

Université de Montréal

Activité et inhibition d'une famille d'enzymes hautement résistantes au triméthoprim

Par

Kiana Lafontaine

Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de *M. Sc.*

en Biochimie, option générale

Février 2023

© Kiana Lafontaine, 2023

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire (ou cette thèse) intitulé(e)

Activité en inhibition d'une famille d'enzymes hautement résistantes au triméthoprim

Présenté par

Kiana Lafontaine

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Michel Bouvier

Président-rapporteur

Joelle N. Pelletier

Directrice de recherche

Andreea Schmitzer

Membre du jury

Résumé

L'usage excessif d'antibiotiques a provoqué l'émergence de résistance, constituant un problème sanitaire mondial. L'antibiotique triméthoprim (TMP) inhibe l'enzyme dihydrofolate réductase (FolA) des bactéries, interrompant la production d'un précurseur essentiel dans la synthèse des purines et empêchant ainsi la croissance bactérienne. Cependant, certaines bactéries produisent une seconde dihydrofolate réductase : une DfrB, appartenant à une famille d'enzymes hautement résistantes au TMP. Actuellement, dix membres de la famille DfrB ont été identifiés, qui partagent une identité de séquence élevée (74 – 98 %). Les enzymes DfrB sont constituées de domaines identiques de 78 acides aminés, de type 'SH3-like', qui s'homotétramérisent afin de former l'enzyme active. Les DfrB ne partagent aucune homologie de séquence ou de structure avec les FolA et aucun antibiotique n'a encore été développé pour contourner la résistance au TMP causée par les DfrB. Afin de mieux comprendre le domaine SH3-like, des homologues (DfrB-H) partageant 10 à 80 % d'identité avec la DfrB1 ont été identifiés et caractérisés. Ils possèdent une activité dihydrofolate réductase (Dfr) et confèrent de la résistance au TMP. De plus, afin de vérifier si les gènes *dfrB* se retrouvent dans divers environnements, une recherche dans une base de données métagénomiques a été entreprise, permettant de caractériser 10 nouvelles séquences homologues aux DfrB connues.

En 2012, le groupe Pelletier a rapporté le premier inhibiteur spécifique d'une DfrB, et plusieurs autres depuis. Seule la DfrB1 a été caractérisée concernant son profil d'inhibition ainsi que sa thermostabilité inhabituelle. Ici, une méthode semi-automatisée sera développée pour caractériser les profils d'inhibition, de thermostabilité, de résistance au TMP et d'activité enzymatique de toutes les DfrB et des homologues identifiés, afin de les comparer à ceux de la DfrB1. Pour atteindre ces objectifs, des nouvelles méthodes à haut débit de détermination d'activité ainsi que des tests de concentration minimale inhibitrice (CMI) furent développés. Ces méthodes ont permis de déterminer que les profils de thermostabilité et d'inhibition de plusieurs DfrB et DfrB-H sont comparables aux profils de la DfrB1. De plus, le criblage de dizaines de composés potentiellement inhibiteurs a été effectué afin de poursuivre la recherche d'inhibiteurs spécifiques aux DfrB. En outre, nous signalons 10 nouvelles séquences homologues de DfrB qui confèrent une résistance élevée au TMP et possèdent une activité Dfr. La caractérisation de tous les membres DfrB et les

homologues nous permettra d'acquérir une meilleure connaissance de leur mécanisme de résistance, de leur prévalence dans divers environnements et de soutenir notre développement de nouveaux inhibiteurs des DfrB.

Mots-clés : triméthoprine, DfrB, domaine SH3-*like*, homologues, activité enzymatique, inhibition enzymatique, thermostabilité, résistance bactérienne.

Abstract

The intensive usage of antibiotics has provoked the emergence of antibiotic resistance, causing a worldwide health issue. The antibiotic trimethoprim (TMP) targets the microbial dihydrofolate reductase enzyme (FolA), abrogating the production of an essential precursor in the synthesis of purines and thus preventing bacterial proliferation. However, some bacteria produce an additional dihydrofolate reductase: the highly TMP-resistant DfrB. Currently, ten DfrB family members have been identified, that share high sequence identity (74 – 98 %). DfrB enzymes consist of identical, 78 amino acid-long SH3-like domains, that homotetramerize to form the active enzyme. DfrB share no sequence or structural homology with FolA and no antibiotic has yet been developed to circumvent the TMP resistance caused by DfrB. In order to gain insight into the SH3-like domain of DfrB, homologues (DfrB-H) sharing 10 to 80 % identity with DfrB1 were identified and characterized, which displayed dihydrofolate reductase (Dfr) activity and conferred high TMP resistance. Also, to investigate if *dfrB* genes are identified in various environments, a metagenomic database search was undertaken to characterize ten new DfrB1 homologue sequences.

