutant after outer-membrane lysis. The soluble, periplasmic β -lactamase concentration observed by SDS-PAGE for all Y105X mutants was within a factor of 2 relative to the wild-type enzyme. The small variations observed did not correlate with the MIC results and are most likely slight clonal variations (data not shown). This result indicates that the mutations at position 105 do not significantly affect solubility or periplasmic localization, suggesting little impact on enzyme structure. This observation is consistent with previous results of circular dichroism studies on the Y105F mutant of the

Class A β -lactamase of *B. licheniformis* (15). Thus, these results imply that the Y105X replacements have an effect on substrate recognition and/or turnover in the active site of TEM-1.

A considerable number of mutants confer antibiotic resistance in the same range (or higher) as the wild-type enzyme for all of the substrates tested. This provides confirmation that position 105 does not need to be strictly conserved for enzyme activity and suggests that the observed differences in activity may result from a structural disturbance within the active site cleft that alters substrate recognition. It is striking to note that only aromatic replacements as well as Asn and the small residues Ala and Gly in some cases allow for survival rates in the same antibiotic concentration range as the wild-type enzyme for the four substrates tested. Notwithstanding a general similarity in the effects of the mutations toward penicillin-type and cephalosporin substrates, important differences were observed. Thus, Table 2.I shows that all Y105X mutants confer at least a minimal resistance to BZ and AMP, which is not the case for CF and CZ. For instance, the lowest MIC recorded for BZ (Y105D) still confers a resistance to this antibiotic at least four times higher than the *E. coli* cells alone. On the contrary the majority of Y105X mutants was unable to confer any survival over background in the presence of CF or conferred at most a 2-fold higher MIC than background toward CZ. These results demonstrate that the Y105X replacements are more deleterious toward turnover of the cephalosporin substrates than they are for the penicillin counterparts.

All of the highly active Y105X mutations (except Ala) are found at the corresponding position in other natural Class A β -lactamases, which have a strong preference for aromatic residues, although Asn and Gly have also been identified to date (Table 2.II). Accordingly, the Y105X mutants show a high *in vivo* antibiotic resistance bias for aromatic residues as well as Asn at position 105 for all the substrates tested. The occurrence of Asn and two small, non-polar residues (Ala and Gly) among the most highly

BZ- and AMP-resistant mutants confirms that aromatic residues are not essential for hydrolysis of penicillins.

Table 2.II Sequence alignment of residues 103–107 for major representatives of Class-A β -lactamase. Data were compiled from previously published reports (9, 40).

Enzyme	Residue number ^a				
	103	104	105	106	107
TEM-1	V	E	Y	S	P
SHV-1	V	D	Y	S	P
TOHO-1	V	N	Y	N	P
PC-1	V	A	Y	S	P
PSE-4	V	T	Y	S	P
<i>P. aeruginosa</i>	V	T	Y	S	P
<i>S. aureus</i>	V	A	Y	S	P
<i>B. licheniformis</i>	V	N	Y	N	P
<i>B. cereus</i> III	S	N	Y	N	P
PER-1 ^b	L	T	W	A	P
VEB-1 ^b	L	T	W	S	P
<i>K. oxytoca</i>	V	V	W	S	P
CME-1 ^b	L	T	W	S	P
NMC-A	E	F	H	S	P
IMI-1	E	F	H	S	P
SME-1	E	Y	H	S	P
<i>M. fortuitum</i>	V	P	N	S	P
<i>S. cacaoi blaU</i>	V	D	N	S	P
<i>S. albus</i> G	E	D	G	A	P
<i>S. laventulae</i>	-	-	F	G	P

^a Residue numbering according to Ambler et al. (40).

^b These β -lactamases harbor a three-residue insertion between positions 103 and 104.

This relation is not so clear in the case of cephalosporin resistance, where the Ala and Gly mutants are in the lower portion of the resistance spectrum for CF and CZ, suggesting that the identity of the residue at position 105 may participate in ligand selectivity.

For BZ and AMP recognition, no charged mutant (Lys, Arg, Asp, and Glu) allowed for cell growth at concentrations greater than half that displayed by the native enzyme, whereas for CF and CZ, these mutants conferred a resistance to concentrations 4 and 8 times lower than the parental enzyme, respectively. These results suggest that aromatic residues as well as Asn at position 105 participate in substrate recognition or turnover, perhaps by providing favourable interactions with the substrate, whereas in the case of other residues at position 105 the interactions would be detrimental or simply absent.

To characterize the impact of Y105X mutations toward recognition of higher generation cephalosporins, MIC values were also determined for cefotaxime, a third generation cephalosporin substrate that is not efficiently recognized by wild-type TEM-1 (2). No cell survival above background for *E. coli* XL1-Blue cells was observed for the parental enzyme or for any Y105X mutant (results not shown).

Enzyme Kinetics—The MIC values for various antibiotics allowed us to identify specific Y105X mutants of interest for further enzymatic characterization, notably the Trp, Asn, Gly, Arg, and Asp mutants. Trp was chosen because of its aromatic similarity with the native Tyr, its high *in vivo* activity, and also because of its frequent occurrence in other Class A β -lactamases (Table 2.II). Asn was chosen because its side chain is non-aromatic and much smaller while still being a highly active mutant also occasionally represented in other Class A β -lactamases. To our knowledge Gly has been identified in one Class A β -lactamase (Table 2.II) and was selected because, like Ala, its *in vivo* behavior is different toward penicillins and cephalosporins. Finally, Asp and Arg are two charged residues that were chosen because of their low *in vivo* activity. Neither of the latter residues has been

identified at position 105 in Class A β -lactamases. We performed the *in vitro* assays using BZ and CF as representatives of the penicillin and first generation cephalosporin substrate classes, respectively.

The steady-state kinetic parameters for native TEM-1 and the five selected mutants were calculated for BZ and CF (Table 2.III). The greater catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the wild-type TEM-1 for BZ is attributed to a 4-fold decrease in K_m and a 12-fold increase in k_{cat} toward BZ hydrolysis relative to CF. The most active mutant tested (Y105W) has a catalytic efficiency in the same range as the native enzyme, whereas the least active one (Y105D) displays a reduction of 2 orders of magnitude in its catalytic efficiency with respect to both substrates. Although both Y105G and Y105N have catalytic efficiencies 3–5 times lower than the wild-type enzyme for BZ, their kinetic properties with respect to CF hydrolysis are not alike. Indeed, although Y105N is 3-fold less efficient than the wild-type enzyme, the efficiency of Y105G drops to a value that is 20-fold lower for CF hydrolysis as a result of a significant K_m increase. The different effect of the Y105G mutation on K_m values for the two antibiotics indicates that the Y105G mutant behaves in a different manner with respect to penicillin and cephalosporin recognition, confirming the trend that was observed in the MIC determinations.

Table 2.III Kinetic parameters for wild-type TEM-1 β -lactamase and Y105X mutant derivatives.

Substrate	TEM-1 variant	k_{cat}	k_{cat}	K_m	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}/K_m
		(s^{-1})	relative to WT	(μM)	relative to WT	($M^{-1}s^{-1}$)	relative to WT
Benzylpenicillin (BZ)	Wild-type	1240 \pm 125	1.00	43 \pm 9	1.00	2.9 x 10 ⁷	1.00
	Y105D	255 \pm 20	0.21	369 \pm 23	8.58	6.9 x 10 ⁵	0.02
	Y105G	1203 \pm 350	0.97	152 \pm 61	3.53	7.9 x 10 ⁶	0.27
	Y105N	1616 \pm 339	1.30	276 \pm 84	6.42	5.9 x 10 ⁶	0.20
	Y105R	525 \pm 70	0.42	156 \pm 38	3.62	3.4 x 10 ⁶	0.12
	Y105W	900 \pm 78	0.73	23 \pm 9	0.53	3.9 x 10 ⁷	1.34
Cephalothin (CF)	Wild-type	105 \pm 11	1.00	177 \pm 27	1.00	5.9 x 10 ⁵	1.00
	Y105D	51 \pm 11	0.49	2860 \pm 540	16.2	1.8 x 10 ⁴	0.03
	Y105G	45 \pm 18	0.43	1630 \pm 750	9.21	2.8 x 10 ⁴	0.05
	Y105N	61 \pm 17	0.58	303 \pm 97	1.71	2.0 x 10 ⁵	0.34
	Y105R	90 \pm 28	0.86	546 \pm 34	3.08	1.6 x 10 ⁵	0.27
	Y105W	65 \pm 8	0.62	74 \pm 22	0.42	8.8 x 10 ⁵	1.49

In general, the deleterious effects of many of the Y105X mutations on catalytic efficiency is the result of a greater disruption of K_m than k_{cat} , although this trend is more pronounced for CF hydrolysis than for BZ. The greatest k_{cat} decreases observed were for BZ hydrolysis for the Y105R and Y105D mutants, which display a turnover number (k_{cat}) \sim 2.5 and 5 times lower than the parental enzyme, respectively. However, Y105G, Y105N, and Y105W hydrolyze the penicillin at maximal rates \pm 30% relative to the native enzyme. With respect to K_m , the most active mutant (Y105W) shows a 2-fold decrease in K_m compared with the parental enzyme. Other mutants show important K_m increases that range from 3.5-fold (Y105G and Y105R) to 8.6-fold differences (Y105D). These combined effects on k_{cat} and K_m result in catalytic efficiencies for BZ hydrolysis that range between 20 and 130% of wild-type TEM-1 for mutants Y105G, Y105N, and Y105W, which showed native-like BZ MICs, whereas Y105R (12%) and Y105D (2%) are also less efficient *in vivo* (Table 2.I). These results indicate that position 105 mutants displaying a catalytic efficiency approximately one-fifth or higher than that of the wild-type enzyme (Y105G, Y105N, Y105W) confer *in vivo* survival rates in the same range as the wild-type parent for BZ hydrolysis, whereas those with lower efficiency (Y105R, Y105D) result in poor *in vivo* performance. Thus, the K_m of Y105R may define a threshold below which there is enough productive binding *in vivo* to allow drug resistance.

Although the five characterized mutants hydrolyze CF with a k_{cat} that remains within 50–100% of the wild-type enzyme, K_m is modified much more importantly. As with BZ, the most active mutant (Y105W) shows a 2-fold decrease in K_m compared with the parental enzyme for CF hydrolysis. However, the other mutants show K_m increases ranging from 1.7 (Y105N)- to 16.2 (Y105D)-fold higher than the wild-type enzyme. K_m differences are, thus, the greatest contributor to the differences seen in the catalytic efficiency of every mutant tested for CF hydrolysis, confirming the implication of Tyr-105 in CF recognition by TEM-1 β -lactamase.

Moreover, the comparison of k_{cat} and K_m of the best and the worst mutants toward CF and BZ hydrolysis demonstrates the importance of residue 105 with respect to affinity as opposed to catalysis. In fact, although k_{cat} differs by 4.9-fold for BZ and 2.3-fold for CF when comparing the best and the worst mutants with respect to k_{cat} (wild-type/Y105D for BZ, wild-type/Y105G for CF), the comparison of K_m values yields differences of 16-fold for BZ and 39-fold for CF (Y105D/Y105W for BZ and CF). These observations lend further support to previously published results describing the Y105F mutant of the *B. licheniformis* β -lactamase, which suggested that the main effect on activity was on substrate binding as a result of a 3–4-fold increase in K_m (15). Although K_m for BZ hydrolysis does not vary as much as for CF hydrolysis, k_{cat} is affected to a somewhat greater extent for less active mutants. These differences suggest that residue 105 may be a weak substrate determinant in TEM-1, participating in substrate stabilization and providing an element of selectivity in the recognition of penicillins and cephalosporins. To further investigate the *in vivo* and *in vitro* results obtained with BZ and CF as representatives of the penicillin and cephalosporin substrate classes, molecular dynamics studies were undertaken with selected TEM-1 β -lactamase mutants in the presence and in the absence of these substrates.

Computational Models—Tyrosine 105 is a solvent-exposed active site residue with a side-chain conformation that is structurally conserved among almost all Class A β -lactamases of known structure. Fig. 2.2 shows the superimposition of residues 104–107 of the crystal structures of five Class A β -lactamases found in natural isolates harboring different residues at position 105 (Tyr, Trp, His, Asn, and Gly). Of these five structures only TEM-1 is complexed with a substrate molecule (BZ). In all cases, this 104–107-residue area defines one of the walls in contact with the substrate and constitutes the turn within a relatively rigid loop-helix motif encompassing residues 96–116. Although the side chain of residue 104 is quite flexible, residues 106 and 107 have a structurally conserved conformation, as does position 105, unless it is an Asn.

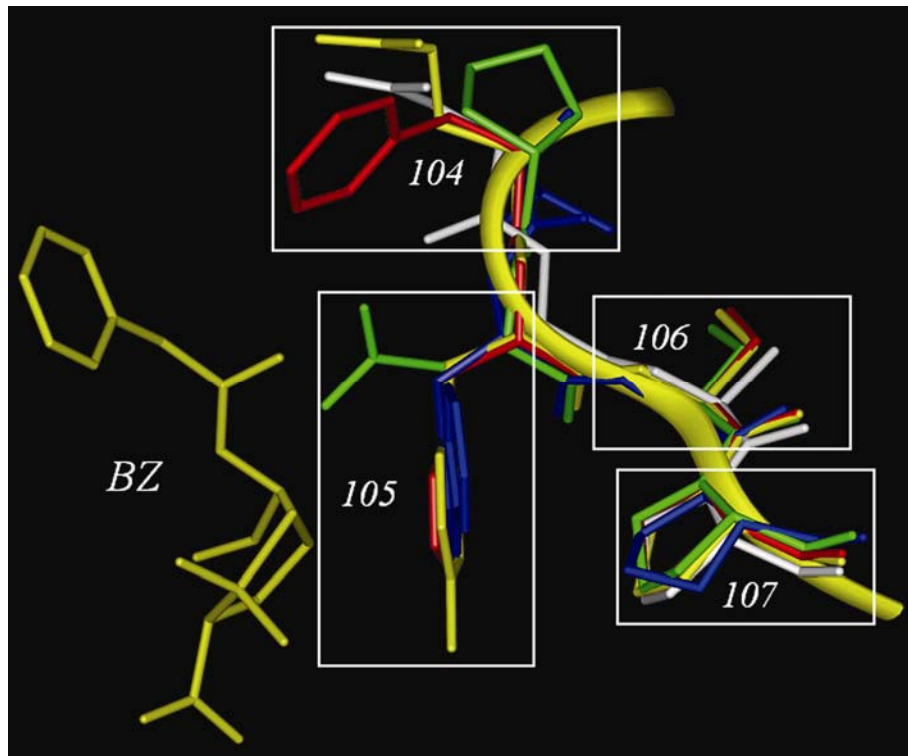


Figure 2.2 Superimposition of residues 104–107 of 5 Class A β -lactamases crystal structures. The following enzymes were used with the corresponding PDB entries; blue, *Pseudomonas aeruginosa* PER-1 apoenzyme (1E25) (9); green, *M. fortuitum* apoenzyme (1MFO); white, *S. albus* G apoenzyme (1BSG) (38); red, *Enterobacter cloacae* NMC-A apoenzyme (1BUE) (39); yellow, *E. coli* TEM-1 complexed with BZ (1FQG) (8). The structural alignment was undertaken using the backbone atoms of residues 104–107 with InsightII. Main chain atoms between residues 103–108 of TEM-1 are represented as a yellow ribbon.

In all cases the side chain of residue 106 points toward the interior of the 96–116 loop-motif as a result of the sequence-conserved Pro107 (Table 2.II) creating a

characteristic distorted Type-I β -turn in the structure (23, 24, 28). When the residue at position 105 is aromatic, it always lines up in an edge-to-face manner against Pro-107 (Fig. 2.2). However, Asn-105 of the *Mycobacterium fortuitum* enzyme points away from the motif directly toward the active site cavity. Despite the absence of a side chain in the *Streptomyces albus G* enzyme (which harbors Gly at position 105), it is interesting to note that the turn is conserved and that the shape of the 104–107 element is unaltered. This suggests that the identity of the residue at position 105 does not determine or greatly influence this helix-loop conformational bend. The structural homology in these natural β -lactamases with varying residues at position 105 is consistent with our observation that Y105X mutations did not have drastic effects on TEM-1 structure, as evidenced both by conservation of the protein solubility and by retention of at least a fraction of substrate recognition and catalytic capacity. Consequently, we performed molecular dynamics simulations of the Y105X mutations in TEM-1, assuming that no gross structural changes had occurred.

The Trp, Asn, Gly, Arg, Gln, and Leu mutants of TEM-1 in the presence of BZ were studied for the following reasons; Trp, as a positive control for highly active, aromatic residues; Asn, because of its native-like activity despite its small, non-aromatic side chain; Gly (with BZ and CF), because of its different kinetic behavior toward those substrates despite the lack of a side chain; Arg, as a weakly active mutant with a bulky and charged side chain; Gln, as a weakly active mutant structurally similar to the highly active Asn; and finally Leu, as a weakly active mutant with a neutral and branched side chain. In all models the backbone of the entire 96–116 loop-motif displayed little motion during the 200-ps dynamics simulation (root mean square deviation $<0.86 \text{ \AA}$). Throughout the dynamics, Tyr-105 is rigidly positioned in the center of an $\sim 8\text{-\AA}$ -wide cavity between Pro-107 and the substrate molecule in a manner that is quite similar to the crystallographically determined conformation of other position 105 aromatic residues in Class A β -lactamases (Fig. 2.2). The BZ substrate also shows little motion relative to the crystal structure (root mean square

deviation ≤ 1 Å). Previous studies suggest that this precise positioning of the aromatic moiety of Tyr-105 allows it to stack between Pro-107 and the thiazolidine ring of the substrate, although the nature of the proposed interaction has not been described in detail (21, 22). Our modeling results show that the distances maintained between the phenol ring of Tyr-105 and the thiazolidine ring on one side and Pro-107 on the other (~ 3.5 Å on both sides) and the nature of the proximal atoms are consistent with van der Waals interactions. Furthermore, no significant difference was observed in the free-form model of TEM-1 regarding rigidity or conformation of Tyr-105 (not shown).

Thus, the aromatic side chain of Tyr-105 forms a “wall” preventing the thiazolidine ring of BZ from moving into the small cavity facing Pro-107 (Fig. 2.3A). The Trp mutation (Fig. 2.3A) behaves in the same manner as the wild-type enzyme, which is consistent with the native-like *in vivo* and *in vitro* activities observed for the Y105W mutant and is also consistent with high productive binding reflected by low K_m values (2-fold decrease for CF and BZ). Although the side chain of Asn is considerably smaller than the aromatic residues, the Y105N mutation appears to behave in a very homologous manner, positioning the planar, structurally constrained γ -amide group parallel to the conformation adopted by the modeled aromatic side-chains Tyr and Trp (Fig. 2.3A). This again forms a wall in front of Pro-107, preventing the substrate from moving from its original position toward Pro-107, consistent with the high survival rates observed in the MIC determinations for the Y105N mutant.

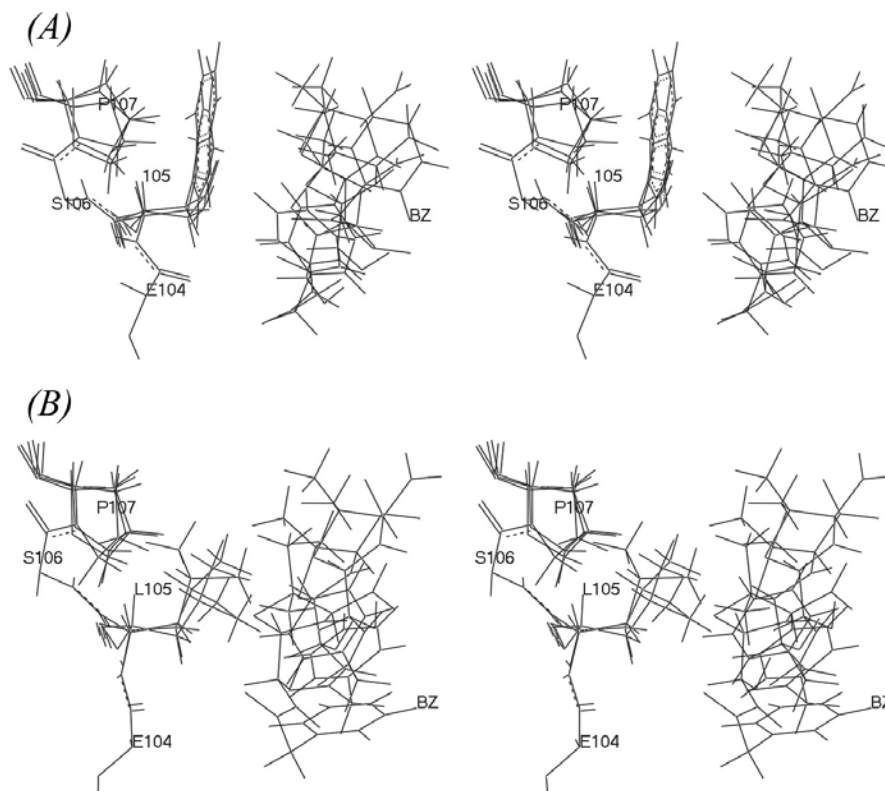


Figure 2.3 Superimpositions of snapshots from a 200-ps molecular dynamics simulation of various Y105X mutants of TEM-1, shown in stereo. *A*, superimposition of residues 105 and 107 for the 200-ps snapshot of wild-type TEM-1 and mutants Y105W and Y105N. Although only the 200-ps snapshot is shown for each of the three mutants, the side chains of residues Tyr, Trp, and Asn are all in the same plane, rigidly positioned in the center of an ~ 8 -Å-wide cavity between Pro-107 and the substrate molecule (BZ) throughout the entire 200-ps dynamics simulations. *B*, superimposition of residues 105 and 107 for the 80-, 120-, and 160-ps snapshots of mutant Y105L. The increased flexibility of the branched side chain of Leu-105 prevents adoption of the physical barrier shown in *panel A*, resulting in substrate destabilization at the active site. For both *A* and *B* representations, only residues 104–107 and the BZ substrate are shown. For clarity, the side chains of residues 104 and 106 are omitted.