In 2012, the Pelletier group reported the first specific inhibitor of a DfrB, and several others since. Only DfrB1 has been characterized regarding its inhibition profile as well as its unusual thermostability. Here, semi-automated methods will be developed to compare the inhibition, thermostability, TMP-resistance and enzymatic activity profiles of all DfrB and DfrB homologues to those of DfrB1. To address this objective, new high-throughput activity assays as well as Minimal Inhibitory Concentration (MIC) assays were developed. Using those methods, we determined that thermostability and inhibition profiles of several DfrB and DfrB-H were comparable to those of DfrB1. Also, a screen of several dozen potential inhibitory compounds was performed, to attempt to identify further specific DfrB inhibitors. In addition, we report 10 new DfrB homologues that confer high TMP resistance and possess Dfr activity. The characterization of all DfrB members and DfrB homologues will allow us to acquire greater knowledge on their antimicrobial resistance mechanism, their prevalence in different environments and support our development of new DfrB-specific inhibitors.

Keywords: trimethoprim, DfrB, SH3-like domains, enzymatic activity, enzymatic inhibition, thermostability, bacterial resistance.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et abréviations	17
Remerciements	21
Chapitre 1 - Introduction	23
1.1 – Le triméthoprimé	23
1.1.1 – Les composés antibactériens	23
1.1.2 – La résistance aux antibiotiques	25
1.1.3 – Le triméthoprimé : un antifolate.....	28
1.1.4 – La réaction enzymatique catalysée par les dihydrofolate réductases	31
1.2 – Les dihydrofolate réductases de type B (DfrB).....	33
1.2.1 – La relation structure-activité de la DfrB1	33
1.2.2 – L’origine évolutive inconnue des DfrB.....	39
1.2.3 – Les homologues distants des DfrBs	40
1.2.4 – Inhibition des DfrB.....	41
1.2.5 – Découverte d’inhibiteurs de la DfrB1	43
1.3 – L’hypothèse de ce mémoire	48
Références du chapitre 1	49
Chapitre 2 – Caractérisation de l’activité enzymatique de nouvelles DfrB	53
2.1 Objectif du chapitre	53

2.2 – Les essais enzymatiques.....	53
2.2.1 – Détermination de l’activité d’une enzyme	53
2.2.2 – Facteurs influençant l’activité enzymatique.....	57
2.3 – La détermination spectrophotométrique de l’activité enzymatique	58
2.3.1 – Mesure spectrophotométrique de l’activité enzymatique des DfrB	59
2.3.2 – Les conditions expérimentales utilisées pour la détermination de l’activité des DfrB	60
2.3.3 – Méthodes alternatives déterminant l’activité enzymatique.....	61
2.4 - Partie expérimentale.....	64
2.4.1 - Solutions	64
2.4.2 - Expression protéique et lyse des cultures bactériennes	64
2.4.3 - Essais d’activité dihydrofolate réductase en lysat	65
2.4.4 - Concentration minimale inhibitrice (CMI)	65
2.5 - Résultats et discussion	66
2.5.1 - Caractérisation d’homologues proches des DfrB	66
2.5.2 - Caractérisation des homologues proches de DfrB1	67
Références du chapitre 2	70
Chapitre 3 – Caractérisation de l’inhibition enzymatique des DfrB	73
3.1 - Objectif de ce chapitre	73
3.2 – Les inhibiteurs réversibles et irréversibles	73
3.3 – Les paramètres de l’inhibition enzymatique	76
3.4 – Mesure spectrophotométrique pour détermination de l’inhibition enzymatique des DfrB	77
3.4.1 – Détermination des conditions expérimentales.....	78
3.4.2 – Méthodes alternatives pour le design d’inhibiteurs.....	78
3.5 – Sélectivité des inhibiteurs de DfrB.....	79