In contrast with those mutations, the Y105G replacement leaves the active site cavity considerably more open (Fig. 2.4).

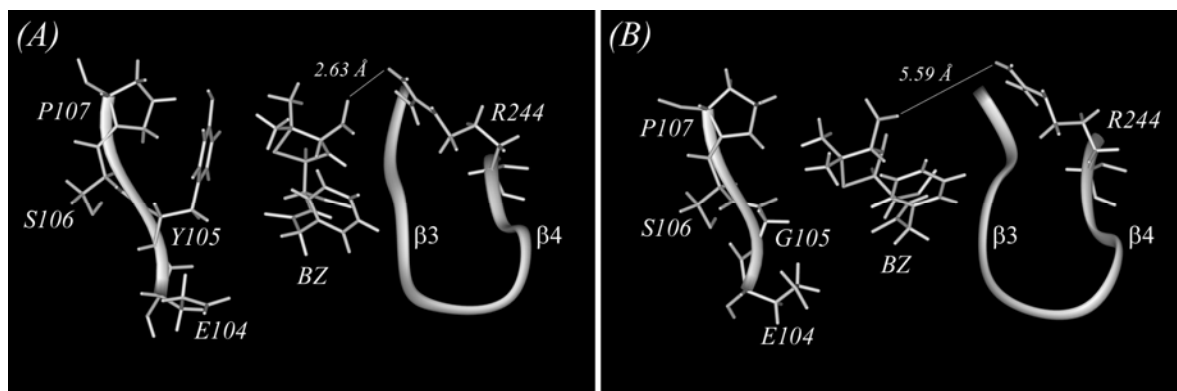


Figure 2.4 Conformation of benzylpenicillin in the active site of wild-type TEM-1 (A) and mutant Y105G (B) at the end of a 200-ps dynamics trajectory. The shortest distance between the C3-carboxylate moiety of the thiazolidine ring of BZ to the guanidinium moiety of Arg-244 is represented. The Y105G mutation results in removal of the wall created by Tyr-105, shifting the thiazolidine ring of the substrate in the direction of Pro-107. This resulting conformation of BZ prevents direct contact of the C3-carboxylate with Arg-244 in the Y105G mutant. Backbone direction between residues 104–107 and 235–245 is represented by a *ribbon* and is shown in the same orientation as in Fig. 3. Residues from β -strands 3 and 4 (except Arg-244) are omitted for clarity. Similar results were observed with CF.

Over the course of the 200-ps trajectory, the thiazolidine ring of BZ fills the cavity facing Pro-107, where it remains relatively rigid once placed in this alternate position. Accordingly, k_{cat} is unaffected, whereas K_m increases by a factor of 3.5-fold. Nevertheless, these modifications have virtually no impact on the survival rate of this mutant with respect to BZ hydrolysis. On the other hand, CF recognition is more strongly affected by the

mutation to glycine, as can be seen by the 9.2-fold increase in K_m coupled to a 2-fold drop in k_{cat} , which correlates with the low survival rates conferred by the Y105G mutant with respect to CF hydrolysis. To better characterize the *in vivo* and *in vitro* differences observed for BZ and CF with the Y105G mutant, we performed molecular dynamics studies with a TEM-1 model complexed with CF for the wild-type enzyme (Tyr-105) and for Y105G (not shown). Although we observe subtle differences in the positioning of CF relative to BZ, our models do not offer a clear explanation for the high substrate discrimination conferred by the Y105G mutant with respect to BZ and CF.

Most other residue replacements at position 105 had a detrimental effect on TEM-1 activity toward both penicillins and cephalosporins. After a 200-ps dynamics simulation performed with BZ for Arg or Gln at position 105, we observed large differences relative to position 105 mutants Trp, Asn, and Gly. The Arg-105 side chain rapidly shifts toward the entrance of the active site cavity, placing the charged group in direct contact with the solvent (results not shown). Consequently, the Arg side chain does not create the previously described physical barrier between BZ and Pro-107 in the same manner as the higher activity enzymes (Tyr, Trp, Asn). The resulting shift in the substrate is constrained by the presence of the long aliphatic side chain of Arg, which results in important steric interactions with the substrate molecule. Thus, a greater lateral movement of the BZ substrate is observed throughout the simulation, which may account for the 2.5-fold decrease observed in k_{cat} . In fact, the sulfur atom of the BZ thiazolidine ring in the Y105R mutant moves 2.65 Å from its original position during the 200-ps simulation relative to 0.36 Å for the wild-type complex. It should be noted that the Arg-105 side chain also shifts toward the entrance of the active site cavity in the absence of BZ, suggesting that solvation of the guanidinium group (rather than steric hindrance of the bound substrate) promotes this shift.

In the case of the Y105L mutant (Fig. 2.3B), the side chain of Leu is very flexible throughout the 200-ps trajectory (root mean square deviation = 1.35 Å as opposed to root

mean square deviation values $<0.8 \text{ \AA}$ for all other modeled mutants), possibly disrupting the efficient binding and stabilization of the substrate in the active site cavity. Similarly, we observed that the amide side chain of Gln is unable to adopt the parallel conformation shown for the aromatic and Asn mutants as a result of its greater length and flexibility (not shown). It is worth noting that both of these mutations (Leu and Gln) have a greater effect on the MIC values of cephalosporins than penicillins, suggesting that the bulkier dihydrothiazine ring of cephalosporin substrates does not support as much flexibility at position 105 than the thiazolidine ring of penicillin substrates. Taken with the poor MIC results of all other non-aromatic, branched mutations (with the exception of Asn), this suggests that a greater side-chain flexibility and size conferred by branched residues at position 105 have a detrimental effect on substrate binding. By conserving the planar conformation lined up against Pro-107, small or aromatic residues would prevent steric interactions with the substrate by forming a stabilizing wall that restricts the active site cavity size and, thus, substrate movement.

Finally, by monitoring the dynamics trajectory of the Y105X mutants in the presence and absence of BZ, we determined that the whole-residue distance between residues 105 and 107 for aromatics (Tyr, Trp) is $\sim 1 \text{ \AA}$ wider in the absence than in the presence of substrate. This difference is less pronounced ($\sim 0.5 \text{ \AA}$) for the Asn mutant but is not discernible for three other mutants tested (Gly, Arg, Gln). The difference in distance (\pm substrate) appears to be correlated to *in vivo* and *in vitro* activity, further suggesting a role for residue 105 in substrate stabilization at the active site.

DISCUSSION

The results we have obtained indicate that the nature of the residue at position 105 in TEM-1 β -lactamase has an important effect on substrate recognition and stabilization at the active site. Stabilizing effects have been previously proposed for Tyr-105 with respect to

substrates and inhibitors. Notably, Mobashery and co-workers (32, 33) suggest the existence of a hydrophobic pocket created by the side chains of Tyr-105 and Val-216 in TEM-1, whereas other studies on Class A enzymes pointed out that the hydroxyphenyl group of Tyr-105 was within van der Waals distance of the thiazolidine ring of penicillin substrates or inhibitors (9, 18, 34, 35). Consequently, these crystal structure observations have led to the suggestion that Tyr-105 “stacks” with the thiazolidine ring of BZ or inhibitors (21, 22). Our studies suggest that the strong bias for aromatic residues at position 105 is not a functional prerequisite of hydrophobicity so much as a structural necessity to prevent unfavorable substrate displacement within the active site. This hypothesis is strengthened by the polar Asn side chain of the Y105N mutant, whose activity is in the same range as the wild-type enzyme for all substrates tested. Thus, polarity can be tolerated at position 105 as long as the residue causes no perturbation to substrate positioning. Moreover, as evidenced by comparing the relatively high penicillin hydrolysis of the Y105G, Y105N, Y105S mutants with the more hydrophobic Y105C mutant, hydrophobicity cannot be considered as a variable defining the stabilizing interaction conferred by Tyr-105 in TEM-1 and other Class A β -lactamases.

Aromatic residues and Asn would, thus, be favored at position 105 because of the intrinsic planarity of their side chains, which enables them to adopt a structurally “non-destructive” conformation where they fill the small cavity between the thiol ring of the substrate on one side and Pro-107 on the other, preventing extensive motion of the substrate within the active site cavity. This wall, formed by Tyr-105, has previously been suggested as an important determinant in clavulanate susceptibility for several Class A enzymes (23), although this assertion needs more thorough investigation with respect to the susceptibility of Class A β -lactamases that do not harbor an aromatic residue at position 105. Because the Asp mutant would also be able to adopt the same planar conformation as that of Asn, it is reasonable to assume that the low *in vivo* and *in vitro* activities observed for Y105D with all the substrates tested is related to its negative charge. The presence of the wild-type glutamate residue at position 104 coupled to the Y105D mutation would generate a strong

negative potential, which may account for the altered kinetic parameters. Finally, the side chains of other residues appear to be disfavored at position 105 as a result of their bulkier size, charge, and/or their inability to retain the particular non-destructive planar conformation described herein, which prevents unfavorable steric clashes of residue 105 with the substrate. Hence, small residues create a gap in this barrier, allowing for greater substrate displacement within the active site cavity, whereas larger and non-planar residues (except Asn) are too bulky and/or possess too many degrees of freedom to adopt this barrier conformation, interfering with productive substrate positioning. In the evolutionary context of this particular residue, our results are in accordance with the non-planar and bulky amino acids naturally excluded from this position, as their physical characteristics constitute a clear disadvantage with respect to catalytic efficiency, as opposed to the strongly conserved, structurally non-destructive residues (aromatics, Gly, Asn) found at position 105 in all Class A β -lactamases (Table 2.II). As noted above, we were unable to select a Y105X mutation of TEM-1 that allowed recognition of a higher generation cephalosporin. That the conformation of residue 105 is not in the immediate vicinity of the bulky C7 side chain of third-generation cephalosporins (Fig. 2.1) suggests this residue may not be a primary target for future adaptive mutations found in natural isolates of TEM variants.

Although the planar characteristic conferred by aromatic residues and Asn at position 105 appears to be essential for efficient cephalosporin hydrolysis, it is not a definitive requirement of high activity for penicillin substrates since high survival rates are additionally observed for mutants with small amino acid side chains at position 105 (Y105G and Y105A). This observation suggests that cephalosporin stabilization in the active site of TEM-1 is more precarious and requires a greater structural integrity of the active site than penicillin substrates. This difference in recognition and stabilization may be attributed to the greater size of the 6-membered dihydrothiazine ring of cephalosporins coupled to the fact that these substrates always harbor a bulkier C3 substituent compared with the smaller, less substituted 5-membered thiazolidine ring of penicillins. Aromaticity, although not essential, may still contribute to affinity since the elimination of the aromatic

moiety at position 105 results in K_m increases that could be explained by the loss of weak stabilizing forces conferred by aromatic residues. Accordingly, the lower K_m values observed toward BZ and CF for the Y105W mutant may result from the higher electron density of the Trp indole side chain compared with the hydroxyphenyl moiety of Tyr, resulting in stronger van der Waals contacts of the indole side chain with the substrate.

In the wild-type enzyme, ion-pairing interactions (36) and hydrogen bonding (37) of the C3 (C4) carboxylate group of substrates to the guanidinium group of Arg-244 have been suggested to play a role in stabilizing the substrate in the ground and transition states, although these assumptions have been the subject of debate (2, 4). Although our model of the acyl-enzyme intermediate cannot account for ground or transition states, the wild-type acyl-enzyme with BZ or CF supports this hypothesis by confirming the maintenance of appropriate distances between Arg-244 and the C3 (C4) carboxylic acid groups of both substrates throughout the 200-ps dynamics (shown in Fig. 2.4A for BZ). However, the large shift of the thiol rings of both BZ and CF observed for the Y105G mutant prevents any direct hydrogen bonding or ion-pairing interaction of the C3 (C4) carboxylate moieties of substrates with Arg-244 as a result of increased distances (Fig. 2.4B). Should the increased distance also exist at the ground or transition states, this suggests either that interaction with Arg-244 is not essential for activity or that a bridging water molecule (as proposed by various authors (Ref. 4 and references therein)) would be displaced concurrently with the substrate, since the Y105G mutant is highly active for BZ hydrolysis.

We observed that the amide of Asn is positioned differently in the modeled, ligand-bound Y105N mutant and in the free-form crystal of the *M. fortuitum* enzyme. This suggests that the position of residue 105 is different in the free and ligand-bound enzymes, possibly as a result of substrate binding. Our monitoring of the distance between residues 105 and 107 during the 200-ps dynamics trajectory of the Y105X mutants modeled in the presence and absence of BZ supports this hypothesis. The correlation between the difference in distance (with and without substrate) and *in vivo* and *in vitro* activity suggests

that aromatic residues at position 105 (and Asn to a certain extent) adopt two distinct conformations in the presence and absence of substrate and could, thus, be a determinant of recognition for substrate stabilization. This conformational change is in agreement with backbone NMR relaxation studies of TEM-1 showing that residue 105 harbors a higher-than-average flexibility in solution.² Moreover, previously published crystal structures of inhibitor-bound Class A β -lactamases showed Tyr-105 as a potentially flexible residue harboring distinct positions in the free and inhibitor-bound enzymes (17–21). Recently, a 1-ns molecular dynamics simulation of TEM-1 with BZ showed that the side chain of Tyr-105 can flip in the same plane to make favorable contacts with the phenyl moiety of this substrate (12). Although the side chain of Tyr-105 does not display this important conformational shift in our shorter modeling studies of TEM-1, our results nevertheless suggest that Tyr-105 as well as highly active Y105X mutations adopt slightly differing conformations in the presence and in absence of substrate.

In conclusion, our systematic investigation of the *in vivo* and *in vitro* kinetic effects of Y105X mutants of TEM-1 β -lactamase coupled to molecular dynamics simulations identify this residue as being involved in β -lactam substrate selectivity and stabilization at the active site. We propose that the residue at position 105 is most propitious to substrate binding when it can stably adopt a planar conformation between the substrate and the conserved Pro-107, whereas more flexible residues create unfavorable steric hindrance with the substrate. Polarity (but not charge) is tolerated, whereas reduction of bulk at this position results in discrimination between penicillin and first-generation cephalosporin substrates. We obtain good agreement between *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* results, which also correlate well with the natural diversity observed at this position among Class A β -lactamases, thus suggesting a basis for the evolutionary selection of residues adopting a non-destructive conformation at position 105 in Class A β -lactamases.

FOOTNOTES

* This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[¶] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 514-343-2124; Fax: 514-343-7586; E-mail: joelle.pelletier@umontreal.ca.

¹ The abbreviations used are: Chl, chloramphenicol; AMP, ampicillin; BZ, benzylpenicillin; CF, cephalothin; CZ, cefazolin; MIC, minimum inhibitory concentration.

² P.-Y. Savard and S. M. Gagné, Université Laval, Québec, QC, personal communication.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Prof. Natalie C. J. Strynadka (University of British Columbia, Vancouver, BC) and Pierre-Yves Savard and Prof. Stéphane M. Gagné (Université Laval, Québec, QC) for helpful discussions. We also thank Peter D. Pawelek (McGill University, Montréal, QC) and Roberto A. Chica and Prof. Jeffrey W. Keillor (Université de Montréal, Montréal, QC) for careful reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Orenca, M. C., Yoon, J. S., Ness, J. E., Stemmer, W. P., and Stevens, R. C. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 238-242
2. Matagne, A., and Frère, J. M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1246**, 109-127
3. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frère, J. M. (1998) *Biochem. J.* **330**, 581-598
4. Knox, J. R. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2593-2601
5. Yang, Y., Rasmussen, B. A., and Shlaes, D. M. (1999) *Pharmacol. Ther.* **83**, 141-151
6. Minasov, G., Wang, X., and Shoichet, B. K. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5333-5340
7. Chen, C. C., and Herzberg, O. (2001) *Biochemistry* **40**, 2351-2358
8. Strynadka, N. C. J., Adachi, H., Jensen, S. E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K., and James, M. N. G. (1992) *Nature* **359**, 700-705
9. Tranier, S., Bouthors, A. T., Maveyraud, L., Guillet, V., Sougakoff, W., and Samama, J. P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28075-28082
10. Shimamura, T., Ibuka, A., Fushinobu, S., Wakagi, T., Ishiguro, M., Ishii, Y., and Matsuzawa, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 46601-46608
11. Meroueh, S. O., Roblin, P., Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S. B., Zhang, Y., Samama, J. P., and Mobashery, S. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9422-9430
12. Díaz, N., Sordo, T. L., Merz, K. M., Jr., and Suárez, D. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 672-684
13. Castillo, R., Silla, E., and Tuñón, I. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1809-1816
14. Abraham, E. P., and Chain, E. (1940) *Nature* **146**, 837
15. Escobar, W. A., Miller, J., and Fink, A. L. (1994) *Biochem. J.* **303**, 555-558

16. Di Gleria, K., Halliwell, C. M., Jacob, C., and Hill, H. A. (1997) *FEBS Lett.* **400**, 155-157
17. Chen, C. C., Rahil, J., Pratt, R. F., and Herzberg, O. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 165-178
18. Guo, F., Huynh, J., Dmitrienko, G. I., Viswanatha, T., and Clarke, A. J. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 132-147
19. Wang, X., Minasov, G., Blázquez, J., Caselli, E., Prati, F., and Shoichet, B. K. (2003) *Biochemistry* **42**, 8434-8444
20. Maveyraud, L., Mourey, L., Kotra, L. P., Pedelacq, J. D., Guillet, V., Mobashery, S., and Samama, J. P. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9748-9752
21. Strynadka, N. C. J., Martin, R., Jensen, S. E., Gold, M., and Jones, J. B. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 688-695
22. Strynadka, N. C. J., Jensen, S. E., Alzari, P. M., and James, M. N. G. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 290-297
23. Page, M. G. F. (2000) *Drug Resist. Updat.* **3**, 109-125
24. Huang, W. Z., Petrosino, J., Hirsch, M., Shenkin, P. S., and Palzkill, T. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**, 688-703
25. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene (Amst.)* **77**, 51-59
26. Cantu, C., III, Huang, W., and Palzkill, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22538-22545
27. Bouthors, A. T., Dagoneau-Blanchard, N., Naas, T., Nordmann, P., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (1998) *Biochem. J.* **330**, 1443-1449
28. Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J. M., and Samama, J. P. (1993) *Proteins* **16**, 364-383
29. Bush, K., and Mobashery, S. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.* **456**, 71-98
30. Page, M. I. (1987) *Adv. Phys. Org. Chem.* **23**, 165-270
31. Wolozin, B. L., Myerowitz, R., and Pratt, R. F. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **701**, 153-163

32. Taibi-Tronche, P., Massova, I., Vakulenko, S. B., Lerner, S. A., and Mobashery, S. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7441-7448
33. Bulychev, A., O'Brien, M. E., Massova, I., Teng, M., Gibson, T. A., Miller, M. J., and Mobashery, S. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5938-5943
34. Maveyraud, L., Massova, I., Birck, C., Miyashita, K., Samama, J. P., and Mobashery, S. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7435-7440
35. Ness, S., Martin, R., Kindler, A. M., Paetzel, M., Gold, M., Jensen, S. E., Jones, J. B., and Strynadka, N. C. (2000) *Biochemistry* **39**, 5312-5321
36. Moews, P. C., Knox, J. R., Dideberg, O., Charlier, P., and Frère, J. M. (1990) *Proteins* **7**, 156-171
37. Zafaralla, G., Manavathu, E. K., Lerner, S. A., and Mobashery, S. (1992) *Biochemistry* **31**, 3847-3852
38. Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J. P., Dehottay, P., Dusart, J., Erpicum, T., Frère, J. M., and Ghuysen, J. M. (1987) *Biochem. J.* **245**, 911-913
39. Swarén, P., Maveyraud, L., Raquet, X., Cabantous, S., Duez, C., Pedelacq, J. D., Mariotte-Boyer, S., Mourey, L., Labia, R., Nicolas-Chanoine, M. H., Nordmann, P., Frère, J. M., and Samama, J. P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26714-26721
40. Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., and Waley, S. G. (1991) *Biochem. J.* **276**, 269-270

Chapitre 3 – Résultats

Analyse par mutagenèse combinatoire de la coopérativité entre résidus du site actif de la β -lactamase TEM-1

Article 2. Combinatorial Active-Site Mutagenesis in TEM-1 β -Lactamase: Probing for Cooperativity Between Key Residues

Manuscrit en préparation, présenté dans une forme pratiquement finale.

Section 3.1 - Présentation de l'article et mise en contexte

À la suite du projet de mutagenèse par saturation à la position 105 de la β -lactamase TEM-1, nous voulions obtenir une vue plus générale du processus catalytique de l'enzyme et de l'ensemble des interactions régissant le développement d'une activité ESBL. Les mutations ponctuelles, quoique très éloquentes quant au rôle potentiel du résidu ciblé, sont assez limitées dans le contexte d'une analyse plus globale de l'enzyme. Ainsi, la mutagenèse combinatoire permet de nous adresser à différents résidus à la fois et la sélection de mutants fonctionnels permet d'explorer des combinaisons de mutations qu'il n'aurait pas été possible d'anticiper autrement.

Afin de créer un contexte combinatoire dans lequel plusieurs résidus de l'enzyme sont mutés simultanément, nous avons désigné cinq acides aminés situés dans la région du site actif qui seront mutés par saturation. En choisissant des résidus situés en proximité du substrat et dont les chaînes latérales pointent autant que possible en direction du ligand, on augmente ainsi les chances que ces résidus interagissent d'une façon ou d'une autre avec le substrat et/ou avec d'autres résidus de l'enzyme. Ainsi, la substitution de ces acides aminés pourrait révéler l'existence de coopérativité entre certains résidus. Tyr-105 fut sélectionné afin de sonder son comportement en combinaison avec quatre autres mutations, permettant ainsi une continuité directe avec le projet présenté au chapitre 2.

Contrairement à l'étude des mutants simples en position 105, toutes les combinaisons de mutants de cette librairie combinatoire (20^5 possibilités au niveau de la séquence protéique) ne pourront être caractérisées. La direction adoptée dans ce projet dicte plutôt la sélection de mutants ayant acquis un profil de résistance envers un antibiotique qui n'est pas reconnu par l'enzyme native, soit le CTX, une céphalosporine de troisième génération.

La première caractérisation des mutants consiste en la détermination de leurs CMI. Les niveaux de susceptibilité aux céphalosporines de première génération restent inchangés, bien qu'ils soient substantiellement réduits pour des pénicillines. La cinétique enzymatique indique que le CTX s'avère être le substrat pour lequel tous les mutants démontrent une amélioration de leur efficacité catalytique. L'analyse des paramètres cinétiques des mutants combinatoires démontre que leur affinité est améliorée envers tous les substrats testés, même dans le cas des pénicillines, pour lesquelles les CMI étaient significativement réduites. Étant donné l'existence de différentes philosophies concernant le calcul des paramètres cinétiques, une justification de la méthode utilisée lors de l'analyse des résultats de cinétique enzymatique est présentée en Annexe 3.

En conclusion, la sélection de variants actifs de la β -lactamase TEM-1 nous a permis d'identifier des mutants ayant non seulement acquis un seuil de résistance envers un substrat qui n'est pas reconnu par l'enzyme native, mais ces mêmes mutants démontrent une conservation de leur profil de résistance envers les céphalosporines de première génération. Bien que la plupart des effets coopératifs entre les résidus ciblés soient additifs (indépendants), la synergie n'est pas exclue et il semble y avoir une certaine interdépendance entre deux résidus (Glu-104 et Tyr-105). Finalement, la combinaison de plusieurs mutations au site actif de TEM-1, couplée à son amélioration ou sa conservation d'activité envers les différents substrats, démontre un certain niveau de robustesse et de plasticité de son site actif, ainsi qu'une meilleure discrimination des différents substrats.

L'idée originale du projet de mutagenèse combinatoire a été développée par Nicolas Doucet. Il est responsable du design expérimental, ainsi que du choix des régions à muter. Ma contribution à ce projet englobe presque tous les aspects expérimentaux (création et sélection des bibliothèques, expression, purification et cinétique enzymatique sur les mutants d'intérêt), sauf quelques étapes initiales de biologie moléculaire dans la création des bibliothèques individuelles. De plus, je suis l'auteur principal de l'article présenté dans ce

chapitre. Ce manuscrit est en préparation, mais est présenté dans sa forme pratiquement finale.

**Combinatorial active-site mutations in TEM-1 β -
lactamase provide more generalized drug recognition**

Pierre-Yves De Wals¹, Nicolas Doucet¹, & Joelle N. Pelletier^{1,2}

¹Département de biochimie et ²Département de chimie

Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-ville

Montréal (Québec)

H3C 3J7 CANADA

Manuscrit en préparation

ABSTRACT

The diversity in substrate recognition spectra exhibited by various β -lactamases can result from one or a few mutations in the active-site area. Using *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase as a template that efficiently hydrolyses penicillins, we performed site-saturation mutagenesis simultaneously on two opposite faces of the active-site cavity. Residues 104 and 105 as well as 238, 240 and 244 were targeted to verify their combinatorial effects on substrate specificity and enzyme activity and to probe for cooperativity between these residues. Selection for hydrolysis of a third-generation cephalosporin, cefotaxime (CTX), led to the identification of a variety of novel mutational combinations at the targeted positions, five of which were characterized in greater detail. *In vivo* survival assays demonstrated a general tendency toward increased CTX and decreased penicillin resistance, while susceptibility to first-generation cephalosporins was relatively unchanged. The five variants characterized had catalytic efficiencies toward CTX improved by two to three orders of magnitude relative to wild-type TEM-1. Productive binding was improved for all substrates tested, even for benzylpenicillin, for which k_{cat} was importantly reduced. This indicates broadened substrate specificity, resulting in less specialized (or more generalized) variants. Present in most of the selected variants, the previously-characterized mutation G238S largely accounted for the observed properties. The additional mutations acted in an additive fashion to enhance these properties. The most efficient variant in CTX hydrolysis did not harbour the mutation G238S but combined two neighbouring mutations that could act synergistically resulting in a similar catalytic generalization. We observed no evidence of synergy between the two faces of the cavity. This work confirms that the active site of TEM-1 β -lactamase tolerates multiple simultaneous amino acid substitutions and that its plastic character allows for substrate spectrum diversification.

Keywords: TEM-1 β -lactamase; combinatorial mutagenesis; protein engineering; antibiotic resistance; extended-spectrum β -lactamase

INTRODUCTION

The rapid evolution of the hydrolase specificity in β -lactamases is an important contributor to antibiotic resistance world-wide. β -Lactamase active sites exhibit increasing sequence diversity, with decades of penicillin and cephalosporin antibiotic use providing the required selective pressure. The appearance and combination of point mutations have resulted in varied recognition spectra for drugs of earlier generations and, increasingly, for more recently developed cephalosporins.

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)¹ are variants that have become efficient at hydrolysing a variety of β -lactam antibiotics that are not normally recognized by native β -lactamases. Generally, the amino acids responsible for ESBL activity are positioned near the substrate-binding site and do not contribute directly to catalysis (1). Residues at positions 104, 238 and 240 (numbering according to Ambler *et al.* (2)) are frequently associated with ESBL resistance and have been previously characterized by mutagenesis in several class A β -lactamases (3-5). A lysine for glutamate substitution at position 104 (E104K) is associated with ESBL activity through the potential formation of an electrostatic interaction between the side chain of Lys-104 and the bulky R₁ substituent of a third-generation cephalosporin substrate such as the negatively-charged ceftazidime (CAZ; Annexe 4) which harbours a carboxylate moiety on its oxime substituent (4-6) (Figure 3.1). Mutation G238S (7) is perhaps the best documented example of conversion of a class A β -lactamase into an ESBL, apparently acting by expanding the active-site cavity to accommodate bulkier substrates such as the third-generation cephalosporin cefotaxime (CTX) (8-11).

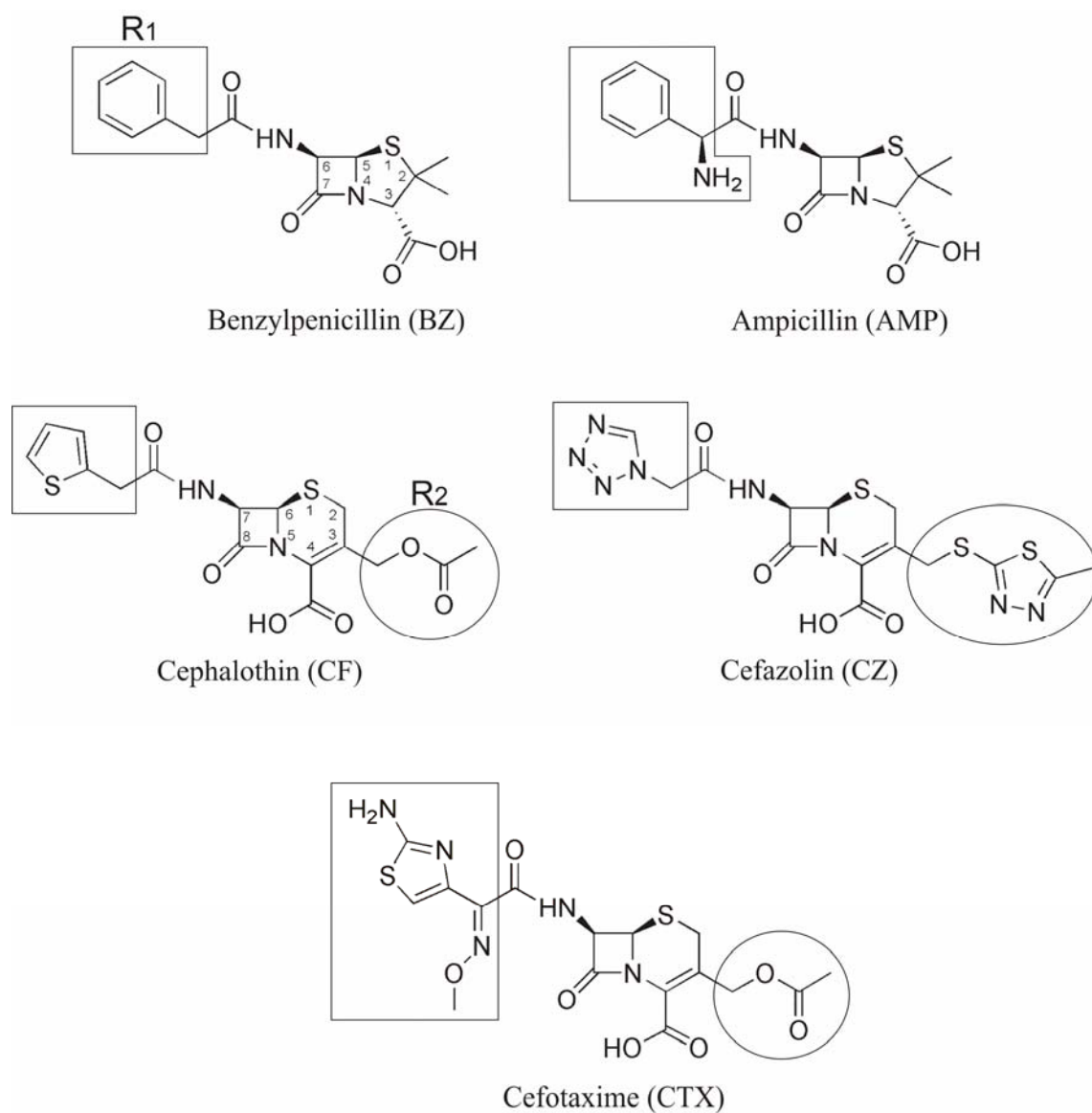


Figure 3.1 Structure of the β -lactam antibiotics used in this study. BZ and AMP are two classical penicillins. CF and CZ are first-generation cephalosporins, whereas CTX is a third-generation cephalosporin. R_1 substituents are framed and R_2 are encircled to highlight the structural differences among the various substrates. Note the bulkiness of R_1 from CTX relative to CF and CZ.

Also, in a similar fashion to position 104, residue 240 has been suggested to form an electrostatic interaction with the oxime carboxylate of CAZ (Annexe 4) (10) or a hydrogen bond with the oxime substituent of CTX, which lacks the carboxylic acid group of CAZ (5). The E240K substitution is particularly advantageous for CAZ hydrolysis, as exemplified by the fact that random mutants of TEM-1 β -lactamase selected in presence of CAZ exhibit either of the positively-charged, long-chain residues Lys or Arg (12).

TEM-1 β -lactamase belongs to the serine hydrolase class A and is the most prevalent member found among Gram-negative bacteria (13). Many drug-resistant mutants of TEM-1, both clinically-identified and laboratory-generated, have been characterized (1,7,12,14). Importantly, acquisition of resistance toward bulky third-generation cephalosporins (which are not conventional substrates of native TEM-1) concomitant with the loss of resistance toward classical substrates such as penicillins and first-generation cephalosporins (5,15,16). For example, the aforementioned point mutation G238S increased TEM-1 resistance toward CTX 8-fold with a concomitant 4-fold decrease in AMP resistance (3). In another case, the combination of amino acid substitutions G238S, E240K and R241D yielded a 16-fold and a 8-fold increases in CTX and CAZ resistance respectively, while reducing AMP resistance 4-fold (16). Switching of substrate profile was often the result of subtle alterations in the active-site topology (17,18). Synergy has been previously observed for both double mutants G238S:E240K (11) and E104M:G238S (15) toward CAZ and CTX hydrolysis, respectively. In these cases, the combination of two mutations yielded multiplicative effects of each point mutation as opposed to a simple additive effect on enzyme activity (19). The E104M:G238S variant has the particularity that the two mutations belong to opposite faces of the active-site cavity (Figure 3.2). Residue 104 belongs to loop 96-116 in the all- α domain while residue 238 belongs to the β 3 strand in the α/β domain; these two residues could contact distinct atoms of the substrate.

Here, we further explore the cooperative effects of multiple active-site mutations on binding and turnover of β -lactam antibiotics in TEM-1 β -lactamase variants. By mutating opposite faces of the active site simultaneously, we probe the extent to which mutations that contact different functional groups of the substrate work in concert to modify substrate recognition. Specifically, we simultaneously randomized five amino acids: Glu-104, Tyr-105, Gly-238, Glu-240 and Arg-244, that are in close proximity to the substrate and belong to two opposite faces of the active-site cavity (Figure 3.2). In addition to the well-characterized mutations at position 104, we examined its neighbour Tyr-105, which is moderately conserved in class A β -lactamases, showing a strong bias for aromatic and, occasionally, small amino acids. We have previously shown that this residue contributes to the structural integrity of the active site, preventing hindrance between more flexible side chains and the substrates (20). On the opposite face of the active site, we mutated the well-characterized position 238 as well as 240 and Arg-244, which is partially conserved in class A β -lactamases (2) and is thought to be involved in the formation of a hydrogen bond with the carboxylate moiety of substrates (21).

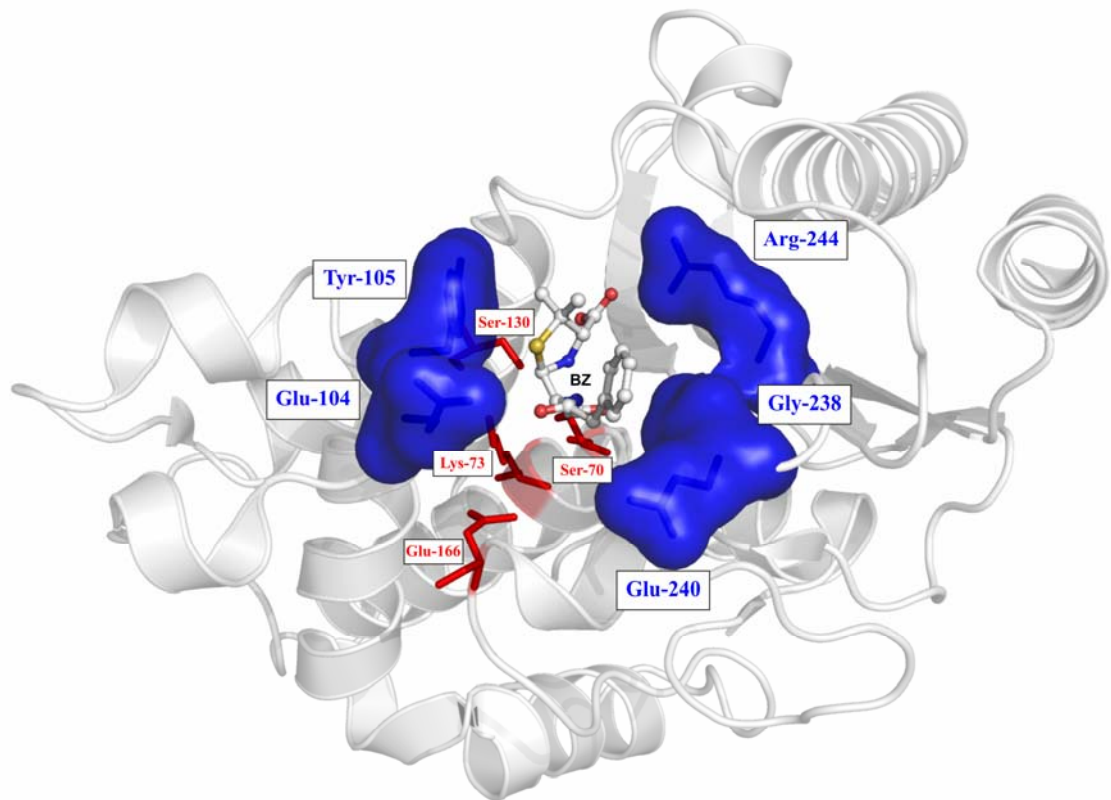


Figure 3.2 Schematic representation of the active site of TEM-1 β -lactamase. Residues targeted for saturation mutagenesis (Glu-104, Tyr-105, Gly-238, Glu-240 and Arg-244) are represented in blue according to their Connolly surface, defined by a 1.6 Å solvent radius. These amino acids form 2 distinct “faces” of the active-site cavity. Residues known to be involved in the catalytic mechanism (Ser-70, Lys-73, Ser-130 and Glu-166) are coloured in red. The co-crystallized BZ is shown in ball-and-sticks representation and is displayed to show its proximity to the targeted active-site positions. PDB coordinates 1FQG.

Using a semi-random approach (22,23), we performed saturation mutagenesis at these five positions in a combinatorial fashion to probe for increased spectrum activity. Selection yielded a variety of combinatorial mutants that exhibit increased third-generation

cephalosporin resistance and decreased penicillin resistance. Although mutants displayed increased affinity toward all substrates, turnover was only enhanced for CTX and considerably reduced for penicillins. Overall, our results show that the active site of TEM-1 β -lactamase tolerates multiple simultaneous amino acid substitutions, indicating a certain degree of plasticity that allows for substrate spectrum diversification.

MATERIALS AND METHODS

Reagents – All enzymes were purchased from MBI Fermentas (Burlington, ON) or New England Biolabs Ltd. (Mississauga, ON). Nitrocefin was purchased from Calbiochem (Mississauga, ON), chloramphenicol (Chl) from A&C American Chemicals Ltd. (Saint-Laurent, QC), ampicillin (AMP) from Bioshop Canada Inc. (Burlington, ON), while benzylpenicillin (BZ), cephalothin (CF), cefazolin (CZ), cefotaxime (CTX) and Fast-Flow DEAE-Sepharose were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Bacterial strains and Plasmids – *Escherichia coli* strain SS320 (F^- *lacI22 lacZ pro-48 met-90 trpA trpR his-85 rpsL azi-9 gyrA λ^- P1^S*) was used for site-directed mutagenesis and *E. coli* strain XL1-Blue (*supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1 lac^- F'* [*proAB⁺ lacI^f lacZ Δ M15 Tn10(*tet^r)*]*) was used for the propagation and expression of plasmid DNA. Plasmid pQE32Chl (20) was used for protein expression and maintained using 12.5 μ g/mL Chl.

Oligonucleotides and Library Creation – Oligonucleotide primers used for mutagenesis were synthesized by Alpha DNA (Montréal, QC) or Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). PCR reactions were performed with a PTC-200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA).

The five positions selected for mutagenesis were initially split into two libraries: library 104-105 and library 238-240-244. Library 104-105 was constructed using the Site-Overlap Extension (SOE) method (24), while library 238-240-244 was constructed using the Megaprimer technique (25). The 861-bp *bla*_{TEM-1} gene was PCR-amplified from pBR322 (which does not contain the V84I and A184V mutations (ref)) using the previously described terminal primers BamHITEMF and TEMHindIIIIR, containing the *Bam*HI and *Hind*III restriction sites respectively (20). Library 104-105 used degenerate primer Lib104-105NNSR (5'-GATGCTTTTCTGTGACTGGTGASNNSNNAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT-3') and primer Lib104-105F (5'-TCACCAGTCACAGAAAAGCATC-3') while library 238-240-244 used degenerate primer Lib238,240,244NNSF (5'-GATAAATCTGGAGCCNNSNNSCGTGGGTCTNNSGGTATCATTGCAGCA-3'). It should be noted that there is no residue 239 in TEM-1 according to the Ambler numbering scheme (2). Digestion of the full-length amplicons with *Bam*HI/*Hind*III was followed by subcloning into *Bam*HI/*Hind*III-digested and shrimp alkaline phosphatase-treated pQE32Chl. The library DNA was electroporated into *E. coli* SS320. Libraries 104-105 and 238-240-244 were constructed individually and later combined *via* the TEM-1 internal *Pst*I restriction site and transformed into *E. coli* XL1-Blue to generate the combinatorial library 104-105-238-240-244. The resulting library contains $\sim 3.4 \times 10^7$ DNA variants (32^5) encoding for 3.2×10^6 unique protein variants (20^5). Prior to selection, library quality was assessed by DNA sequencing. Plasmid DNA was prepared as previously described (26). Sequencing of 36 clones was performed by the dideoxy chain termination method using the Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, OH) with a dye-labeled primer (Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NB) and a Long ReadIR 4200 Li-Cor automated DNA sequencer.

Selection of Cefotaxime-resistant Variants – The 104-105-238-240-244 combinatorial library in *E. coli* XL1-Blue was plated on solid Luria-Bertani (LB) medium

containing 250 ng/mL CTX, thus inhibiting wild-type growth. After selection, colonies were individually picked for identification of mutations by DNA sequencing. Overall, less than 1% of the whole library was screened (32^5 DNA variants).

β -lactamase Expression and Purification – A 10-ml overnight culture of each selected mutant of interest was used to inoculate 1 L of LB without antibiotics. Cells were propagated at 37 °C with agitation until $A_{600\text{ nm}} = 0.6\text{-}0.8$. Protein expression was induced with 1 mM (final concentration) isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) at 37 °C for an additional 3 hrs until the culture reached late log phase. Cells were pelleted by centrifugation (20 min, 6000 g, 4 °C), resuspended in 10-15 mL of 10 mM Tris-Cl buffer pH 7.0 and separated into 1 mL aliquots. A gentle lysis of the outer membrane of *E. coli* was performed by four 2-min freeze-thaw cycles using a dry ice/ethanol bath and a 37 °C water bath followed by centrifugation (15 min, 20 000 g, 4 °C) to collect the supernatant.