3.6 - Partie expérimentale.....	80
3.6.1 - Solutions	80
3.6.2 - Matériel.....	80
3.6.3 - Expression protéique et purification par la chaleur de la DfrB1	80
3.6.4 - Expression protéique et purification de la DfrB-H5	81
3.6.5 - Essais d'activité en présence d'inhibiteurs des DfrB et de DfrB-H5.....	81
3.6.6 - Criblages des composés IRIC	82
3.7 - Résultats et discussion	82
3.7.1 – Détermination des concentrations du co-solvant DMSO.....	82
3.7.2 - Inhibition d'une famille d'enzymes hautement résistantes au TMP.....	83
3.7.3 – Criblage d'inhibiteurs potentiels	83
3.7.4 – Profil d'inhibition des homologues distants des DfrB	87
3.7.5 – Optimisation des inhibiteurs bisubstrats	89
Références du chapitre 3	91
Chapitre 4 – Caractérisation de la thermostabilité des DfrB.....	93
4.1 - Objectifs de ce chapitre.....	93
4.2 - Profil de thermostabilité des DfrB	93
4.3 – Détermination de la thermostabilité des DfrB par essai d'activité en lysat brut.....	95
4.4 - Partie expérimentale.....	96
4.4.1 - Essais de thermostabilité par le suivi de l'activité en lysat.....	96
4.5 – Résultats et discussion.....	97
4.5.1 - Caractérisation de la thermostabilité des DfrB	97
4.5.2 - Caractérisation de la thermostabilité des homologues distants DfrB-H	98
4.5.3 – Défis relevés lors de l'établissement des essais	101
Références du chapitre 4	102

Chapitre 5 – Essais de l’activité de variants mutés de DfrB	103
5.1 – Objectif de ce chapitre.....	103
5.2 – Présentation des variants de DfrB1 sous étude	103
5.3 – L’expression protéique chez les procaryotes	105
5.4 – Partie expérimentale.....	108
5.4.1 – Caractérisation de l’activité enzymatique des mutants et du WT DfrB1 sous le promoteur pBAD.....	108
5.5 – Résultats et discussion.....	109
5.5.1 - L’expression bactérienne de mutants DfrB1 sous système <i>ara</i>	109
5.5.2 – Mutants DfrB1 choisis	111
Références du chapitre 5	114
Chapitre 6 - Conclusion et perspectives	115
Références du chapitre 6	119
Annexes.....	120

Liste des tableaux

Tableau 3.1 - Criblage préliminaire à 400 μ M de composés de l'IRIC envers la DfrB1.	85
Tableau 5.1 - Activité enzymatique de la DfrB1 sous système ara.....	110
Tableau 5.2 - Activité enzymatique de la DfrB1 sous système ara, des mutants E2R et E2V et du contrôle négatif cTEM19m sous système lac.....	111

Liste des figures

Figure 1.1 - Mécanismes de résistance généraux retrouvés chez la bactérie.	27
Figure 1.2 - Voie de biosynthèse du folate.....	29
Figure 1.3. Antifolates utilisés en milieu clinique pour contrer des Dfr d'organismes variés.....	30
Figure 1.4. Réaction générale de réduction enzymatique du DHF.	32
Figure 1.5. Structures de la dihydrofolate réductase chromosomale bactérienne (FolA de <i>E. coli</i>) et la DfrB1.....	35
Figure 1.6. Structure du monomère comportant cinq brins antiparallèles formé par 78 acides aminés.....	36
Figure 1.7. La symétrie 222 produite par la tétramérisation des monomères, et certains résidus impliqués dans la liaison du DHF et du NADPH au site actif.	37
Figure 1.8. Schéma de liaison des composés impliqués dans la réaction de réduction de la DfrB1	38
Figure 1.9. Homologues distants de la famille DfrB.....	41
Figure 1.10. Inhibiteurs non-spécifiques et substrats de la DfrB1.....	42
Figure 1.11. Évolution de la découverte d'inhibiteurs par design à base de fragments.....	44
Figure 1.12. Méthode SAR afin d'optimiser les inhibiteurs de type bisbenzimidazole et optimisation du coût entropique.....	46
Figure 1.13. Représentation des inhibiteurs bissubstrats et des valeurs d'inhibition obtenues.....	47
Figure 2.1. Graphique typique d'une courbe Michaelis-Menten.	55
Figure 2.2. Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de substrat.....	56
Figure 2.3. Profil d'activité (k_{cat}) de la DfrB1 selon la variation de pH à trois concentrations de protéine.....	61
Figure 2.4. Alignement des homologues proches et de la DfrB1.	67
Figure 2.5. Les homologues DfrB1 nouvellement identifiés confèrent de la résistance au TMP et possèdent une activité Dfr.....	68
Figure 3.1. Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition compétitive.....	75
Figure 3.2. Graphique caractéristique d'une courbe d'IC ₅₀	76