Purification of mutants was performed according to the following single-step anion-exchange chromatography procedure. All steps were undertaken at room temperature on a Pharmacia LKB high performance liquid chromatography apparatus (Pharmacia LKB Technology, Uppsala, Sweden). Pooled supernatant (~15 mL) was applied to a DEAE-Sepharose column (1.6 cm \times 30 cm) at a flow rate of 1 mL/min followed by a wash with 4.5 column volumes (CV) of 10 mM Tris-Cl buffer pH 7.0 at a flow rate of 3 mL/min. Mutant enzymes were eluted with a linear gradient of 10-150 mM Tris-Cl buffer pH 7.0 (6.5 CV) and a subsequent wash was performed with 150 mM Tris-Cl pH 7.0 (3 CV). The column matrix was regenerated by applying ≥ 6 CV of 1 M Tris-Cl pH 7.0 between each purification.

Fractions containing β -lactamase were identified by a qualitative nitrocefin hydrolysis assay and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with Coomassie Brilliant Blue staining. Analysis of gel patterns with Scion Image (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) revealed that wild-type TEM-1 and mutants VNSTR² and

VNSLR were purified to 80-90% homogeneity while the purity of mutants SWSSR, PHSER and EYNHR was estimated to be 30-50%. The approximate yield was 2 mg/L except for mutant SWSSR that gave a low yield upon purification (1.2 mg/L), likely as a result of poor solubility and/or expression. The purified enzymes were stored at 4 °C. To ensure that no β -lactamase activity was carried over following each mutant purification, a mock purification was run by injecting 10 mM Tris-Cl buffer as a sample, followed by a nitrocefin assay.

The low purity of mutants SWSSR, PHSER and EYNHR was attributed to a predominant contaminating band that ran at a molecular weight of ~ 3 kDa above the mutants on SDS-PAGE. This contaminant could be resolved using a Ni-NTA agarose affinity column according to the procedure recommended by the manufacturer (Qiagen, Mississauga, ON). Following a 3-hour dialysis at 4 °C against 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), a spectrophotometric assay with nitrocefin ($\Delta\epsilon_{482\text{ nm}} = 17\,400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; (21)) on eluted fractions demonstrated that only the band corresponding to the TEM-1 mutant was responsible for the hydrolysis of nitrocefin, confirming that the contaminant does not contribute to β -lactam hydrolysis. Despite the greater purity of these samples, the overall purification yield was too low to perform the required kinetic experiments. Thus, all kinetics were performed using the DEAE-purified samples.

Antibiotic Susceptibility – Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilutions according to Cantu III *et al.* (27). Briefly, 1×10^4 *E. coli* XL1-Blue CFUs were inoculated into microtiter plates containing 100 μL of LB media and 2-fold dilutions of the antibiotic being tested. The ranges tested were as follows: 250-10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BZ, 64-10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMP, 32-125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CF, 8-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CZ and 0.125-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTX. Each MIC determination was performed in triplicate. The plates were examined visually and the lowest antibiotic concentration at which bacterial growth was inhibited was recorded as the MIC.

Enzyme Kinetics – K_M and k_{cat} for BZ, CF, CZ and CTX were determined at room temperature in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. The following extinction coefficients and concentration ranges were used: $\Delta\epsilon_{232\text{ nm}} = 1100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for BZ (50-300 μM) (28), $\Delta\epsilon_{262\text{ nm}} = 7960\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CF (20-250 μM) (28), $\Delta\epsilon_{260\text{ nm}} = 7900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CZ (20-250 μM) (29) and $\Delta\epsilon_{264\text{ nm}} = 7250\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for CTX (25-250 μM) (3). Substrate hydrolysis was monitored according to initial steady-state velocities for six substrate concentrations generally flanking the K_M values (where allowed by the extinction coefficients and the K_M values) using a Cary 100 Bio UV-visible spectrophotometer (Varian Canada Inc., Montréal, QC). The kinetic parameters were determined from the rates of hydrolysis calculated from the initial linear portion of the curve and fitted to a Lineweaver-Burk ($1/V$ vs. $1/[S]$) plot. In most cases, initial rates were also analyzed with the software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) by a non-linear regression curve corresponding to the Michaelis-Menten equation. The k_{cat} parameter was determined using the equation $k_{cat} = V_{max}/[E]$, where the concentration of enzyme was determined using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) taking into account its purity, estimated as described above.

RESULTS

Selection of Resistant Mutants from the Combinatorial Library – In order to gain a better understanding of the role of specific residues giving rise to ESBLs, of their implication in β -lactam drug hydrolysis and on the potential cooperativity between specific areas of the active site, codons 104, 105, 238, 240 and 244 were combinatorially replaced using a semi-random saturation mutagenesis approach (22). These residues belong to two opposite active-site walls of TEM-1 β -lactamase (Figure 3.2).

Prior to selection, DNA sequencing of 36 clones from the library revealed no secondary mutations. The randomized nucleotides diverged quantitatively from the expected distribution although all expected nucleotides were encoded at a frequency ensuring adequate randomization of the five target residues. Selection of the combinatorial library yielded 34 resistant clones, several of which were redundant (Table 3.I). The double mutant EYSKR² was the most prevalent variant selected, representing over one-third of the sequenced population, while other variants were all found in a small number of copies. In total, 4 double-, 3 triple- and 4 quadruple-mutant combinations were identified. Among the variants, nine novel mutational combinations were identified while two mutational combinations have been previously characterized (EYSKR and EYSRR) (10,27).

The opposite active-site walls 104-105 and 238-240-244 exhibited different mutational patterns in the selected variants. For instance, roughly two-thirds of all variants displayed wild-type amino acids at positions 104 and 105 while position 238 was mutated in all cases. Similarly, position 240 was replaced in most cases, with the exception of variants PHSER, QWSER and RWSER (Table 3.I). Interestingly, all selected mutants carried the wild-type arginine at position 244, suggesting that this residue is intolerant to mutation in this particular combinatorial context. Moreover, with the sole exception of variant EYNHR, all selected mutants encoded the G238S mutation, which is sufficient to confer extended-spectrum antibiotic resistance on its own (7). Based on the widest chemical diversity observed at these five mutated positions, the novel variants VNSLR, SWSSR, PHSER and EYNHR were chosen for further characterization by *in vivo* antibiotic resistance and enzyme kinetics. Mutant VNSTR was also characterized in order to compare it to VNSLR, as they differ only by one amino acid at codon 240 (Leu or Thr). Variant VNSLR combines three mutations: E104V, which has only been observed in the CTX-hydrolysing class A D488 β -lactamase from *Kebsiella oxytoca* (30); the highly-active Y105N mutation described in TEM-1 (20); and the novel E240L replacement that has never been characterized.

Table 3.I Identification of TEM-1 β -lactamase mutants selected on media containing 250 ng/mL CTX.

Mutated positions					Frequency of occurrence
104	105	238	240	244	
E	Y	G	E	R	0 (WT TEM-1)
E	Y	S	K	R	14
E	Y	S	R	R	4
Q	W	S	E	R	4
E	Y	S	T	R	3
V	N	S	T	R	2
R	S	S	T	R	2
E	Y	N	H	R	1
P	H	S	E	R	1
R	W	S	E	R	1
S	W	S	S	R	1
V	N	S	L	R	1

The E240T substitution of the similar variant VNSTR has been observed in other class A β -lactamases, such as in the PC1 β -lactamase from *Staphylococcus aureus* (2,31), but has not been characterized in detail.

In vivo Antibiotic Susceptibility – In order to assess the effects of the multiple mutations on *in vivo* antibiotic resistance, we determined the MICs for *E. coli* XL1-Blue cells expressing the TEM-1 mutants VNSTR, VNSLR, SWSSR, PHSER and EYNHR (Table 3.II). Wild-type TEM-1 and *E. coli* XL1-Blue lacking TEM-1 expression both served as positive and negative controls, respectively. MIC values were calculated for two classical penicillins (BZ and AMP), two first-generation cephalosporins (CF and CZ), and the third-generation cephalosporin cefotaxime (CTX) that was used for the selection step. The absolute values of concentrations inhibiting bacterial growth are higher for penicillins (64-10,000 µg/mL) than for cephalosporins (0.125-125 µg/mL). This result was not unexpected since cephalosporins have been developed in order to counteract the resistance phenotypes experienced with standard penicillins (32,33). This difference is yet more pronounced for CTX since this extended-spectrum antibiotic belongs to a subsequent generation of cephalosporin substrates that are not efficiently hydrolysed by the native enzyme (34). As a consequence, the wild-type MIC value for CTX is no higher than for the negative control (*E. coli* XL1-Blue) (Table 3.II).

Because the library selection was undertaken on CTX-containing media, increased CTX MIC values were expected from the five selected variants investigated. Indeed, CTX resistance was significantly improved for all five mutants, as demonstrated by their increase in MIC values up to one order of magnitude (Table 3.II). The susceptibility of all mutants toward first-generation cephalosporins (CF and CZ) remained in the same range as the wild-type enzyme. Thus, a maximum two-fold decrease for CF was observed relative to the wild-type enzyme. The conservation of native-like resistance toward first-generation cephalosporins demonstrates a certain mutational tolerance in the active site of the enzyme. This result suggests that mutants preserved an active-site topology and structural interactions appropriate for the recognition of all cephalosporin substrates tested. Interestingly, these CTX-resistant variants exhibit an important reduction in resistance toward penicillin substrates.

Table 3.II Minimum inhibitory concentrations of *E. coli* XL1-Blue cells containing wild-type or mutant β -lactamases

β -lactamase variants	Substrates ($\mu\text{g/mL}$)				
	CTX	AMP	BZ	CF	CZ
None ^a	0.125	64	250	32	8
WT TEM-1 ^b	0.125	10,000	10,000	125	64
E Y G E R	0.125	10,000	10,000	125	64
V N S L R	0.5	250	500	64	64
P H S E R	0.5	250	500	125	32
E Y N H R	0.5	500	500	64	16
S W S S R	0.75	1,000	1,000	64	32
V N S T R	2	250	1,000	64	32

^a *E. coli* XL1-Blue.

^b The five-letter nomenclature identifies mutants according to amino acids found at positions 104, 105, 238, 240 and 244, respectively.

For both AMP and BZ, MIC values dropped by a minimum of one order of magnitude relative to wild-type TEM-1. With the exception of CTX, no significant *in vivo* survival enhancements were observed for the other substrates tested. Even mutant VNSTR, that exhibited the highest MIC for CTX (2 $\mu\text{g/mL}$), with an approximate 3-fold increase

relative to the second best CTX-resistant mutant (SWSSR, 0.75 µg/mL), showed no increase in resistance toward any other substrate tested. Moreover, it should be noted that despite their different mutations, the MICs calculated for the five selected variants were similar, with only two- to four-fold differences amongst each other. This suggests that TEM-1 can withstand various combinations of multiple mutations in the vicinity of the active site while maintaining a certain level of resistance, albeit lower than wild-type TEM-1 in the case of penicillins.

Enzyme Kinetics – Steady-state kinetic parameters (k_{cat} and K_{M}) were determined for the five selected mutants as well as for wild-type TEM-1, toward BZ, CF, CZ and CTX (Table 3.III). The kinetic parameters of the point mutant G238S determined under similar conditions for these substrates (3,18) are provided as a basis for assessment of the role of the additional mutations on catalysis. The low molar absorptivity coefficient of AMP and the resulting high background precluded rigorous quantification of its hydrolysis and is not presented.

In agreement with previous reports (3,35), wild-type TEM-1 β -lactamase exhibited relatively low CTX turnover (k_{cat}) and poor productive CTX binding (K_{M}), resulting in a weak catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) toward CTX hydrolysis (Table 3.III). Overall, the greatest improvement in CTX hydrolysis relative to the wild-type was the ~80-fold enhancement in k_{cat} for variant PHSER. This variant also exhibited the greatest reduction of BZ hydrolysis ($k_{\text{cat}} = 1\%$ of wild-type, as for variant VNSTR).

While the native amino acid at position 240 (Glu) is negatively charged, the mutation either to a neutral polar residue (E240T) in variant VNSTR or to a hydrophobic mutation (E240L) in VNSLR resulted in variants with similar kinetic parameters (k_{cat} , K_{M}) relative to all substrates tested, differing 3-fold at most. VNSTR and VNSLR exhibited 10- to 30-fold improvements in their k_{cat} (increased) and K_{M} (decreased) parameters for CTX

relative to wild-type (Table 3.III). Decreased K_M was also observed for the two first-generation cephalosporins tested as well as for benzylpenicillin.

In contrast, their turnover number for first-generation cephalosporin hydrolysis decreased 2- to 8-fold. Their reduction in k_{cat} was even more pronounced for the penicillin BZ, reaching 1% of wild-type activity. Overall, mutant VNSLR exhibited one of the highest affinities and catalytic efficiencies for most substrates tested. Importantly, the greatest differences lie in comparing all variants to the wild-type enzyme; differences among the mutants are much less important for any given parameter, consistent with the results of *in vivo* resistance experiments (Table 3.II). Interestingly, all mutants displayed similar K_M ratios relative to wild-type toward CTX (third-generation cephalosporin) and CF (first-generation cephalosporin) but not CZ (also a first-generation cephalosporin). However, higher k_{cat} ratios relative to wild-type for CTX than for CF yield greater relative improvements in catalytic efficiency toward CTX (Table 3.III).

Point mutant G238S is known to enhance extended-spectrum hydrolysis (3,7). In order to discern the effects of the additional mutations relative to the single G238S substitution, kinetic parameters of the selected variants were compared to that mutant (Table 3.III). For almost all variants and for the four substrates tested, the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) show improvements relative to the G238S mutant. These enhancements in k_{cat}/K_M can be attributed to the additional mutations at positions 104, 105 and 240. Comparison of kinetic parameters of the selected variants with the wild-type or with the G238S mutant generally shows that improvements in either k_{cat} or K_M did not exceed one order of magnitude for CF and CZ hydrolysis. Changes were more important for BZ and CTX because native TEM-1 is not efficient in CTX recognition or hydrolysis but has the highest activity toward BZ. On the other hand, poor BZ hydrolysis and good activity toward CTX is observed for mutant G238S (Table 3.III). Thus, comparison of mutant kinetic efficiencies with the wild-type enzyme yielded high values for CTX and low values for BZ.

Table 3.III Kinetic parameters for wild-type TEM-1 β -lactamase and the combinatorial mutants.

Substrates	TEM-1 variants	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} relative to WT	K_M (μM)	K_M relative to WT	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_M relative to WT	k_{cat}/K_M relative to G238S
CTX ^c	TEM-1 WT (EYGER ^a)	0.74 ± 0.1^b	1	840 ± 160	1	8.8×10^2	1	6.3×10^{-3}
	VNSTR	23 ± 7	31	72 ± 13	0.09	3.2×10^5	360	2.3
	VNSLR	20 ± 2	27	28 ± 7	0.03	7.1×10^5	810	5.1
	SWSSR	20 ± 2	27	40 ± 7	0.05	5.0×10^5	570	3.6
	PHSER	61 ± 6	82	113 ± 9	0.13	5.4×10^5	614	3.9
	EYNHR	55 ± 10	74	61 ± 9	0.07	9.0×10^5	1020	6.4
	G238S ^d (EYSER)	16 ± 2	22	124 ± 47	0.15	1.4×10^5	160	1
CF	TEM-1 WT (EYGER)	77 ± 4	1	180 ± 28	1	4.3×10^5	1	1.1
	VNSTR	10 ± 0.3	0.13	16 ± 0.6	0.09	6.3×10^5	1.5	1.6
	VNSLR	16 ± 0.5	0.21	5 ± 1	0.03	3.2×10^6	7.4	8.2
	SWSSR	24 ± 3	0.31	10 ± 5	0.06	2.4×10^6	5.6	6.2
	PHSER	31 ± 6	0.40	7 ± 2	0.04	4.4×10^6	10.2	11.3
	EYNHR	31 ± 5	0.40	11 ± 1	0.06	2.8×10^6	6.5	7.2
	G238S ^d (EYSER)	3 ± 1	0.04	8 ± 5	0.05	3.9×10^5	0.91	1
CZ	TEM-1 WT (EYGER)	69 ± 13	1	130 ± 9	1	5.3×10^5	1	1.1
	VNSTR	38 ± 7	0.55	83 ± 7	0.67	4.6×10^5	0.87	0.94
	VNSLR	41 ± 1	0.59	28 ± 2	0.22	1.5×10^6	2.8	3.1
	SWSSR	50 ± 9	0.72	55 ± 14	0.44	9.1×10^5	1.7	1.9
	PHSER	88 ± 4	1.3	61 ± 9	0.49	1.4×10^6	2.6	2.9
	EYNHR	82 ± 9	1.2	120 ± 23	0.98	6.8×10^5	1.3	1.4
	G238S ^e (EYSER)	170	2.5	347	2.8	4.9×10^5	0.93	1
BZ	TEM-1 WT (EYGER)	1660 ± 230	1	62 ± 21	1	2.7×10^7	1	79
	VNSTR	19 ± 1	0.01	17 ± 7	0.27	1.1×10^6	0.04	3.2
	VNSLR	29 ± 2	0.02	15 ± 2	0.24	1.9×10^6	0.07	5.6
	SWSSR	ND ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	PHSER	20 ± 4	0.01	31 ± 6	0.50	6.5×10^5	0.02	1.9
	EYNHR	35 ± 4	0.02	106 ± 18	1.7	3.2×10^5	0.01	0.94
	G238S ^d (EYSER)	3.9 ± 0.4	0.002	12 ± 1	0.19	3.4×10^5	0.01	1

(Footnotes on next page)

- ^a The five-letter nomenclature identifies mutants according to amino acids found at positions 104, 105, 238, 240 and 244, respectively.
- ^b Mean value \pm standard deviation error.
- ^c Values confirmed by non-linear regressions.
- ^d Values obtained from Cantu III *et al.* (27).
- ^e Values obtained from Raquet *et al.* (18).
- ^f ND, not determined.

DISCUSSION

In this work, we systematically investigated the potential cooperative effects of amino acid substitutions at five positions belonging to two opposite active-site faces of TEM-1 β -lactamase. We performed saturation mutagenesis at residues 104, 105, 238, 240 and 244 in a combinatorial fashion to probe for increased ESBL activity and cooperativity between mutated residues. Selection against CTX allowed identification of several active TEM-1 mutants displaying a variety of substitutions at four of the five targeted positions. Among all randomized positions, only Arg-244 remained invariable.

Arg-244 – The conservation of this residue was not entirely unexpected since Arg-244 mutations in TEM-1 are not associated with ESBL activity, but rather with inhibitor resistance (7,12). We nonetheless randomized this residue to evaluate if changes in its environment resulting from neighbouring, concomitant mutations would allow its contribution to the ESBL phenotype. Its strict conservation is consistent with its proposed role in substrate stabilization (21) and suggests that the role of Arg-244 in CTX recognition

cannot be compensated by any other mutation (or combination of mutations) at positions 104, 105, 238 or 240.

Glu-240 – Position 240 displays a fair diversity in amino acid substitutions, both among the CTX-resistant combinatorial variants we selected (Glu, Arg, Lys, Thr, Ser, His and Leu) and also among class A β -lactamases (2,36). While TEM ESBLs either harbour Arg, Lys or Val at this position (Annexe 1), the most frequent mutation identified in natural isolates (E240K) was identified in only one combination among the CTX-resistant variants selected here, albeit in the most frequently selected sequence (EYSKR, Table 3.I). This diversity suggests that other residues than lysine at position 240 may confer similarly advantageous properties toward CTX hydrolysis when combined with simultaneous mutations at positions 104, 105 and 238. On the basis of its electrostatic potential, the E240K mutation has been suggested to assist in the binding of third-generation cephalosporins, enhancing the kinetic properties of the enzyme (5,10). The effect of this mutation relies on chemical complementarity with the substrate, with which it may form electrostatic or hydrogen bonding interactions. Among the selected variants, all but Leu have hydrogen-bonding capacity, suggesting that this feature may be exploited in most of the mutants. However, the Leu mutation suggests that it is not an essential feature. The consistently low K_M of mutant VNSLR for all substrates tested illustrates that mutation E240L is not detrimental for substrate recognition in the context of the additional mutations at positions 104, 105 and 238 (Table 3.III). Moreover this replacement confirms the moderate natural variability observed at position 240 in class A β -lactamases.

Gly-238 – CAZ-selected mutants of TEM-1 harbouring either a serine or an asparagine at position 238 have previously been observed (27). Natural TEM ESBL isolates frequently harbour the same G238S mutation (approximately 20% of isolates) but not the asparagine mutation (Annexe 1). This is likely due to the requirement for two nucleotide changes necessary to modify the glycine codon to asparagine rather than the evolutionarily more achievable single nucleotide change required for the serine substitution. While the

G238N mutation only provides for modest ESBL activity and is approximately one order of magnitude less efficient in third-generation cephalosporin hydrolysis than G238S (3), this single substitution still provides a catalytic efficiency one order of magnitude greater than wild-type toward hydrolysis of CTX and CAZ (3). Consistent with a previous report that identified Ser and Asn as the only productive replacements of Gly-238 conferring high *in vivo* CAZ activities (27), all the CTX-resistant mutants identified in the present study display the G238S mutation with the sole exception of the double mutant EYNHR (displaying G238N).

While it was initially proposed that the Ser-238 hydroxyl was implicated in hydrogen bonding with the R₁ substituent of CTX (37,38), CTX hydrolysis has also been observed with the hydrogen bonding-deficient G238A mutant (3,39), illustrating that this interaction is not essential for CTX hydrolysis. Moreover, crystal structures and molecular modelling studies have shown that Ser-238 is not appropriately positioned to hydrogen bond with CTX (9,35). Consequently, several authors have suggested that substitution of the native Gly-238 displaces the bottom edge of the β 3 strand (9,10), expanding the active-site cavity to accommodate bulkier substrates (*i.e.* extended-spectrum β -lactam antibiotics). Alternatively, steric hindrance observed between the Ser-238 hydroxyl and the main-chain of Asn-170 has been proposed to be relieved through a shift of the Ω -loop, also resulting in the widening of the active-site cavity (3,35,40,41). While both of these structural hypotheses have been supported by elements of kinetic evidence (3,10,11,35), analysis of the crystal structures of ESBL mutants TEM-52 (9) and SHV-2 (8) have substantiated the β 3 strand displacement hypothesis.

The observation of the G238S and G238N mutations in all our CTX-resistant variants suggests that the structural effect of these replacements on CTX hydrolysis is unmatched by any other mutation at this position. Moreover, considering that the catalytic improvements resulting from additional mutations at positions 104, 105 and 240 only moderately increase CTX hydrolysis relative to mutant G238S (Table 3.III), it is likely that

displacement of the β 3 strand is an independent and compulsory structural requirement of CTX hydrolysis in TEM-1 that is expected to be present in most, if not all of the mutants selected in the present study.

Tyr-105 – With few exceptions, aromatic and small amino acids are conserved at position 105 in class A β -lactamases, a structural and functional requirement that has previously been rationalized by the necessity to form a stable surface to the active-site cavity in TEM-1 (20). The mutations observed at position 105 in the combinatorial context of the variants selected in the present study (Tyr, Trp, His, Asn and Ser) form a sub-group of those amino acids and support the necessity for this residue to be small or planar to prevent steric clashes with the substrate. The neighbouring mutations at positions 104, 238 and 240 did not broaden the variety of functional residues at position 105, demonstrating that the previously observed negative effects of its replacement on binding and catalysis (20) cannot be compensated by mutations at positions 104, 238 and 240. Interestingly, while the selected mutants contained the wild-type tyrosine at position 105 in combination with a variety of mutations at positions 238 and 240 (Table 3.I), it was combined with no other residue than the wild-type glutamate at position 104 (and *vice versa*). This suggests that the wild-type E104:Y105 sequence is a highly favoured pair in which Glu-104 and Tyr-105 act in an interdependent fashion. Mutation of either one may allow mutation of the second to form new, favoured pairs. Similar results had been obtained in a previous combinatorial study of TEM-1 residues 103-105 (14).

Glu-104 – In class A β -lactamases, position 104 displays a modest variety of side chains, either hydrophobic (Val or Pro), polar (Ser) or charged (Glu) (2,14,36). In addition, the E104K mutation is the only substitution observed among natural ESBL TEM isolates, being present in >25% of cases (Annexe 1). While this mutation increases hydrolysis of third-generation cephalosporins, the E104K mutation alone is not sufficient to confer *in vivo* resistance unless combined with G238S, yielding the clinically-significant double mutant E104K:G238S (TEM-15) (39,42). In TEM-1, the wild-type Glu-104 is involved in

correct positioning of the catalytically-significant SDN loop, encompassing residues 130-132 (4). In SHV-1 β -lactamase, certain Asp-104 substitutions have been suggested to modify the topology of loop 101-111, thereby potentially affecting enzyme function and substrate spectrum (6). The E104K mutation has been suggested to hydrogen-bond with the oxime substituent of CTX and to form an electrostatic contact with the oxime carboxylate moiety of CAZ (5). Similar to the results observed at position 240, our selected mutational combinations displayed a relatively wide variety of mutations at position 104. However, although we sequenced it among the non-selected clones, the E104K mutation found in many ESBL enzymes was not observed in any of our combinatorial CTX-selected mutants, suggesting that other E104 replacements offer similar or greater catalytic advantages in this combinatorial context.

The fair diversity observed at positions 104 and 240 did not result in large variation in kinetic parameters among the selected mutants. This may result from both positions being solvent-exposed and relatively unconstrained (6,20). For instance, the conformation adopted by Ser-104 in BlaC β -lactamase from *Mycobacterium tuberculosis* is oriented away from the substrate-binding site, expanding the active site and partly accounting for its broad-spectrum substrate profile (43). Variations in the positioning of residue 104 can also affect the SDN loop (4), or loop 101-111 as observed in SHV-1 β -lactamase (6). Thus, repositioning of residues 104 and 240 in the selected variants could contribute to active-site expansion, leading to binding of bulkier substrates in the cavity. The chemical diversity of side chains allowed at position 240 in the CTX-resistant mutants (charged, polar or hydrophobic) (Table 3.I) demonstrates that the previously suggested electrostatic interaction of residue 240 with the oxime substituent of third generation cephalosporins (10) is not strictly essential to confer increased CTX activity in the combinatorial context presented here. Moreover, this observation is supported by the previous selection of the CTX-resistant mutant E240G (44), which also displays a higher catalytic efficiency than wild-type toward CTX (45). We therefore propose that replacements at both positions 104

and 240 are mainly structural requirements that support productive binding of CTX rather than to favour direct molecular interactions with the substrate. Our experimental results are consistent both with the active-site expansion through displacement of the β 3-strand caused by the G238S and G238N mutations and flexibility of residues 104 and 240, that could open the lower region of the active site and allow expansion.

Catalytic Properties of the Combinatorial Mutants

EYNHR – Upon simultaneous mutation, residues may behave either in an independent or in an interdependent fashion toward protein function (19). In TEM-1, synergy has previously been observed for both double mutants G238S:E240K (11) and E104M:G238S (15) toward CAZ and CTX hydrolysis, respectively, while additivity has been reported for mutant E104M:G238S toward cefuroxime hydrolysis (second-generation cephalosporin) (15). Comparing our selected mutants to G238S demonstrates that the major contribution in CTX catalytic efficiency comes from this substitution (Table 3.III). However, the double mutant EYNHR (G238N:E240H) confers an important 10^3 -fold catalytic efficiency improvement relative to wild-type TEM-1, a result that cannot be attributed to the G238N mutation alone. G238N has been shown to account only for a 10-fold increase in catalytic efficiency toward the third-generation cephalosporins CTX and CAZ, as well as mild improvements in K_M toward penicillins and first- and second-generation cephalosporins (CF and cephaloridine) (3). Unless mutation E240H provides a 900-fold improvement in catalytic efficiency on its own (which is unlikely considering the negative effects in CTX catalytic efficiencies conferred by various mutations at this position in several class A enzymes (28,46)), the G238N:E240H combination would therefore behave in a synergistic manner in promoting CTX hydrolysis. This observation may partly explain the fact that EYNHR, which does not carry the G238S mutation, nevertheless boasts the greatest increase in efficiency of CTX hydrolysis.

Comparing EYNHR with the G238N point mutant (3) also reveals that the combination of the two mutations is responsible for the decrease in penicillin resistance (5- to 10-fold). EYNHR showed a 10-fold K_M increase for BZ (106 vs. 9 μM), a 10-fold K_M decrease for CF (11 vs. 100 μM) and a modest 4-fold K_M decrease for CTX (61 vs. 244 μM) relative to G238N (3). Therefore, mutation E240H raised the K_M of BZ while reducing the K_M of cephalosporins, thus switching the substrate profile of mutant EYNHR to improve discrimination between penicillins vs. cephalosporins in favour of cephalosporin binding and hydrolysis. Thus, the association of G238N:E240H was sufficient for acquisition of the extended substrate spectrum, survival and kinetic enhancements, with no mutation at the opposite face of the active site (104 and/or 105).

SWSSR – Mutant SWSSR, which harbours the four mutations E104S:Y105W:G238S:E240S, encodes E104S, a point mutation responsible for increased catalytic efficiency toward penicillins and cephalosporins (4) as well as a Trp at position 105, which was the only point mutation that increased catalytic efficiency toward BZ and CF in TEM-1 (20). E104S and Y105W, which are individually responsible for modest increases in k_{cat}/K_M relative to WT, appear to display cooperativity with G238S and the uncharacterized E240S to provide SWSSR with increased catalytic efficiencies toward cephalosporins. Interestingly, this TEM-1 quadruple mutant showed a modest six-fold increase in CTX MIC relative to wild-type TEM-1, while the SHV-1 β -lactamase double mutant D104S:G238S boasted a 130-fold increase in CTX MIC relative to wild-type SHV-1 (albeit only an eight-fold increase for the other third-generation cephalosporin CAZ) (6). Although the combinatorial contexts are not identical and both enzymes may behave differently as a result of other differences at their active sites, mutations Y105W and/or E240S in the TEM-1 mutant SWSSR may have a damping effect on CTX resistance.

PHSER – In addition to G238S, the triple mutant PHSER (E104P:Y105H:G238S) also combines two previously characterized beneficial point mutations, which likely account for its high catalytic efficiency for all substrates tested. In TEM-1, mutation E104P

is advantageous toward the affinity and hydrolysis of various substrates (including CTX) (4) while mutation Y105H displays native-like levels of resistance toward penicillins and first-generation cephalosporins (20). In SHV-1, MICs of mutant D104P:G238S have revealed that its cephalosporin resistance is one to two orders of magnitude above WT and practically unchanged for AMP (6). Although differentiated by the Y105H substitution, PHSER remains similar to the SHV-1 double mutant D104P:G238S, showing no significant variation for first-generation cephalosporin substrates. However, PHSER showed a great decrease in AMP resistance (Table 3.II). The antagonistic effect toward AMP hydrolysis may result from mutation Y105H or from the combinatorial context in which these mutations arise.

VNSTR/VNSLR – The two quadruple mutants VNSTR and VNSLR (E104V:Y105N:G238S:E240T/L) differ only by their substitution at position 240. While both variants displayed important increases in CTX hydrolysis *in vivo* and *in vitro*, this latter mutation resulted in a greater MIC for CTX by mutant VNSTR while mutant VNSLR displayed a slightly better catalytic efficiency toward all substrates tested. It has been proposed that a hydrophilic residue at position 240 could interact with a cephalosporin substrate such as CTX by hydrogen-bonding to the oxygen or nitrogen atoms of the oxime substituent of the ligand (5). One would thus expect that mutant VNSTR, exhibiting a polar threonine at position 240, should manifest the best productive affinity (lowest K_M) for the cephalosporin substrates. However, although both VNSTR and VNSLR featured similar K_M values for the three cephalosporins tested (Table 3.III), VNSLR always exhibited slightly better K_M values relative to VNSTR (~2.5-fold reduction). This observation demonstrates that productive binding is slightly better with a hydrophobic residue (Leu) at position 240 in the context of concomitant replacements at positions 104, 105 and 238 and demonstrates that a hydrophilic residue at this position is not strictly essential to confer the ESBL phenotype.

Promiscuity, Robustness and Plasticity in Substrate Binding

Our results illustrate that TEM-1 can incorporate several combinations of mutations in the vicinity of the active site with conservation or improvement of its hydrolytic function toward a variety of substrates. It has been previously noted that mutants at position 238, alone and in combination with substitutions at position 104, lose a great deal of activity toward the penicillins AMP and BZ while increasing their efficiency for third-generation cephalosporins hydrolysis (18,27,39). The overall behaviour of the mutants selected in the present study follows the same pattern since all variants selected against CTX exhibited increased activity toward CTX at the expense of that for BZ. In fact, the combined effects of k_{cat} and K_{M} resulted in a two- to three-order of magnitude improvement of catalytic efficiency toward CTX hydrolysis, a conservation or slight improvement in the hydrolysis of first-generation cephalosporins and a one- to two-order of magnitude decrease in BZ hydrolysis (Table 3.III). This characteristic appears to be common also among TEM ESBL variants but is not limited to this family of enzymes (5,18,47-49). Thus, despite selection having been directed exclusively toward CTX hydrolysis, the evolution of this promiscuous binding function (50) (CTX binding) remained compatible with recognition of first-generation cephalosporins. Being relatively innocuous toward enzyme function, the additional mutations at positions 104, 105 and 240 indicate a certain degree of robustness in TEM-1 (51), which tolerated multiple active-site mutations and still allowed recognition of related compounds. Such emergence of a new phenotypic trait (CTX resistance) by the introduction of a small number of mutations has been defined as enzyme plasticity (52). A recent compilation of several enzymatic systems displaying plasticity has shown that a few mutations (one to four) at the faces or perimeter of the active site (as in the present case) generally increase a promiscuous activity up to 1000-fold while reducing the native activity of the enzyme less than 5-fold (52). The mutants characterized herein displayed a native function (BZ hydrolysis) that was reduced up to 100-fold for k_{cat} and $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ relative to WT TEM-1. This observation is in agreement with the fact that mutations introduced by rational or semi-random methods (as in the present case) generally show an increase in the

magnitude of negative trade-offs relative to mutations selected from random mutagenesis studies (52). This can be rationalized by the fact that rational and semi-random methods normally target active-site residues in direct contact with substrate molecules while strictly random methods have no such positional bias and can yield beneficial mutations located far from the active site.

When evolving an enzyme toward a new function, negative trade-offs often compromise the original activity. Two possible routes are envisaged for this evolution process to take place, depending on the selection method applied. Starting from the native, “specialized” enzyme, selection for a new specialized promiscuous activity may yield either strong or weak negative trade-offs (Figure 3.3; underneath and above the coloured area, respectively).

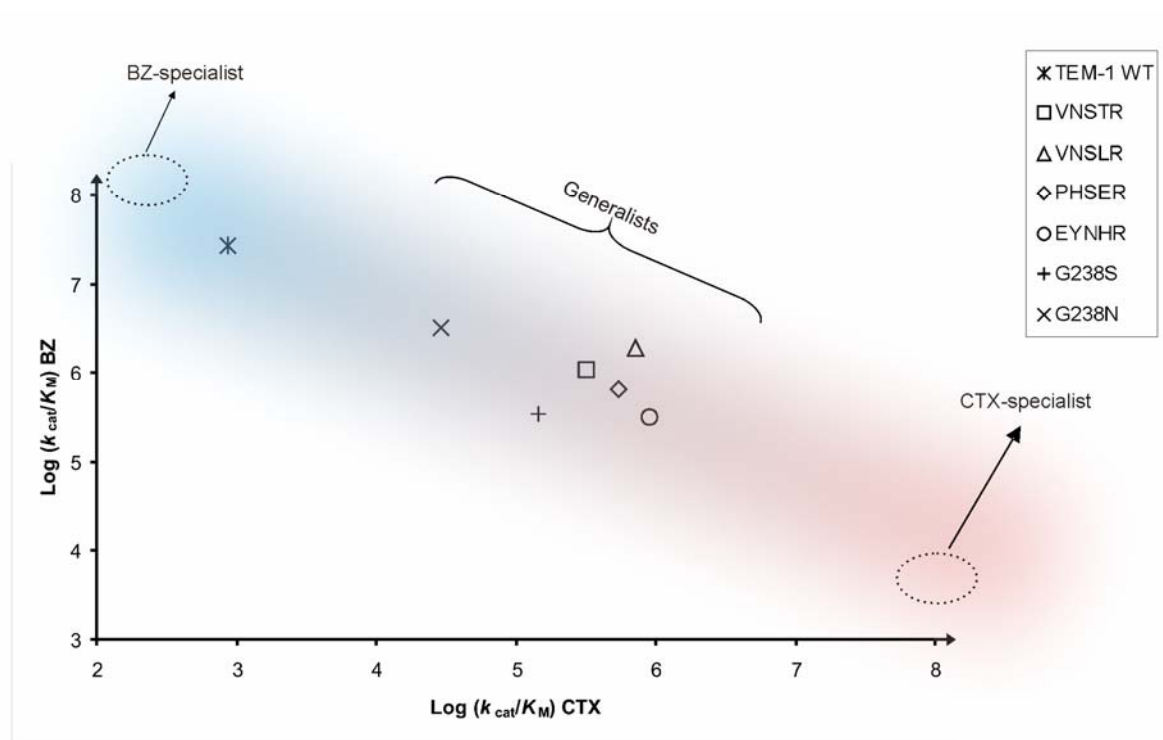


Figure 3.3 Comparison of catalytic efficiencies of wild-type TEM-1 β -lactamase with the mutants. Catalytic efficiencies are expressed as $\text{Log}(k_{cat}/K_M)$. The color gradient represents a hypothetical route starting from a specialized enzyme (BZ-specialist; blue) toward specialization for a new substrate (CTX-specialist; red). This shows the promiscuity of TEM-1. Generalized enzymes, such as mutants VNSTR, VNLSR, PHSER, EYNHR, G238S and G238N, are located in between. The wild-type TEM-1 enzyme is the most BZ-specialized, as evidenced by its high and low efficiencies toward BZ and CTX hydrolysis, respectively. The selected combinatorial mutants are generalized, although more efficient than G238N and G238S for hydrolysis of both substrates. EYNHR is the most CTX-specialized mutant. SWSSR is not represented because no kinetic assays with BZ have been performed on this mutant. Figure based on (52).

In most directed evolution experiments, the weak trade-off route is privileged and yields “generalized” enzymes, as intermediates between the two specialized enzymes, whereas strong trade-offs often arise in the cases of dual selections (52). Our combinatorial mutants, selected only for CTX hydrolysis, appear to follow the weak trade-off route, apparently stopping at the generalized stage, as evidenced by a comparison of mutant kinetic efficiencies with the specialized wild-type enzyme (Figure 3.3). Nonetheless, although they have evolved in the direction of improved CTX hydrolysis, further improvements could be possible, as indicated by other engineered β -lactamase mutants that show greater increases in CTX resistance relative to the native enzyme (44,53).

While the TEM-1 active-site cavity was considerably mutated relative to the wild-type enzyme, mutations apparently maintained the spatial integrity of functional groups important for binding and catalysis of cephalosporin substrates rather than selecting for one specific β -lactam compound (*e.g.* CTX). This “plasticity” character that allows enzymes to recognize a broad range of substrates on the basis of a restricted set of functional elements has been observed in many protein families (54) and confirms that the active sites of enzymes have been designed by evolution to work as cooperative entities that do not only rely on a restricted set of amino acids for catalysis (55).

The capacity of an active site to accommodate mutations is a function of the relation between the residues: by maintaining a degree of independence between key residues, introduction of a mutation will not necessarily be deleterious for enzymatic activity. Such weakly-linked residues can potentially lead to robust systems, which may serve as starting points for evolution of new enzymatic functions. According to Wagner (51), an enzyme that can perform its native function following multiple neutral amino acid substitutions should possess the necessary characteristics for emergence of a promiscuous activity. The reason for which the penicillin-hydrolysing activity of TEM-1 β -lactamase has dropped significantly could be that both the native and promiscuous activities are mutually exclusive, due to structural requirements for the specific recognition and hydrolysis of one

particular substrate over the other. In this work, mutant catalytic efficiency enhancements relative to mutant G238S were modest and appear to be the result of additive effects, as opposed to synergistic effects, of the additional mutations. If this is the case, then the residues targeted for mutagenesis behave independently. However, mutant EYNHR appears to display mutational synergy, illustrating that complex effects can prevail depending on the identity of the residues. Globally, we observed no evidence of mutational linkage between the two active-site faces we modified, despite some previous evidence to this effect (mutant E104M:G238S (15)), suggesting that these two areas of the active site are not highly interdependent. This may be an evolutionary strategy to limit loss of activity that would occur upon mutation of highly linked residues. Nonetheless, we observed some evidence that mutation of the neighbour residues 104 and 105 may be linked, setting a restriction to the robustness of the active site.

CONCLUSION

All the novel TEM-1 variants described herein displayed improved affinities toward all antibiotics investigated, relative to the wild-type enzyme. In addition, most variants displayed improved CTX and CZ binding relative to the point mutant G238S. In light of these results, it is clear that the active site of TEM-1 can sustain multiple substitutions to broaden its substrate spectrum and thus allow a better fit of the aminothiazole moiety, as hypothesized by Bush and coworkers (5). Substrate discrimination was enhanced and hydrolysis of penicillins was reduced in all mutants. Hence, our results support the hypothesis that active-site cavities can tolerate a relatively large number of mutations that confer a certain level of “evolvability” toward a set of related substrates. This evolvability is an indication of enzyme plasticity.

In conclusion, our *in vivo* and *in vitro* experiments led us to identify cooperative effects from the combination of mutations that appear to be mostly additive and independent, although some linkages (104/105) are suggested and synergy possible (EYNHR). Mutants selected for increased CTX hydrolysis maintained or improved their activity toward first-generation cephalosporins, compatible with functional diversification and adaptability by the enzyme. Mutation G238S accounts for most of the effects observed (especially regarding CTX) while the other substitutions contribute for modest enhancements.

FOOTNOTES

- ¹ The abbreviations used are: ESBL, extended-spectrum β -lactamase; AMP, ampicillin; BZ, benzylpenicillin; CF, cephalothin; CZ, cefazolin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; MIC, minimum inhibitory concentration; Chl, chloramphenicol; CV, column volume.

- ² The five-letter nomenclature identifies mutants according to amino acids found at positions 104, 105, 238, 240 and 244, respectively.