Figure 3.3. Courbe d'activité relative (%) de la DfrB1 en fonction d'une augmentation de concentration de DMSO (%).....	83
Figure 3.4. Essais d'inhibition détaillés de six composés de l'IRIC.....	86
Figure 3.5. Le bissubstrat HP18 et le bisbenzimidazole Jj2008 inhibent l'activité de la DfrB-H5 de manière similaire à la DfrB1.	88
Figure 3.6. Le bissubstrat HP18-PO4 inhibe l'activité de la DfrB4 de manière similaire au bissubstrat HP18.....	89
Figure 4.1. Une étude calorimétrique à balayage différentiel pour la DfrB1 sous forme de tétramère et de dimère.	94
Figure 4.2. Thermostabilité des DfrB, DfrB-H et DfrB-H-Seg. Les lysats de <i>E. coli</i>	98
Figure 4.3. Gel dénaturant Glycine-PAGE des lysats protéiques à la suite d'une surexpression des DfrB-H.	99
Figure 4.4. Similarité de séquence (%) des DfrB-H et de leur domaine SH3-like.	100
Figure 5.1. Librairie produite par mutagenèse par saturation de la DfrB1.	104
Fig. 5.2. Représentation mécanistique des étapes nécessaires pour la régulation d'un gène en protéine.....	106
Figure 5.3. Activité relative (%) des mutants et du type-sauvage de la DfrB1 sous le promoteur pBAD.	112

Liste des sigles et abréviations

CAP : Protéines activatrices des catabolites

CATS : Acétyltransférase de chloramphénicol

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DC : Dichroïsme circulaire

Dfr : Dihydrofolate réductase

DfrA : Dihydrofolate réductase de type A

DfrB : Dihydrofolate réductase de type B

DHF : Dihydrofolate

DHPS : Synthétase de dihydroptéroate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dTMP : Thymidine monophosphate

E. coli : *Escherichia coli*

EGM : Éléments génétiques mobiles

FolA : Dihydrofolate réductase bactérienne

FPGS : Synthétase de folylpoly- γ -glutamate

hDfr : Dihydrofolate réductase humaine

HPPK : Pyrophosphokinase de 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine

HTS : *High throughput screening* (criblage à haut débit)

IC₅₀: Concentration inhibitrice médiane

ITC : Titrage calorimétrique isotherme

JGI/IMG : *Joint Genome Institute – Integrated Microbial Genomes*

K_i : Constante d'inhibition

K_M : Constante de Michaelis

MS : Spectrométrie de masse

MTX : Méthotrexate

MWCO : *Molecular weight cutoff*

NAD^+ : Nicotinamide adenine dinucléotide (oxydée)

NADH : Nicotinamide adenine dinucléotide (réduite)

$NADP^+$: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (oxydée)

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduite)

RMSD : *Root-Mean-Square Deviation*

SAR : Relation structure-activité

SMX : Sulfaméthoxazole

THF : Tétrahydrofolate

THG : Transfert horizontal de gènes

TMP : Triméthoprim

VC : Volume de colonne

V_{max} : Vitesse maximale

À Papa, Maman, Pris, Jess, Tyler-Jay, Olivia et William

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Pr. Joelle N. Pelletier, de m'avoir permis d'effectuer une maîtrise au sein de son laboratoire de recherche. Je tiens spécifiquement à la remercier pour son soutien continu, son encadrement en tant que mentor et son dévouement tout au long de ce projet. Je remercie Pr. Anne Marinier pour son implication dans le développement d'inhibiteurs des DfrB, ainsi que son encadrement académique. Je remercie également le programme APRENTICE de m'avoir offert une bourse académique.

Un grand merci à Adem H.-Parisien un collègue exceptionnel qui m'a aidé tout au long de la progression du projet et de ce mémoire. Toutes ces heures de travail côte à côte ont permis d'enrichir le contenu de ce travail. J'aimerais également remercier ma collègue Claudèle Lemay-St-Denis qui m'a initiée aux essais enzymatiques et qui m'a aidée tout au long de la rédaction du mémoire. Leur partage de connaissances m'a permis d'enrichir mes réflexions et perceptions quant au sujet étudié, me permettant de développer une autonomie de travail important pour mes futurs projets. J'aimerais également remercier les autres membres du laboratoire Pelletier : Jonathan Besna, Stella Cellier-Goetghebeur, Ali Fendri, Maxime St-Aubin et Donya Valikhani d'avoir rempli mes deux années de maîtrise de moments inoubliables.

Un merci très précieux à mon conjoint, William Lavallée, avec qui j'ai traversé ces sept dernières années académiques. Merci pour ton support inconditionnel et d'être mon « partner in crime », je ne pourrais pas demander mieux!