REFERENCES

1. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frère, J. M. (1998) *Biochem. J.* **330**(2), 581-598
2. Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., and Waley, S. G. (1991) *Biochem. J.* **276** (1), 269-270
3. Cantu, C., 3rd, and Palzkill, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(41), 26603-26609
4. Petit, A., Maveyraud, L., Lenfant, F., Samama, J. P., Labia, R., and Masson, J. M. (1995) *Biochem. J.* **305** (Pt 1), 33-40
5. Soweck, J. A., Singer, S. B., Ohringer, S., Malley, M. F., Dougherty, T. J., Gougoutas, J. Z., and Bush, K. (1991) *Biochemistry* **30**(13), 3179-3188
6. Bethel, C. R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Thomson, J. M., Rusczycky, M. W., Anderson, V. E., Pusztai-Carey, M., Taracila, M., Helfand, M. S., and Bonomo, R. A. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(12), 4124-4131
7. Fisher, J. F., Meroueh, S. O., and Mobashery, S. (2005) *Chem. Rev.* **105**(2), 395-424
8. Nukaga, M., Mayama, K., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., and Knox, J. R. (2003) *J. Mol. Biol.* **328**(1), 289-301
9. Orenca, M. C., Yoon, J. S., Ness, J. E., Stemmer, W. P., and Stevens, R. C. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**(3), 238-242
10. Huletsky, A., Knox, J. R., and Levesque, R. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**(5), 3690-3697
11. Venkatachalam, K. V., Huang, W., LaRocco, M., and Palzkill, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**(38), 23444-23450
12. Knox, J. R. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**(12), 2593-2601
13. Ambler, R. (1980) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**(1036), 321-331
14. Huang, W. Z., Petrosino, J., Hirsch, M., Shenkin, P. S., and Palzkill, T. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**(4), 688-703

15. Viadiu, H., Osuna, J., Fink, A. L., and Soberón, X. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**(2), 781-787
16. Palzkill, T., and Botstein, D. (1992) *J. Bacteriol.* **174**(16), 5237-5243
17. Imtiaz, U., Manavathu, E. K., Mobashery, S., and Lerner, S. A. (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**(5), 1134-1139
18. Raquet, X., Lamotte-Brasseur, J., Fonze, E., Goussard, S., Courvalin, P., and Frère, J. M. (1994) *J. Mol. Biol.* **244**(5), 625-639
19. Mildvan, A. S. (2004) *Biochemistry* **43**(46), 14517-14520
20. Doucet, N., De Wals, P.-Y., and Pelletier, J. N. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**(44), 46295-46303
21. Zafaralla, G., Manavathu, E. K., Lerner, S. A., and Mobashery, S. (1992) *Biochemistry* **31**(15), 3847-3852
22. Chica, R. A., Doucet, N., and Pelletier, J. N. (2005) *Curr Opin Biotechnol* **16**(4), 378-384
23. Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D., and Vogel, A. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**(27), 4192-4196
24. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* **77**(1), 51-59
25. Sarkar, G., and Sommer, S. S. (1990) *Biotechniques* **8**(4), 404-407
26. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
27. Cantu, C., 3rd, Huang, W., and Palzkill, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**(37), 22538-22545
28. Bouthors, A. T., Dagoneau-Blanchard, N., Naas, T., Nordmann, P., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (1998) *Biochem. J.* **330** (Pt 3), 1443-1449
29. Tribuddharat, C., Moore, R. A., Baker, P., and Woods, D. E. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(7), 2082-2087

30. Reynaud, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., and Labia, R. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* **65**(2), 185-192
31. Chan, P. T. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**(14), 5940
32. Bush, K., and Mobashery, S. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.* **456**, 71-98
33. Page, M. I. (1987) The mechanisms of reactions of β -lactam antibiotics. In. *Advances in physical organic chemistry*, Academic Press Inc., London
34. Medeiros, A. A. (1997) *Clin. Infect. Dis.* **24**(Suppl 1), S 19-S 45
35. Saves, I., Bulet-Schiltz, O., Maveyraud, L., Samama, J. P., Prome, J. C., and Masson, J. M. (1995) *Biochemistry* **34**(37), 11660-11667
36. Tranier, S., Bouthors, A. T., Maveyraud, L., Guillet, V., Sougakoff, W., and Samama, J. P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**(36), 28075-28082
37. Barthélémy, M., Péduzzi, J., Ben Yaghlane, H., and Labia, R. (1988) *FEBS Lett.* **231**(1), 217-220
38. Labia, R., Morand, A., Tiwari, K., Sirot, J., Sirot, D., and Petit, A. (1988) *Rev. Infect. Dis.* **10**(4), 885-891
39. Lenfant, F., Labia, R., and Masson, J. M. (1990) *Biochimie* **72**(6-7), 495-503
40. Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J. M., and Samama, J. P. (1993) *Proteins* **16**(4), 364-383
41. Shimamura, T., Ibuka, A., Fushinobu, S., Wakagi, T., Ishiguro, M., Ishii, Y., and Matsuzawa, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(48), 46601-46608
42. Mabilat, C., and Courvalin, P. (1990) *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**(11), 2210-2216
43. Wang, F., Cassidy, C., and Sacchettini, J. C. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(8), 2762-2771
44. Zaccolo, M., and Gherardi, E. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**(2), 775-783
45. Lenfant, F., Petit, A., Labia, R., Maveyraud, L., Samama, J. P., and Masson, J. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217**(3), 939-946

46. Cantu, C., 3rd, Huang, W., and Palzkill, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**(46), 29144-29150
47. Bush, K., and Singer, S. B. (1989) *Infection* **17**(6), 429-433
48. Hujer, A. M., Hujer, K. M., Helfand, M. S., Anderson, V. E., and Bonomo, R. A. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**(12), 3971-3977
49. Bouthors, A. T., Delettre, J., Mugnier, P., Jarlier, V., and Sougakoff, W. (1999) *Protein Eng.* **12**(4), 313-318
50. Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Mc, Q. G. S., Roodveldt, C., and Tawfik, D. S. (2005) *Nat. Genet.* **37**(1), 73-76
51. Wagner, A. (2005) *FEBS Lett.* **579**(8), 1772-1778
52. Khersonsky, O., Roodveldt, C., and Tawfik, D. S. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**(5), 498-508
53. Stemmer, W. P. (1994) *Nature* **370**(6488), 389-391
54. Todd, A. E., Orenge, C. A., and Thornton, J. M. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**(8), 419-426
55. Peracchi, A. (2001) *Trends. Biochem. Sci.* **26**(8), 497-503

Chapitre 4

Section 4.1 - Conclusion

Le but initial de cette recherche était d'investiguer une série de mutants de la β -lactamase TEM-1 dont la caractérisation pourrait nous fournir une meilleure compréhension du mécanisme de l'enzyme au niveau moléculaire, ainsi que du phénomène d'apparition des phénotypes d'ESBLs. Dans un premier temps, la substitution unique de Tyr-105 a mené à l'obtention d'une librairie de 20 variantes de l'enzyme qui ont été criblées pour leur activité envers une variété de substrats β -lactames. Suivant ce projet de mutagenèse dirigée, nous avons entrepris d'élargir notre perspective sur le site actif de l'enzyme en procédant à la substitution de cinq résidus dont les chaînes latérales sont situées dans l'environnement immédiat du substrat. Cette mutagenèse combinatoire, plus complexe que la précédente, génère une impressionnante diversité de mutants. Contrairement au premier projet, toutes les combinaisons de mutations n'ont pu être testées et seulement quelques uns des mutants les plus résistants furent caractérisés plus en profondeur. Tandis que le premier projet se concentre sur les effets directs de la mutation unique du résidu Tyr-105, le second y combine plusieurs résidus, Glu-104, Gly-238, Glu-240 et Arg-244, afin de mieux cerner le phénomène de résistance observés chez les ESBLs, sans toutefois fournir une explication claire et précise du rôle de chacun des résidus mutés étant donné le contexte combinatoire qui complexifie l'analyse des résultats.

Premièrement, nous avons entrepris la mutagenèse par saturation à la position 105 de la β -lactamase TEM-1, suivie d'une caractérisation des mutants par cinétique enzymatique et par des études de dynamique moléculaire. Les résultats de cinétique enzymatique indiquant que l'affinité des mutants envers les substrats antibiotiques est plus affectée que leur taux d'hydrolyse révèlent que ce résidu serait impliqué dans la sélectivité du substrat, ainsi que sa stabilisation dans le site actif. La stabilisation du substrat provient

du fait que la position 105 favorise les acides aminés qui adoptent une configuration planaire et dont le positionnement de la chaîne latérale ne cause pas de gêne stérique avec le substrat dans le site actif. Cette caractéristique des acides aminés aromatiques (ainsi que de l'asparagine, tel que démontré en dynamique moléculaire) permet la formation d'un « mur stabilisateur » formant des contacts favorables avec le ligand dans la cavité du site actif. Ces contacts ne seraient pas observés avec des résidus dont les chaînes latérales seraient plus flexibles et donc incapables de former une telle structure stabilisatrice. Par contre, Ala et Gly, respectivement les deux acides aminés les moins volumineux introduits en 105 permettent une certaine discrimination du substrat en favorisant l'hydrolyse des pénicillines au-delà de celle des céphalosporines. En bref, le résidu en position 105 peut, selon sa nature, participer à une distinction des substrats ou encore stabiliser celui-ci par la formation de contacts qui restreignent son mouvement dans le site actif.

Après avoir sondé les effets résultant de la mutation d'un seul résidu du site actif de l'enzyme TEM-1, nous avons tenté d'obtenir une vue plus globale des interactions qui régissent la reconnaissance du substrat, sa stabilisation, ainsi que son hydrolyse par les enzymes mutantes. Cinq acides aminés potentiellement impliqués dans la reconnaissance, la stabilisation du substrat et/ou dans la catalyse et situés à proximité du ligand, ont été désignés pour la mutagenèse par saturation. Contrairement au projet précédent, où seulement 20 mutants pouvaient être caractérisés, le nombre de différentes combinaisons dans ce cas-ci dépasse largement les limites expérimentales que nous offre un criblage standard. Ainsi, nous nous sommes concentrés sur les mutants démontrant un avantage de survie par rapport à la souche exprimant l'enzyme native (acquisition d'une nouvelle résistance absente chez le type sauvage). Cinq mutants portant différentes substitutions aux positions ciblées ont été désignés afin d'être caractérisés. Une tendance se profile à l'analyse des résultats de résistance *in vivo* des mutants : tous, sans exception, présentent une amélioration de leur CMI du CTX envers lequel les mutants étaient sélectionnés, ainsi qu'une baisse de leur niveau de résistance envers les pénicillines. D'une manière générale, en comparant les données à celles du type sauvage, tous les mutants démontrent une

amélioration de leur affinité envers tous les substrats testés (pénicillines et céphalosporines de première et troisième génération), même ceux pour lesquels ils étaient plus sensibles lors des tests de survie. Le taux d'hydrolyse amélioré par rapport à l'enzyme native seulement dans le cas du CTX, est une indication que les mutants ont évolué vers un objectif commun : la capacité d'hydrolyser le CTX. Il est aussi nécessaire de noter que les mutants subissent une légère amélioration de leur efficacité catalytique pour les céphalosporines de première génération et une diminution pour les pénicillines. Ceci nous indique que les mutants ont développé une activité contre CTX, sans contrevenir à leur activité envers CF et CZ, mais que cette acquisition se fait aux dépens de l'hydrolyse de la BZ.

La complexification des résultats par l'introduction simultanée de plusieurs mutations sur le même gène requiert idéalement une analyse détaillée de la contribution individuelle de chaque substitution d'acides aminés. Une telle analyse approfondie nécessite de pouvoir isoler chaque mutation indépendamment des autres, afin d'en évaluer la portée. La vaste diversité de mutants de la β -lactamase TEM-1 répertoriée dans la littérature nous permet de comparer certains de nos mutants à d'autres s'y rapprochant au niveau de leur structure primaire et ayant déjà été caractérisés préalablement.

L'introduction de plusieurs mutations simultanées au site actif de la β -lactamase TEM-1 démontre que celui-ci est relativement tolérant à la substitution de certains de ses résidus, dans la mesure où ceux-ci ne sont pas directement impliqués dans la catalyse (robustesse). Dans un contexte de mutagenèse ponctuelle, comme ce fut le cas pour Tyr-105, on observe que certains mutants semblent avoir perdu toute activité envers les substrats testés, tel que démontré par les tests de CMI. Une mutation simple peut donc être délétère pour l'enzyme, non seulement envers son activité, mais aussi pour sa stabilité. Par contre, lors d'une mutagenèse combinatoire où plusieurs acides aminés sont substitués simultanément, il est possible qu'une seconde mutation permette une récupération de l'activité perdue par la première. Il s'agit alors d'un effet compensatoire. Les différentes possibilités d'effets combinatoires (additivité, antagonisme, synergie) résultent du niveau

d'interdépendance des résidus impliqués. L'amplitude de ces effets dépend donc de la présence ou non d'interactions entre les résidus, ainsi que de leur nature. Par contre, le contexte combinatoire et l'absence de la caractérisation individuelle de chacune des substitutions composant les mutants combinatoires nous empêchent d'identifier avec certitude le caractère et l'étendue de cette coopérativité entre les résidus mutés. Nous semblons toutefois observer principalement des effets additifs, tandis qu'une synergie n'est pas exclue entre les deux substitutions du mutant EYNHR envers le CTX. Par ailleurs, bien que les deux parois du site actif définies par les résidus mutés puissent agir indépendamment, il semble y avoir une certaine interdépendance entre les résidus Glu-104 et Tyr-105.

Finalement, nous avons défini, du moins partiellement, le rôle du résidu en position 105 de la β -lactamase TEM-1 dans la discrimination du substrat et sa stabilisation. De plus, en mutant plusieurs résidus du site actif simultanément nous avons pu confirmer certaines observations réalisées précédemment dans la littérature concernant les acides aminés ciblés dans notre analyse. Ainsi, les positions 104 et 240 sont peu restrictives quant à l'identité de la chaîne latérale introduite et pourraient faciliter la liaison d'un substrat volumineux en concomitance avec un agrandissement de la cavité du site actif causé par la substitution du résidu Gly-238. En outre, l'environnement créé au site actif de l'enzyme semblait être en discordance avec la mutation du résidu Arg-244 qui est resté inchangé dans tous les cas, soulignant son importance dans le processus catalytique, probablement lors de la reconnaissance initiale du substrat [16]. Globalement, la mutagenèse combinatoire aura permis de générer des mutants ayant acquis une nouvelle spécificité de substrat, sans pour autant altérer entièrement leur profil d'activité initial, et ce, grâce aux effets compensatoires des mutations additionnelles. Ceci est une indication de la robustesse et de la plasticité du site actif de la β -lactamase TEM-1.

Bien que les analyses fonctionnelles des divers mutants aient permis d'établir certaines hypothèses quant au rôle des résidus ciblés, des éléments de réponse additionnels

pourraient être fournis en définissant la contribution structurelle des différentes mutations. Par la résolution de la structure tridimensionnelle de certains mutants d'intérêt par diffraction aux rayons X, le positionnement des chaînes latérales permettrait d'observer la formation ou la délétion d'interactions au sein du site actif pouvant expliquer les variations entre les comportements cinétiques des différents mutants. Une caractérisation supplémentaire des mutants par résonance magnétique nucléaire apporterait des indices quant à la présence d'effets dynamiques chez les mutants qui pourraient être corrélés à leur comportement cinétique [67]. Il n'est pas non plus exclu d'entreprendre des études de modélisation moléculaire sur ces mutants, afin de définir les contributions dynamiques et structurelles des mutations introduites.

Le milieu hospitalier est présentement aux prises avec un grave problème d'émergence de souches exprimant diverses ESBLs. Encore de nos jours, près d'un quart des décès au niveau mondial sont causés par les infections bactériennes, tuant près de 13 millions d'individus en 1998 [69]. L'ouverture des frontières au marché et au tourisme international, ainsi que l'adhésion de pays, anciennement considérés comme sous-développés, à des traités commerciaux avec d'autres nations, favorisent l'accélération de la dissémination des souches résistantes qui ne connaissent plus de limites territoriales. Des mesures doivent être instaurées afin de circonscrire cette problématique qui ne semble démontrer aucun signe d'essoufflement. Bien que plusieurs institutions aient déjà mis en place des contrôles routiniers de détection des ESBLs, de telles pratiques préventives ne sont pas encore appliquées à grande échelle et bien souvent, ces tests ne sont pas assez fiables [70]. Des organismes gouvernementaux, tels les *Centers for Disease Control and Prevention* et le *Clinical Laboratory Standards Institute* américains ont émis des directives permettant une meilleure identification des souches résistantes. D'une manière générale des tests de microdilutions ou de diffusion de disques combinant plusieurs antibiotiques devraient devenir la norme pour cribler les souches résistantes. Afin de confirmer ces tests, des trousseaux commerciaux ont été développés, renforçant ainsi l'arsenal ciblant les souches bactériennes résistantes [71,72].

Le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques ne prendra pas fin tant que les règnes bactérien et animal poursuivront cette lutte interminable pour leur survie respective. D'un côté les micro-organismes continueront de développer divers mécanismes de résistance afin d'échapper à notre chimiothérapie et de l'autre, les humains continueront de synthétiser de nouvelles molécules avec l'espoir de découvrir, un jour, l'antibiotique miracle contre lequel l'adaptation et la résistance des micro-organismes seront vaines. D'ici là, les chercheurs peuvent se rabattre sur l'amélioration des antibiotiques présentement utilisés en modifiant leur structure par l'ajout de certains groupements fonctionnels, afin d'améliorer, par exemple, leur pénétration à l'intérieur de la cellule [10]. Il faut tout de même reconnaître que le XX^{ième} siècle fut celui de la lutte aux infections virales et bactériennes. Les campagnes de vaccination ont permis d'éradiquer la variole et de limiter la progression du virus de la polio, mais aucune donnée ne laisse entrevoir la fin des infections bactériennes. Nous savons déjà qu'au début du XX^{ième} siècle, la pneumonie, la tuberculose et les maladies diarrhéiques causaient 30% des décès aux États-Unis [69]. Moins d'un siècle plus tard, ces mêmes infections étaient remplacées par des maladies telles le cancer et les problèmes cardiovasculaires, et ce, surtout dans les pays développés ayant relégué les maladies infectieuses au bas de la liste. Nous sommes donc face à un dilemme : maintenir le cap dans la quête de la molécule miraculeuse ou tenter de trouver une solution alternative au problème. Avant d'espérer quelque miracle que ce soit de la part de la nature, les humains devraient prendre conscience que malgré la simplicité apparente des organismes procaryotes, ceux-ci existent depuis 3,5 milliards d'années, tandis que les humains ne foulent le sol de la Terre que depuis environ 250 000 ans.

Les données expérimentales et les faits rapportés tout au long de ce document démontrent bien à quel point la situation concernant la résistance bactérienne dans son ensemble est loin de connaître le déclin tant attendu depuis un demi-siècle. L'éducation ainsi que les changements des valeurs sociétales ont effectivement prouvé leur efficacité

dans la réduction de la transmission des infections bactériennes. Finalement, une meilleure gestion de l'administration des médicaments ne peut qu'améliorer la situation actuelle.

Bibliographie

- 1 Moellering, R. C., Jr. (1995) Past, present, and future of antimicrobial agents. *Am. J. Med.* **99**, 11S-18S
- 2 Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* *Brit. J. Exp. Path.* **10**, 226-236
- 3 Abraham, E. P. & Chain, E. (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**, 837
- 4 Medeiros, A. A. (1997) Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of β -Lactam Antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24**, S 19-S 45
- 5 Page, M. I. (1987) The mechanisms of reactions of β -lactam antibiotics. *Advances in physical organic chemistry* **23**, 165-270
- 6 Tenover, F. C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* **119**, S3-10; discussion S62-70
- 7 Wright, G. D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **57**, 1451-1470
- 8 Sawai, T., Yamaguchi, A. & Hiruma, R. (1988) Effect of interaction between outer membrane permeability and β -lactamase production on resistance to β -lactam agents in gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 761-764
- 9 Nikaido, H. (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1831-1836
- 10 Nikaido, H., Rosenberg, E. Y. & Foulds, J. (1983) Porin channels in *Escherichia coli*: studies with β -lactams in intact cells. *J. Bacteriol.* **153**, 232-240
- 11 Fisher, J. F., Meroueh, S. O. & Mobashery, S. (2005) Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* **105**, 395-424

- 12 Nikaido, H. (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 5853-5859
- 13 Massova, I. & Mobashery, S. (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1-17
- 14 Meroueh, S. O., Minasov, G., Lee, W., Shoichet, B. K. & Mobashery, S. (2003) Structural aspects for evolution of β -lactamases from penicillin-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9612-9618
- 15 Leclercq, R. (1997) Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **24 Suppl 1**, S80-S84
- 16 Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J. & Frère, J. M. (1998) Catalytic properties of class A β -lactamases: Efficiency and diversity. *Biochem. J.* **330**, 581-598
- 17 Sougakoff, W., Petit, A., Goussard, S., Sirot, D., Bure, A. & Courvalin, P. (1989) Characterization of the plasmid genes blaT-4 and blaT-5 which encode the broad-spectrum β -lactamases TEM-4 and TEM-5 in enterobacteriaceae. *Gene* **78**, 339-348
- 18 Hall, A. & Knowles, J. R. (1976) Directed selective pressure on a β -lactamase to analyse molecular changes involved in development of enzyme function. *Nature* **264**, 803-804
- 19 Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. & Mitsuhashi, S. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**, 315-317
- 20 Philippon, A., Labia, R. & Jacoby, G. (1989) Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1131-1136
- 21 Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R. & Cluzel, R. (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**, 323-334

- 22 Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M. & Frère, J. M. (1999) The β -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 1-19
- 23 Page, M. I. (1999) The reactivity of β -lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of β -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* **5**, 895-913
- 24 Tipper, D. J. & Strominger, J. L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**, 1133-1141
- 25 Bush, K. & Mobashery, S. (1998) How β -lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention. *Adv. Exp. Med. Biol.* **456**, 71-98
- 26 Knowles, J. R. (1985) Penicillin resistance: the chemistry of β -lactamase inhibition. *Acc. Chem. Res.* **18**, 97-104
- 27 Ambler, R. (1980) The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**, 321-331
- 28 Matagne, A., Misselyn-Bauduin, A. M., Joris, B., Erpicum, T., Granier, B. & Frère, J. M. (1990) The diversity of the catalytic properties of class A β -lactamases. *Biochem. J.* **265**, 131-146
- 29 Hardy, L. W. & Kirsch, J. F. (1984) Diffusion-limited component of reactions catalyzed by *Bacillus cereus* beta-lactamase I. *Biochemistry* **23**, 1275-1282
- 30 Datta, N. & Kontomichalou, P. (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* **208**, 239-241
- 31 Du Bois, S. K., Marriott, M. S. & Amyes, S. G. (1995) TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**, 7-22
- 32 Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J. M. & Samama, J. P. (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* **16**, 364-383

- 33 Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G. & Waley, S. G. (1991) A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* **276** (1), 269-270
- 34 Meroueh, S. O., Fisher, J. F., Schlegel, H. B. & Mobashery, S. (2005) Ab initio QM/MM study of class A β -lactamase acylation: dual participation of Glu166 and Lys73 in a concerted base promotion of Ser70. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15397-15407
- 35 Matagne, A. & Frère, J. M. (1995) Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: The case of class A β -lactamases. *Biochim. Biophys. Acta* **1246**, 109-127
- 36 Knox, J. R. (1995) Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases. Mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2593-2601
- 37 Lenfant, F., Labia, R. & Masson, J. M. (1991) Replacement of lysine 234 affects transition state stabilization in the active site of β -lactamase TEM-1. *J. Biol. Chem.* **266**, 17187-17194
- 38 Imtiaz, U., Manavathu, E. K., Lerner, S. A. & Mobashery, S. (1993) Critical hydrogen bonding by serine 235 for cephalosporinase activity of TEM-1 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2438-2442
- 39 Fonzé, E., Charlier, P., To'th, Y., Vermeire, M., Raquet, X., Dubus, A. & Frère, J. M. (1995) TEM-1 beta-lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **51**, 682-694
- 40 Nukaga, M., Mayama, K., Hujer, A. M., Bonomo, R. A. & Knox, J. R. (2003) Ultrahigh resolution structure of a class A β -lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *J. Mol. Biol.* **328**, 289-301
- 41 Shimamura, T., Ibuka, A., Fushinobu, S., Wakagi, T., Ishiguro, M., Ishii, Y. & Matsuzawa, H. (2002) Acyl-intermediate structures of the extended-spectrum class

- A β -lactamase, TOHO-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin. *J. Biol. Chem.* **277**, 46601-46608
- 42 Strynadka, N. C., Adachi, H., Jensen, S. E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K. & James, M. N. (1992) Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* **359**, 700-705
- 43 Tranier, S., Bouthors, A. T., Maveyraud, L., Guillet, V., Sougakoff, W. & Samama, J. P. (2000) The high resolution crystal structure for class A β -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 28075-28082
- 44 Chen, Y., Delmas, J., Sirot, J., Shoichet, B. & Bonnet, R. (2005) Atomic resolution structures of CTX-M β -lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J. Mol. Biol.* **348**, 349-362
- 45 Moews, P. C., Knox, J. R., Dideberg, O., Charlier, P. & Frère, J. M. (1990) β -lactamase of *Bacillus licheniformis* 749/C at 2 Å resolution. *Proteins* **7**, 156-171
- 46 Orenica, M. C., Yoon, J. S., Ness, J. E., Stemmer, W. P. & Stevens, R. C. (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 238-242
- 47 Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L. & Kantrowitz, E. R. (2005) Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **61**, 1072-1079
- 48 Wang, X., Minasov, G. & Shoichet, B. K. (2002) The structural bases of antibiotic resistance in the clinically derived mutant β -lactamases TEM-30, TEM-32, and TEM-34. *J. Biol. Chem.* **277**, 32149-32156
- 49 Chen, C. C., Rahil, J., Pratt, R. F. & Herzberg, O. (1993) Structure of a phosphonate-inhibited β -lactamase. An analog of the tetrahedral transition state/intermediate of β -lactam hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **234**, 165-178

- 50 Kuzin, A. P., Nukaga, M., Nukaga, Y., Hujer, A. M., Bonomo, R. A. & Knox, J. R. (1999) Structure of the SHV-1 β -lactamase. *Biochemistry* **38**, 5720-5727
- 51 Maveyraud, L., Mourey, L., Kotra, L. P., Pedelacq, J. D., Guillet, V., Mobashery, S. & Samama, J. P. (1998) Structural basis for clinical longevity of carbapenem antibiotics in the face of challenge by the common class A β -lactamases from the antibiotic-resistant bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9748-9752
- 52 Ness, S., Martin, R., Kindler, A. M., Paetzel, M., Gold, M., Jensen, S. E., Jones, J. B. & Strynadka, N. C. (2000) Structure-based design guides the improved efficacy of deacylation transition state analogue inhibitors of TEM-1 β -Lactamase. *Biochemistry* **39**, 5312-5321
- 53 Wang, X., Minasov, G., Blázquez, J., Caselli, E., Prati, F. & Shoichet, B. K. (2003) Recognition and resistance in TEM β -lactamase. *Biochemistry* **42**, 8434-8444
- 54 Wang, X., Minasov, G. & Shoichet, B. K. (2002) Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. *J. Mol. Biol.* **320**, 85-95
- 55 Minasov, G., Wang, X. J. & Shoichet, B. K. (2002) An ultrahigh resolution structure of TEM-1 β -lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5333-5340
- 56 Adachi, H., Ohta, T. & Matsuzawa, H. (1991) Site-directed mutants, at position 166, of RTEM-1 β -lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J. Biol. Chem.* **266**, 3186-3191
- 57 Damblon, C., Raquet, X., Lian, L. Y., Lamotte-Brasseur, J., Fonzé, E., Charlier, P., Roberts, G. C. & Frère, J. M. (1996) The catalytic mechanism of β -lactamases: NMR titration of an active-site lysine residue of the TEM-1 enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1747-1752
- 58 Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J. M. & Ghuysen, J. M. (1991) Mechanism of acyl transfer by the class-A serine β -lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem. J.* **279**, 213-221

- 59 Lietz, E. J., Truher, H., Kahn, D., Hokenson, M. J. & Fink, A. L. (2000) Lysine-73 is involved in the acylation and deacylation of β -lactamase. *Biochemistry* **39**, 4971-4981
- 60 Swarén, P., Maveyraud, L., Guillet, V., Masson, J. M., Mourey, L. & Samama, J. P. (1995) Electrostatic analysis of TEM-1 β -lactamase: Effect of substrate binding, steep potential gradients and consequences of site-directed mutations. *Structure* **3**, 603-613
- 61 Mildvan, A. S. (2004) Inverse thinking about double mutants of enzymes. *Biochemistry* **43**, 14517-14520
- 62 Wells, J. A. (1990) Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry* **29**, 8509-8517
- 63 Chica, R. A., Doucet, N. & Pelletier, J. N. (2005) Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 378-384
- 64 Voet, D. & Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Toronto
- 65 Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L. & Mobashery, S. (2006) Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4404-4409
- 66 DeLano, W. L. (2006) *The PyMol Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA
- 67 Doucet, N., Savard, P.-Y., Pelletier, J. N. & Gagné, S. (2006) NMR investigation of Tyr-105 mutant in TEM-1 β -lactamase: Dynamics are correlated with function. *J. Biol. Chem.*, Sous presse
- 68 Doucet, N., De Wals, P.-Y. & Pelletier, J. N. (2004) Site-saturation mutagenesis of Tyr-105 reveals its importance in substrate stabilization and discrimination in TEM-1 β -lactamase. *J. Biol. Chem.* **279**, 46295-46303
- 69 Cohen, M. L. (2000) Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**, 762-767

- 70 Pfaller, M. A. & Segreti, J. (2006) Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Infect. Dis.* **42 Suppl 4**, S153-163
- 71 Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657-686
- 72 Samaha-Kfoury, J. N. & Araj, G. F. (2003) Recent developments in beta lactamases and extended spectrum β -lactamases. *B. M. J.* **327**, 1209-1213
- 73 Henderson, P. J. F. (1992) *Enzyme Assays - A Practical Approach*. Oxford University Press, Toronto

Annexe 1

Isolats naturels de β -lactamases TEM à large spectre d'action et résistants aux inhibiteurs

Le tableau suivant provient de <http://lahey.org/studies/temtable.asp> (dernière consultation avril 2007)

Références

1. Datta, N., and P. Kontomichalou. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* (London) **208**:239-241.
2. Sutcliffe, J.G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3737-3741.
3. Matthew, M., and R.W. Hedges. 1976. Analytical isoelectric focusing of R factor determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* **125**:713-718.
4. Ambler, R.P., and G.K. Scott. 1978. Partial amino acid sequence of penicillinase coded by *Escherichia coli* plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3732-3736.
5. Sirot, D., J. Sirot, R. Labia, A. Morand, P. Courvalin, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux, and R. Cluzel. 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:323-334.
6. Sougakoff, W., S. Goussard, and P. Courvalin. 1988. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**:343-348.
7. Courvalin, P. 1997. Personal communication. TEM-14 has been entirely sequenced and is indistinguishable from TEM-3.
8. Paul, G.C., G. Gerbaud, A. Bure, A.M. Philippon, B. Pangon, and P. Courvalin. 1989. TEM-4, a new plasmid-mediated β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1958-1963.
9. Sougakoff, W., A. Petit, S. Goussard, D. Sirot, A. Bure, and P. Courvalin. 1989. Characterization of the plasmid genes *blaT-4* and *blaT-5* which encode the broad-spectrum β -lactamases TEM-4 and TEM-5 in Enterobacteriaceae. *Gene* **78**:339-348.

10. Petit, A., D.L. Sirot, C.M. Chanal, J.L. Sirot, R. Labia, G. Gerbaud, and R.A. Cluzel. 1988. Novel plasmid-mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:626-630.
11. Bauernfeind, A., and G. Hörl. 1987. Novel R-factor borne β -lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins. *Infection* **15**:257-259.
12. Mabilat, C., and P. Courvalin. 1990. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2210-2216.
13. Gutmann, L., M.D. Kitzis, D. Billot-Klein, F. Goldstein, G. Tran Van Nhieu, T. Lu, J. Carlet, E. Collatz, and R. Williamson. 1988. Plasmid-mediated β -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. *Rev. Infect. Dis.* **10**:860-866.
14. Collatz, E., G. Tran Van Nhieu, D. Billot-Klein, R. Williamson, and L. Gutmann. 1989. Substitution of serine for arginine in position 162 of TEM-type β -lactamases extends the substrate profile of mutant enzymes, TEM-7 and TEM-101, to ceftazidime and aztreonam. *Gene* **78**:349-354.
15. Chanal, C.M., D.L. Sirot, A. Petit, R. Labia, A. Morand, J.L. Sirot, and R.A. Cluzel. 1989. Multiplicity of TEM-derived β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1915-1920.
16. Chanal, C., M-C. Poupert, D. Sirot, R. Labia, J. Sirot, and R. Cluzel. 1992. Nucleotide sequences of CAZ-2, CAZ-6, and CAZ-7 β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1817-1820.
17. Spencer, R.C., P.F. Wheat, T.G. Winstanley, D.M. Cox, and S.J. Plested. 1987. Novel β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* conferring unusual resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:919-921.

18. Quinn, J.P., D. Miyashiro, D. Sahm, R. Flamm, and K. Bush. 1989. Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1451-1456.
19. Rice L.B., S.H. Marshall, L.L. Carias, L. Sutton L, and G.A. Jacoby. 1993. Sequences of MGH-1, YOU-1, YOU-2 extended spectrum β -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:2760-2761.
20. Vuye, A., G. Verschraegen, and G. Claeys. 1989. Plasmid-mediated β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* resistant to ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:757-761.
21. Goussard, S. and P. Courvalin. 1999. Updated sequence information for TEM β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:367-370.
22. Webber, D.A., C.C. Sanders, J.S. Bakken, and J.P. Quinn. 1990. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **162**:460-465.
23. Chanal, C., D. Sirot, H. Malaure, M.-C. Poupard, and J. Sirot. 1994. Sequences of CAZ-3 and CTX-2 extended-spectrum β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2452-2453.
24. Courvalin, P. 1997. Personal communication: TEM-17 was originally defined by oligotyping and when its amino acid sequence was determined, it turned out to be identical to TEM-15. However, an enzyme with the sequence defined as TEM-17 has subsequently been discovered. See reference 56.
25. Courvalin P. 1997. Personal communication: The gene for the original TEM-19 has been only partially sequenced but shows a G at 238 rather than the S proposed by oligotyping. The sequence of TEM-19 has been retained, however, since an ESBL with G238S has subsequently been discovered (Jacoby, G.A., P. Han, M. Alvarez, F. Tenover, Survey of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) production in US

- clinical isolates. *Program Abstr. 35th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* abstr. C40.)
26. Ben Redjeb, S., G. Fournier, C. Mabilat, A. Ben Hassen, and A. Philippon. 1990. Two novel transferable extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**:33-38.
 27. Arlet, G., G. Bami, D. Décrè, A. Flippo, O. Gaillot, P.H. Lagrange, and A. Philippon. 1995. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**:203-208.
 28. Arlet, G., M. Rouveau, G. Fournier, P.H. Lagrange, and A. Philippon. 1993. Novel, plasmid-encoded, TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* conferring higher resistance to aztreonam than to extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2020-2023.
 29. Arlet, G., S. Goussard, P. Courvalin, and A. Philippon. 1999. Sequences of the genes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:969-971.
 30. Poupart, M.-C., C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, and J. Sirot. 1991. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1498-1500.
 31. Naumovski, L., J.P. Quinn, D. Miyashiro, M. Patel, K. Bush, S.B. Singer, D. Graves, T. Palzkill, and A.M. Arvin. 1992. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1991-1996.
 32. Morosini, M.I., R. Canton, J. Martinez-Beltran, J.C. Negri, J.C. Perez-Diaz, F. Baquero, and J. Blazquez. 1995. New extended-spectrum TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica subsp. enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:458-461.

33. Bradford, P.A., N.V. Jacobus, N. Bhachech, and K. Bush. 1996. TEM-28 from an *Escherichia coli* clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:260-262.
34. Vedel, G., A. Belaouaj, L. Gilly, R. Labia, A. Philippon, P. Nénot, and G. Paul. 1992. Clinical isolates of *Escherichia coli* producing TRI β -lactamases: novel TEM-enzymes conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**:449-462.
35. Belaouaj, A., C. Lapoumeroulie, M.M. Canica, G. Vedel, P. Nénot, R. Krishnamoorthy, and G. Paul. 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol. Lett.* **120**:75-80.
36. Henquell, C., C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, and J. Sirot. 1995. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:427-430.
37. Zhou, X.Y., Bordon F., D. Sirot, M.-D. Kitzis, and L. Gutmann. 1994. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1085-1089.
38. Stapleton, P., P.-J. Wu, A. King, K. Shannon, G. French, and I. Phillips. 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2478-2483.
39. Mugnier, P., P. Dubrous, I. Casin, G. Arlet, and E. Collatz. 1996. A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 2488-93.
40. Yang, Y., N. Bhachech, P.A. Bradford, B.D. Jett, D.F. Sahm, and K. Bush. 1998. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates

- producing TEM-10 and TEM-43 β -lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1671-1676.
41. Caniça, M.M., M. Barthélémy, L. Gilly, R. Labia, R. Krishnamoorthy, G. Paul. 1997. Properties of IRT-14 (TEM-45), a newly characterized mutant of TEM-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:374-378
 42. Chanal-Claris, C., D. Sirot, L. Bret, P. Chatron, R. Labia, and J. Sirot. 1997. Novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase from an *Escherichia coli* isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalothin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:715-716.
 43. Gniadkowski, M., I. Schneider, R. Jungwirth, L. W. Hryniewicz, and A. Bauernfeind. 1998. Ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from three Polish hospitals: Identification of three novel TEM- and SHV-5 type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:514-520.
 44. Sirot, D., C. Recule, E.B. Chaibi, L. Bret, J. Croize, C. Chanal-Claris, R. Labia, and J. Sirot. 1997. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1322-1325.
 45. L. Bret, E.B. Chaibi, C. Chanal-Claris, D. Sirot, R. Labia, and J. Sirot. 1997, Inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases with different substitutions at position 244. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2547-2549.
 46. C. Poyart, R. Mugnier, G. Quesnes, R. Berche, and P. Trieu-Cuot. 1998. A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamases (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:108-113.
 48. Labia, R., A. Morand, E.B. Chaibi, J. Peduzzi, M. Barthelemy, X. Cavallo, F. Grobost, and D. Sirot. 1997. A clavulanate-susceptible TEM-derived β -lactamase of isoelectric point 5.2 with altered kinetic constants. *Program Abstr. 37th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* abstr. C-189.

49. Neuwirth, C., R. Labia, E. Siebor, A. Pechinot, S. Madec, E.B. Chaibi, and A. Kazmierczak. 2000. Characterization of TEM-56, a novel β -lactamase produced by a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:453-455.
50. Bonnet, R., C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal, R. Labia, and J. Sirot. 1999. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2671-2677.
51. Sirot, D., and R. Labia. 1997. Personal communication.
52. Speldooren, V., B. Heym, R. Labia, M.-H. Nicolas-Chanoine. 1998. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:879-884
53. Bermudes, H., F. Jude, E.B. Chaibi, C. Arpin, C. Bebear, R. Labia, C. Quentin. 1999. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1657-1661.
54. Franceschini, N., M. Perilli, B. Segatore, D. Setacci, G. Amicosante, A. Mazzariol, G. Cornaglia. 1998. Ceftazidime and aztreonam resistance in *Providencia stuartii*: characterization of a natural TEM-derived extended spectrum β -lactamase, TEM-60. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1459-1462.
55. Vuye, A, G. Verschraegen, and G. Claeys. 1998. Personal communication.
56. Rosenau, A., B. Cattier, N. Gousset, P. Harriau, A. Philippon, and R. Quentin. 2000. *Capnocytophaga ochracea*: characterization of a plasmid-encoded extended spectrum TEM-17 β -lactamase in the phylum *Flavobacter-Bactrerooides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:760-762.
57. Blazquez, J., M-R. Baquero, R. Canton, I. Alos, F. Baquero. 1993. Characterization of a new TEM-type β -lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2059-2063.

58. Bret, L, C. Chanal, D. Sirot, R. Labia, and J. Sirot. 1996. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:183-191.
59. Essack, S.Y., L.M.C. Hall, D.G. Pillay, M.L. McFadyen, and D. M. Livermore. 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:88-95.
60. Hanson, N.D., J.D.D. Pitout, C. C. Sanders, E.S. Moland. 1998. A novel TEM-type extended spectrum β -lactamase expressed in three different genera of *Enterobacteriaceae* from South Africa. *Program Abst. 38th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* abstr. C-5.
61. Bonnet, R. De Champs C, Sirot D, Chanal C, Labia R, Sirot J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. 1999. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:2671-7.
62. Naas, T., M. Zerbib, D. Girlich, and P. Nordmann. 2003. Integration of a transposon Tn1-encoded inhibitor-resistant β -lactamase gene, *bla*_{TEM-67} from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:19-26.
63. Courvalin, P. 1997. Personal communication. TEM-18 with Q39K and E104K was proposed by oligotyping, but subsequent fuller sequencing indicated identity to TEM-3. However, an enzyme with the sequence proposed for TEM-18 has subsequently been discovered. See Reference 51.
64. Tessier, F., C. Arpin, A. Allery, C. Quentin, 1998. Molecular characterization of a TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2125 - 2127.
65. Fiett, J, A. Palucha, B. Miaczynska, M. Stankiwicz, H. Przondo-Mordarska, W. Hryniewicz, and M. Gniadkowski. 2000. A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiellae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1499-1505.

66. Omitted.
67. Edelstein, M.V. GenBank AF188199.
68. Rasheed, J. K., G.J. Anderson, A.M. Queenan, J.W. Biddle, A. Oliver, G.A. Jacoby, K. Bush, and F.C. Tenover. 2002. TEM-71, a novel plasmid-encoded, extended-spectrum β -lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2000-2003.
69. Perilli, M., B. Segatore, M.R. De Massis, M.L. Riccio, C. Bianchi, A. Zollo, G.M. Rossolini, and G. Amicosante. 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2537-2539.
72. Stobberingh, E.E., J. Arends, J.A.A. Hoogkamp-Korstanje, W.H.F. Goessens, M.R. Visser, A.G.M. Buiting, Y.J. Debets-Ossenkopp, R.J. van Ketel, M.L. van Ogtrop, L.J.M. Sabbe, G.P. Voorn, H.L.J. Winter, and J.H. van Zeijl. 1999. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in Dutch hospitals. *Infection.* **27**:348-354.
73. Leflon-Guibout, V., V. Speldooren, B. Heym, and M.-H. Nicolas-Chanoine. 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*_{TEM} genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2709-2714.
77. Arpin C., R. Labia, V. Dubois, P. Noury, M. Souquet, C. Quentin. 2002. TEM-80, a novel inhibitor-resistant β -lactamase in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1183-1189.
79. Baraniak, A., J. Fiett, A. Mrówka, J. Walory, W. Hryniewicz, and M. Gniadkowski. 2005. Evolution of TEM-type extended-spectrum β -lactamases in clinical *Enterobacteriaceae* strains in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1872-1880.
81. Perilli, M, B. Segatore, M.R. De Massis, N. Franceschini, C. Bianchi, G.M. Rossolini, and G. Amicosante. 2002. Characterization of a new extended-spectrum β -lactamase (TEM-87) isolated in *Proteus mirabilis* during an Italian survey. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:925-928.