Le plus grand merci va à mes parents pour leur support et encouragements continuels, qui m'ont aidé à la fois financièrement et émotionnellement lors de mes années d'études. Je n'aurais pas réussi à être qui je suis sans vous. Merci à mes beaux-parents pour votre encouragement au cours des dernières années.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 – Le triméthoprime

1.1.1 – Les composés antibactériens

À la suite de la découverte fortuite de la pénicilline au début du XX^e siècle, l'administration d'antibiotiques est devenue l'une des interventions médicales les plus indispensables en médecine moderne. Ces composés antibactériens permettent de prévenir ou de guérir les infections bactériennes à la fois chez les humains, lors de procédures chirurgicales et thérapeutiques, et chez les animaux, notamment dans l'industrie agroalimentaire (1).

De nombreuses familles d'antibiotiques sont produites par des micro-organismes, telles que des bactéries et des champignons, permettant à ces micro-organismes de survivre dans leur écosystème où ils sont en compétition contre d'autres microbes pour les nutriments. Ainsi, la production d'antibiotiques favorise leur survie et, par le fait même, leur évolution (2). Les premiers antibiotiques non-naturels étaient inspirés de molécules naturelles. La majorité des antibiotiques sont désormais semi-synthétiques bien que certains sont entièrement synthétiques, permettant d'accéder à une grande variété de composés (3).

Les antibiotiques agissent selon différents mécanismes d'action en perturbant une étape importante dans le développement bactérien, par exemple en ciblant la paroi cellulaire (*e.g.* les β -lactamines), en inhibant la biosynthèse des protéines (*e.g.* les tétracyclines) ou en inhibant la réplication d'ADN (*e.g.* les quinolones) (4). Les antibiotiques exercent ainsi une action spécifique sur un micro-organisme ciblé, pouvant causer leur mort cellulaire (bactéricides) ou bloquer leur prolifération (bactériostatiques).

Le mésusage et l'abus de consommation d'antibiotiques tant en milieu clinique que dans l'élevage de bétail et en pisciculture cause la dissémination d'antibiotiques dans divers écosystèmes. La pression sélective engendrée par cette dissémination a favorisé l'apparition d'un phénomène d'accoutumance indésirable et incontrôlable, soit la résistance aux antibiotiques. Ainsi, la vaste majorité des antibiotiques utilisés depuis les années 1940 ont une efficacité thérapeutique réduite,

signifiant que pour la même quantité administrée, l'effet thérapeutique est moindre, à cause de la résistance des bactéries envers ceux-ci (5).

Pour contrer la résistance aux antibiotiques de 1^{ère} génération, de nouvelles molécules ou de nouveaux dérivés d'anciennes molécules (*i.e.* la synthèse de nouvelles générations d'antibiotiques) furent introduites. Néanmoins, la découverte d'une 3^e génération (*e.g.* Céfixime, Céfodizime, Céfotaxime, etc.) et d'une 4^e génération (*e.g.* Céfépime, Céfluprenam, Céfosélis, etc.) des antibiotiques de classe β -lactamines, les céphalosporines, a rapidement mené à la diversification des mécanismes de résistances des β -lactamases (6). De fait, on observe depuis des décennies l'évolution rapide des enzymes β -lactamases qui sont capables de lier et inactiver ces divers antibiotiques β -lactamines, permettant aux micro-organismes de contrer leur effet thérapeutique (7).

Ainsi, les bactéries développent constamment de nouveaux mécanismes de résistance pour contrer la quantité massive d'antibiotiques disséminée dans les écosystèmes. Certaines familles de bactéries sont résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques en usage clinique, phénomène nommé la multirésistance. Ce fardeau mondial influence directement le coût humain et économique en entraînant une hausse des taux de morbidité (prévalence d'une maladie) et de mortalité. Notamment, 2 millions d'individus sont affectés annuellement aux États-Unis par les souches multirésistantes donnant lieu à au moins 23 000 décès, engendrant une perte économique d'environ 35 milliard de dollars (traitements, matériel requis, coût de la prise en charge, etc.) (8). Il est d'ailleurs estimé que cumulativement jusqu'en 2050, si aucune mesure n'est prise, au minimum 10 millions d'individus mourront à l'échelle mondiale en raison des infections qui ne peuvent être traitées avec les antibiotiques actuels, étant donné la résistance (8).

1.1.2 – La résistance aux antibiotiques

Les diverses interactions (inter et intra-espèces) dans l'ensemble d'une population de multiples micro-organismes ont un impact sur la manière dont ces derniers réagissent et évoluent à la suite d'une exposition à un ou plusieurs antibiotiques au sein d'un écosystème (9). Les différents micro-organismes d'une communauté microbienne peuvent coopérer afin de réduire l'effet de l'antibiotique. Par exemple, les micro-organismes peuvent interagir ensemble afin de diminuer la concentration effective de l'antibiotique dans le milieu, permettant aux organismes plus sensibles de survivre (9).

À l'aide de leur plasticité génétique, les bactéries évoluent et acquièrent de nouvelles stratégies de défense pour contrer l'effet d'un antibiotique; c'est le phénomène de pression sélective (10). Les mécanismes de résistance sont dits soit naturels ou acquis (10). La résistance naturelle est caractérisée comme étant intrinsèque; elle peut soit être constamment exprimée dans la cellule bactérienne ou induite lorsque la bactérie est exposée à un antibiotique (11). Les deux parois membranaires distinctes des bactéries à Gram négatif constituent un exemple de barrière naturelle. En effet, la membrane externe sert de barrière sélective et joue directement un rôle sur leur viabilité en contrôlant les échanges de matières.

Ainsi, en modifiant la composition membranaire des bactéries à Gram négatif, leur perméabilité membranaire peut être réduite, limitant l'internalisation de l'antibiotique (figure 1.1). Cette caractéristique donne ainsi la capacité aux bactéries à Gram négatif d'offrir une résistance aux antibiotiques hydrophiles. Par exemple, la résistance à la pénicilline, qui diffuse à l'intérieur des cellules par les porines, est observée lorsque le nombre de porines actives est diminué ou lorsque la sélectivité de ces dernières est modifiée par des mutations, limitant ainsi l'internalisation de l'antibiotique (11). Pour ce qui est des bactéries à Gram positif, qui ne possèdent qu'une seule paroi cellulaire, utilisent leurs pompes d'efflux afin d'exporter ces composés qui leur sont toxiques et ainsi maintenir l'homéostasie cellulaire (figure 1.1) (10). À noter que les bactéries à Gram négatif possèdent également des pompes d'efflux. Certaines pompes d'efflux peuvent transporter divers composés de structures variées, permettant la multirésistance à plusieurs familles d'antibiotiques, tandis que d'autres sont spécifiques à une seule classe d'antibiotiques (12). Par exemple, la famille

des pompes d'efflux *Tet* confère la résistance à la tétracycline, un antibiotique utilisé pour traiter plusieurs types d'infections bactériennes (13).

Quant à eux, les mécanismes acquis se caractérisent par l'apparition d'une résistance lorsqu'une bactérie évolue grâce à des mutations ou acquiert du matériel génétique par transfert horizontal de gènes (THG) (11). Le THG permet à un organisme d'assimiler le matériel génétique et les gènes de résistance d'un autre micro-organisme, sans descendance directe (10). Ce processus peut s'effectuer entre les bactéries par conjugaison (échange de matériel génétique par contact direct entre deux bactéries), transformation (incorporation d'ADN étranger) ou transduction (incorporation de matériel génétique par l'entremise d'un virus) (10). De plus, les mutations (*i.e.* l'insertion, la substitution ou la délétion des bases nucléiques) permettent à certaines bactéries d'acquérir un avantage sélectif et d'ainsi maintenir leur capacité proliférative. Ceci a lieu lorsque les mutations diminuent l'affinité de la cible de l'antibiotique ou augmentent l'expression d'une enzyme ciblée (figure 1.1). La production d'enzymes ayant la capacité de dégrader ou de modifier un antibiotique (acétylation, phosphorylation, etc.) est un autre mécanisme acquis connu (figure 1.1). Les modifications enzymatiques peuvent, par exemple, augmenter l'encombrement stérique et ainsi réduire l'affinité entre l'antibiotique et sa cible (10). D'ailleurs, il a été observé que le chloramphénicol, un antibiotique inhibant la synthèse protéique, peut être inactivé par des acétyltransférases de chloramphénicol (CATs), empêchant leur liaison aux ribosomes et causant une résistance (14).