82. Pai, H., H. J. Lee, E. H. Choi, J. Kim, and G. A. Jacoby. 2001. Evolution of TEM-related extended-spectrum β -lactamases in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3651-3.
83. Neuwirth, C., S. Madec, E. Siebor, A. Pechinot, J. M. Duez, M. Pruneaux, M. Fouchereau-Peron, A. Kazmierczak, and R. Labia. 2001. TEM-89 β -lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: New complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3591-4.
84. Pai, H. and G.A. Jacoby. 2001. Sequences of the NPS-1 and TLE-1 β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2947-2948.
85. Kurokawa, H., Shibata, N., Doi, Y., Shibayama, K., Kamachi, K., Yagi, T., and Arakawa, Y. 2003. A new TEM-derived extended-spectrum β -lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the omega-loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2981-2983.
86. De Champs, C., C. Monne, R. Bonnet, W. Sougakoff, D. Sirot, C. Chanal, and J. Sirot. 2001. New TEM variant (TEM-92) produced by *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1278-80.
89. Briñas, L., M. Zarazaga, Y., Sáenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. 2002. β -Lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3156-3163.
90. Alobwede, I.N., M'Zali, F.H., Heritage, J., Todd, N., Hancox, A., Allen, M. and Hawkey, P.M. GenBank AAM22276.
91. Shine, P., B. Crowley, S. Fanning GenBank AF397066
92. Shine, P., B. Crowley, S. Fanning GenBank AF397067
93. Shine, P., B. Crowley, S. Fanning GenBank AF397068
94. Philippon, A. 2001. Personal communication.
95. Sherwood, K.J., Wiegand, I., Wagner, J. and Wiedemann, B. GenBank AF495873

96. Morris, D., C. O'Hare, M. Glennon, M. Maher, F. Corbett-Feeney, and M. Cormican. 2003. Extended-spectrum β -lactamases in Ireland, including a novel enzyme TEM-102. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2572-2578.
97. Alonso, R., G. Gerbaud, M. Galimand, and P. Courvalin. 2002. TEM-103/IRT-28 β -lactamase, a new TEM variant produced by *Escherichia coli* BM4511. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3627-3629.
98. Li, J.-B., Li, X. and Yu, Y.-S. GenBank AF516719
99. Li, J.-B., Li, X. and Yu, Y.-S. GenBank AAM61953
100. Yum, J.H., Yong, D., Shin, J.H., Lee, K. and Chong, Y. GenBank AY101578
101. Lee, K., Yum, J.H., Lee, H.S., Yong, D. and Chong, Y. GenBank AY101764
102. Daly, M. and S. Fanning. GenBank AF506748
103. Robin, F., J. Delmas, C. Chanal, D. Sirot, J. Sirot, and R. Bonnet. 2005. TEM-109 (CMT-5), a natural complex mutant of TEM-1 β -lactamase combining the amino acid substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4443-4447.
104. Stuerenburg, E., Feucht, H. and Laufs, R. GenBank AY072920
105. Stuerenburg, E., Feucht, H. and Laufs, R. GenBank AF468003
106. De Champs, C., C. Chanal, D. Sirot, R. Baraduc, J. P. Romaszko, R. Bonnet, A. Plaidy, M. Boyer, E. Carroy, M. C. Gbadamassi, S. Lалуque, O. Oules, M. C. Poupert, M. Villemain, and J. Sirot. 2004. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: A 2 year prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:634-639.
107. Mulvey, M. R., E. Bryce, D. Boyd, M. Ofner-Agostini, S. Christianson, A. E. Simor, and S. Paton. 2004. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1204-14.
108. C. Obert. 2002. Personal communication
109. Box, A.T.A., Paauw, A. and Leverstein-vanHall, M.A. GenBank AY130282

110. Leverstein-Van Hall, M.A., Fluit, A.C., Paauw, A., Box, A.T., Brisse, S. and Verhoef, J. GenBank AY130285.
111. C. Arpin. 2002. Personal communication.
113. Poirel, L., H. Mammeri, and P. Nordmann. 2004. TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type β -lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4528-4531.
114. Kaye, K. S., H. S. Gold, M. J. Schwaber, L. Venkataraman, Y. Qi, P. C. De Girolami, M. H. Samore, G. Anderson, J. K. Rasheed, and F. C. Tenover. 2004. Variety of β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the northeastern United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1520-5.
115. Perilli, M. and Amicosante, G. GenBank AY327539
116. Perilli, M. and Amicosante, G. GenBank AY327540.
117. C. Chanal, C. De Champs, and D. Sirot. 2003. Personal communication.
119. Olesen, I., Hasman, H. and Aarestrup, F.M. 2004. Prevalence of β -lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance* **10**:334-340.
121. Decré, D., B. Burghoffer, V. Gautier, J. C. Petit, and G. Arlet. 2004. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum β -lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:881-888.
122. G. Arlet, 2003. GenBank AJ866988.
123. Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K.H., Deeley, K., Marsh, J.W., Hujer, A., Bonomo, A. and Paterson, D.L. 2004. Infections with non-typhoidal *Salmonella* species, producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4263-4270.
124. Zarnayová, M., E. Siebor, A. Péchinot, J. M. Duez, H. Bujdáková, R. Labia, and C. Neuwirth. 2005. Survey of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -

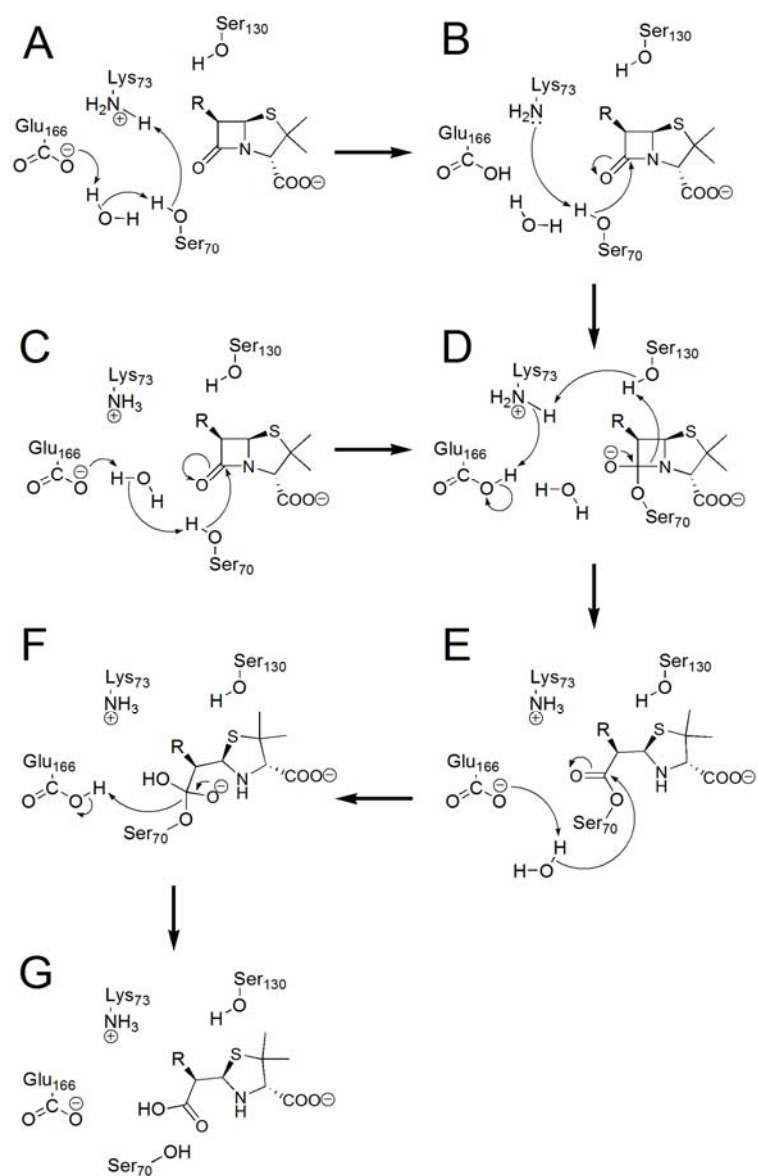
- lactamases in a Slovak hospital: Dominance of SHV-2a and characterization of TEM-132. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3066-3069.
126. Hernández, J. R., L. Martínez-Martínez, R. Cantón, T. M. Coque, and A. Pascual. 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2122-2125.
129. Perilli, M., C. Mugnaioli, F. Luzzaro, M. Fiore, S. Stefani, G. M. Rossolini, and G. Amicosante. 2005. Novel TEM-type extended-spectrum β -lactamase, TEM-134, in a *Citrobacter koseri* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1564-1566.
130. Jeong, S. H., I. K. Bae, J. H. Lee, S. G. Sohn, G. H. Kang, G. J. Jeon, Y. H. Kim, B. C. Jeong, and S. H. Lee. 2004. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2902-2906
131. S. Schwarz. 2004. Personal communication.
132. Zarrilli, R., Bagattini, M., Di Popolo, A., Crivaro, V., Gentile, F., Scarcella, A., Villari, P. and Triassi, M. GenBank AY826417.
133. Chouchani, C., R. Berlemont, A. Masmoudi, M. Galleni, J-M. Frere, O. Belhadj, and K. Ben-Mahrez. 2006. A novel extended-spectrum TEM-type β -lactamase, TEM-138, from *Salmonella enterica* Serovar *Infantis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3183-3185.
134. Lefort A., Arlet G., Lortholary O. GenBank AM286274.
135. A. Bauernfeind and I. Schneider, 2005. Personal communication.
136. A. Petroni. 2005. Personal communication.
137. Liu, G., Ling, B., Xie, Y., Yu, X., Li, C., Lei, J. and Zhao, T. GenBank AY956335
138. B. Timmerbeil. 2005. Personal communication.
139. Siebor, E., De La Tribouille, E. and Neuwirth, C.. GenBank DQ075245
140. Vignoli, R., Cordeiro, N. F., Garcia, V., Mota, M. I., Betancor, L., Power, P., Chabalgoity, J. A., Schelotto, F., Gutkind, G. & Ayala, J. A. 2006. New TEM-

derived extended-spectrum β -lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* Serovar *derby* isolates from Uruguay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 781-784.

141. Mocktar, C., Govinden, U., Sturm, W. and Essack, S. GenBank DQ105528
142. Mocktar, C., Govinden, U., Sturm, W. and Essack, S. GenBank DQ105529
143. Zhao, T.-K., Ling, B.-D., Zhou, Q.-X., Lei, J., Liu, G. and Xie, Y.-E. GenBank DQ279850
144. Caniça, M, 2005. Personal communication.
145. De Santis, F., Perilli, M. and Amicosante, G. GenBank DQ369751
146. Caniça, M, 2006. Personal communication.
147. Robin, F., Delmas, J., Schweitzer, C. and Bonnet, R. GenBank DQ834729
- 147a. Robin, F., Delmas, J., Schweitzer, C. and Bonnet, R. GenBank DQ834728
148. Peixe, L.V. 2006. Personal communication.
149. Jones, C. H. 2006. Personal communication.
150. Caniça, M, 2006. Personal communication.
151. Liu, G., Ling, B.-D., Xie, Y.-E., Lei, J., Zeng, Y., Lin, L. and Zhang, X. GenBank DQ909059
152. Robin, F, 2006. Personal communication.
153. Miro, E, 2006. Personal communication.

Annexe 2

Mécanisme proposé de l'hydrolyse d'un antibiotique β -lactame par la β -lactamase TEM-1



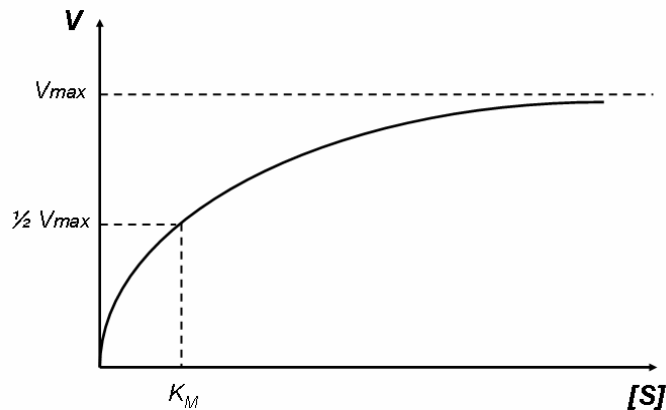
Représentation du mécanisme réactionnel proposé de la β -lactamase TEM-1 illustrant l'hydrolyse d'une pénicilline. L'acylation procède par l'activation de Ser-70 *via* Lys-73 ou Glu-166, étapes A-B-D ou C-D. Il faut noter que Glu-166 ne peut directement déprotoner Lys-73, à cause de la trop grande distance qui sépare leurs chaînes latérales. La réorganisation de l'intermédiaire tétraédrique (D) donne lieu à l'espèce acyl-enzyme (E). Glu-166 active ensuite une molécule d'eau conservée qui s'ajoute sur l'acyl-enzyme (E-F) et la réorganisation subséquente de l'intermédiaire tétraédrique résultant mène à l'expulsion du produit de la réaction (F-G). Dans le cas d'une réaction entre une PBP et un antibiotique β -lactame, la réaction s'achèverait à l'étape E, dû à la déficience des PBP pour la désacylation de l'intermédiaire. Figure réalisée à partir d'une compilation des données de [34]. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, USA).

Annexe 3

Enzymologie : justification de la méthode de régression appliquée dans l'analyse des données de cinétique enzymatique

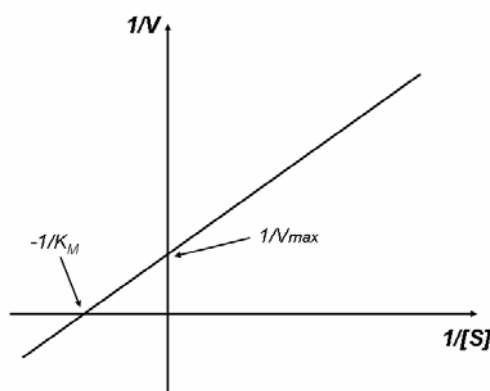
Le système enzymatique que nous avons utilisé est caractérisé par une réaction catalysée qui suit une progression dont la vitesse (V) dépend de la concentration de substrat ($[S]$) et varie selon l'équation hyperbolique de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$



À partir des données expérimentales obtenues, il est possible de déduire les paramètres de V_{\max} et de K_M de l'enzyme pour un substrat précis. Deux méthodes distinctes permettent d'obtenir ces paramètres. Dans un premier cas, une régression non linéaire des valeurs obtenues permet de tracer une courbe, ajustée selon les données expérimentales (« *fitting* ») et à partir de laquelle les valeurs de V_{\max} et de K_M peuvent être extraites (graphe ci-dessus). La seconde méthode consiste en une transformation mathématique de l'équation de Michaelis-Menten afin d'obtenir une droite d'où les paramètres cinétiques peuvent être calculés. Plusieurs transformations linéaires sont possibles, dont la transformation de

Lineweaver-Burk, qui fut appliquée à notre système enzymatique. Cette méthode consiste à tracer un graphe en utilisant l'inverse des valeurs de V et de $[S]$ ($1/V$ vs. $1/[S]$), ce qui linéarise les valeurs expérimentales et permet l'extraction de V_{\max} et de K_M à partir de l'ordonnée à l'origine ($1/V_{\max}$) et de l'abscisse à l'origine ($-1/K_M$), respectivement (graphe ci-dessous).



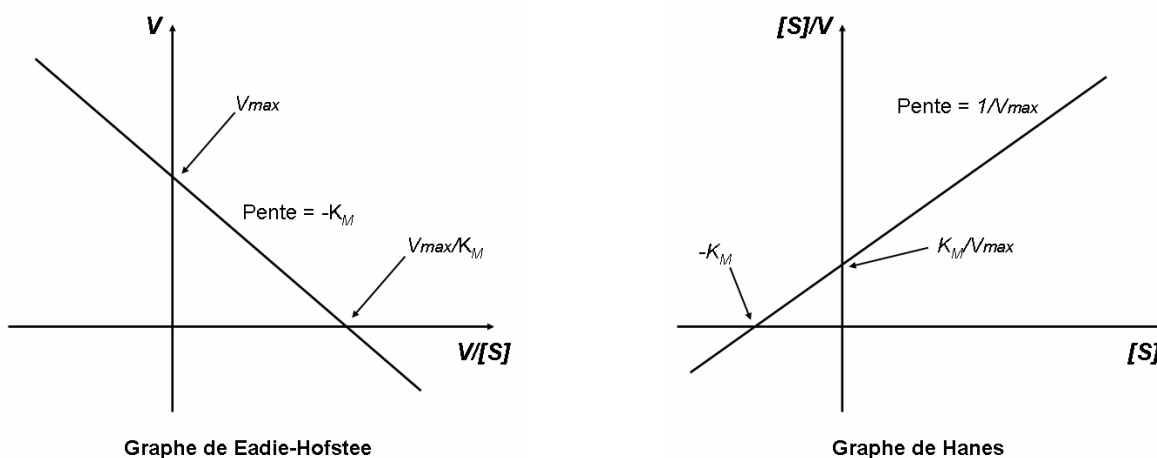
Graphe de Lineweaver-Burk

Il est généralement reconnu que depuis l'avènement des logiciels informatiques, les analyses par régressions non linéaires se sont affinées et leur précision surpasse celle des méthodes linéaires. De plus, les régressions non linéaires sont aussi statistiquement plus rigoureuses que les méthodes linéaires, telle la transformation de Lineweaver-Burke qui introduit des erreurs importantes dans la mesure de la vitesse de la réaction (V) à de basses $[S]$ (à la droite du quadrant I, graphe ci-dessus).

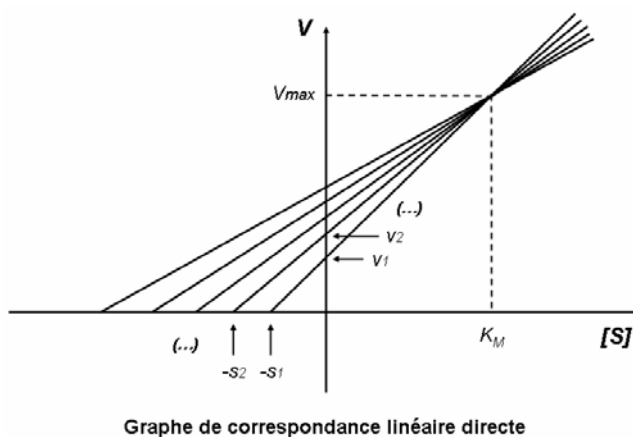
L'ajustement d'une courbe Michaelis-Menten sur des données expérimentales par régression non linéaire peut toutefois comporter certaines inexactitudes. Effectivement, il pourrait être possible de tracer une courbe à partir de presque n'importe quelle série de données tout en revendiquant la fiabilité des méthodes non linéaires. De plus, sur le plan visuel, la qualité d'une régression linéaire est plus facilement évaluée que lors d'une régression non linéaire. Bien que les méthodes non linéaires soient assurément plus précises dans l'évaluation des paramètres cinétiques, les régressions linéaires demeurent néanmoins une alternative intéressante et non-négligeable lors d'une visualisation rapide des paramètres

cinétiques. Les droites alors obtenues nous renseignent rapidement sur la qualité des résultats et les valeurs de V_{\max} et de K_M peuvent être aisément déduites. Il faut donc voir ces deux méthodes d'analyse comme étant complémentaires plutôt qu'inconciliables.

Mis à part la transformation de Lineweaver-Burke, d'autres types de régressions linéaires sont aussi disponibles, notamment celle d'Eadie-Hofstee (V vs. $V/[S]$) et de Hanes ($[S]/V$ vs. $[S]$; graphes ci-dessous) :



Parmi les méthodes de régressions linéaires, celle de la correspondance linéaire directe (« *direct linear plot* »; V vs. $[S]$) est une des seules à donner des résultats statistiquement fiables, comparables aux régressions non linéaires [73] :



Cette technique permet l'identification d'une valeur médiane des paramètres cinétiques en traçant simultanément plusieurs droites. Elle a l'avantage de ne pas nécessiter de transformation mathématique et d'être moins sensible aux données aberrantes que la méthode des moindres carrés (« *least-squares fit* ») [73].

Les deux méthodes de régression furent utilisées dans certains cas, afin de valider les résultats. Des mesures fiables de K_M et de V_{max} en régression non linéaire sont généralement calculées sur une fenêtre de concentrations flanquant le K_M , typiquement dans l'ordre de $0,5-10 \times K_M$ [73]. Par contre, certaines limitations inhérentes au système enzymatique nous empêchent parfois d'explorer de vastes gammes de substrats. Étant donné un faible coefficient d'extinction molaire (ϵ), ainsi qu'une inhibition apparente de la réaction à de fortes [S], l'analyse par régression linéaire s'imposait.

La réaction enzymatique catalysée par TEM-1 est suivie par spectrophotométrie entre 230 et 260 nm, longueur d'onde auxquelles il est difficile d'obtenir des droites reproductibles à de faibles [S], dû au faible rapport signal/bruit de fond conféré par les coefficients d'extinction molaire. De plus, une inhibition de la réaction à des [S] plus élevées que 350 μM fait en sorte que nos essais enzymatiques ne couvrent pas les gammes de [S] assez larges pour appliquer les régressions non-linéaires avec fiabilité. C'est ainsi que nous avons opté pour les méthodes linéaires d'analyses de nos résultats de cinétique, bien que certaines données aient été confirmées par régression non linéaire (voir Table 3.III). Les différences observées n'étaient pas significatives, validant ainsi nos résultats.

Annexe 4

Structure de l'antibiotique β -lactame ceftazidime (CAZ; céphalosporine de troisième génération)