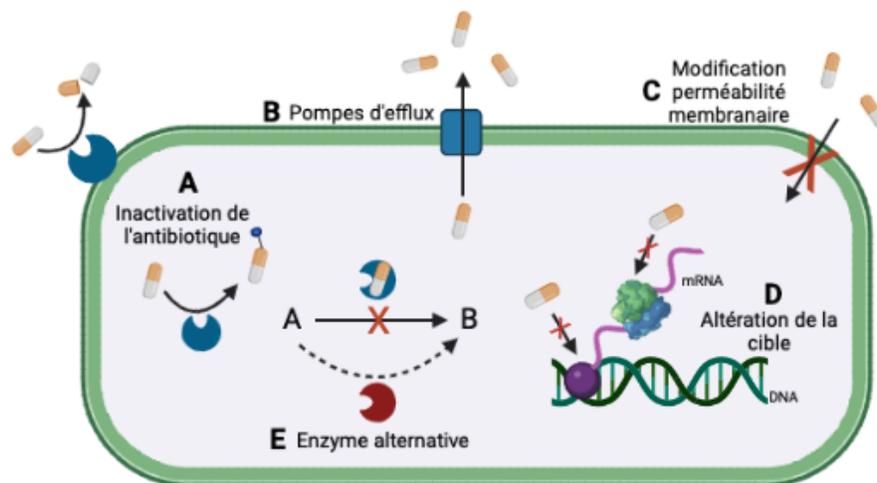


Figure 1.1 - Mécanismes de résistance généraux retrouvés chez la bactérie. Les enzymes sont représentées par des cercles bleus et rouges. Les antibiotiques sont représentés par des comprimés. Direction du flux d'antibiotique, représenté par une flèche noire. A) Inactivation de l'antibiotique par modification enzymatique. B) Utilisation des pompes d'efflux pour exporter les molécules d'antibiotique. C) Modification de la perméabilité membranaire pour empêcher l'entrée d'antibiotique dans la cellule. D) Modification de la cible par mutation, empêchant la liaison adéquate de l'antibiotique à la cible. E) Expression d'une enzyme alternative pour contrer l'inhibition de la cible. Figure inspirée de la référence (15).

Pour ce qui est de la multirésistance, elle est efficacement promue grâce à un système complexe, soit les éléments génétiques mobiles (EGM) qui comprennent les intégrons, les transposons et les plasmides (16). Ces éléments génétiques ont la capacité de capturer, d'intégrer et d'exprimer des cassettes géniques, soit des fragments d'ADN comportant plusieurs gènes dont des gènes de résistance aux antibiotiques (16). Ceci permet le transfert efficace de gènes de résistance entre les micro-organismes d'un environnement, propageant la capacité de résistance. La multirésistance altère directement l'efficacité thérapeutique des antibiotiques : les infections bactériennes deviennent davantage difficiles à traiter.

Ainsi, puisque les bactéries évoluent rapidement afin de limiter l'effet néfaste des antibiotiques sur leur croissance et leur survie, il est crucial d'envisager le développement de nouvelles molécules inhibitrices comme moyen pour contrer les mécanismes de résistance développés chez les bactéries.

1.1.3 – Le triméthoprim : un antifolate

Plusieurs voies biochimiques essentielles à la prolifération bactérienne sont ciblées par les antibiotiques. L'inhibition de la voie de synthèse des folates en est un exemple important (figure 1.2). À l'inverse des eucaryotes, les procaryotes synthétisent leur folate à partir de la guanosine triphosphate afin de synthétiser les précurseurs d'ADN. Ainsi, les procaryotes ne dépendent pas du transport actif du folate exogène pour assurer leur survie (17). Néanmoins, l'inhibition de la réaction de réduction du dihydrofolate (DHF), une étape cruciale de cette voie, ne peut être contournée par aucune autre voie métabolique pour assurer la survie bactérienne, expliquant l'utilité des antifolates. Les distinctions entre la voie métabolique du folate chez l'humain et les procaryotes sont présentées dans la figure 1.2 ci-dessous.

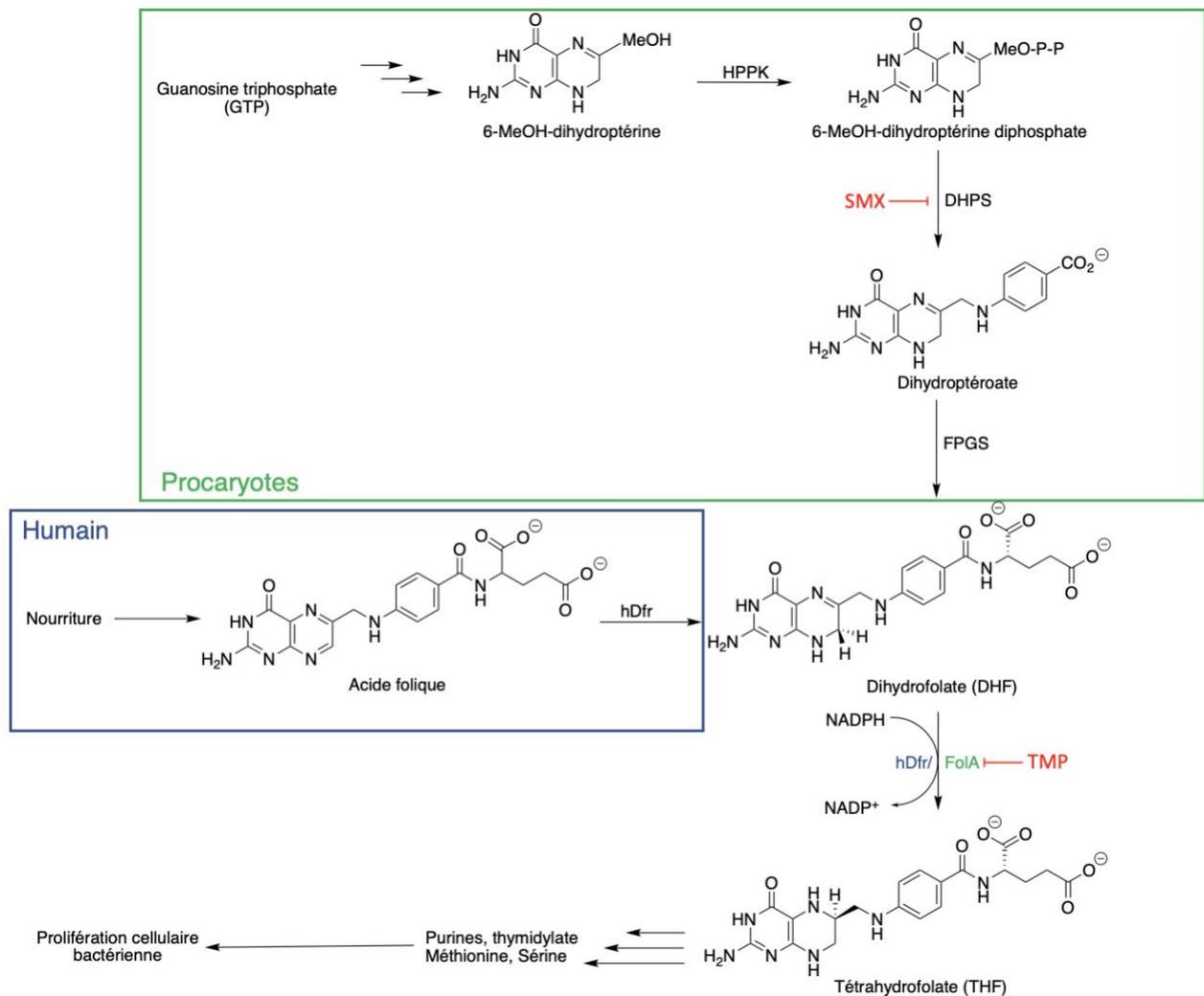


Figure 1.2 - Voie de biosynthèse du folate. Enzymes essentielles et distinctes dans les voies de biosynthèse du folate chez les procaryotes (encadré vert) et chez les humains (encadré bleu). Les étapes sans encadré sont retrouvées chez tous les organismes. La synthétase de dihydroptéroate (DHPS) et la dihydrofolate réductase bactérienne (FolA) des procaryotes peuvent être inhibées simultanément par l'administration conjointe des antibiotiques triméthoprime (TMP) et sulfaméthoxazole (SMX), inhibition représentée en rouge. Les flèches triplées symbolisent plusieurs étapes réactionnelles non représentées. HPPK : pyrophosphokinase de 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine; FPGS : synthétase de folylpoly-g-glutamate; hDfr : dihydrofolate réductase humaine (figure inspirée de (17)).

Les antifolates ont comme mécanisme d'action d'inhiber la voie métabolique du folate. Ces composés ont été initialement administrés pour le traitement du cancer et des maladies inflammatoires (18). L'aminoptérine fut le premier antifolate utilisé en milieu clinique en 1948. Cela permettait de traiter les enfants atteints de la leucémie aiguë lymphoblastique, un cancer du

sang et de la moelle osseuse affectant les globules blancs (18). L'administration de l'aminoptérine fut remplacée par le méthotrexate (MTX) au début des années 1950, puisque cet antifolate était considéré comme étant moins toxique et possédant un index thérapeutique plus favorable (18), c'est-à-dire que le rapport entre son effet thérapeutique et la toxicité cellulaire qu'il engendre était avantageux (19). Désormais, plusieurs antifolates sont utilisés en milieu clinique (figure 1.3), notamment pour cibler la dihydrofolate réductases humaine (hDfr) ainsi que comme antibiotiques puisque les Dfr sont ubiquitaires.

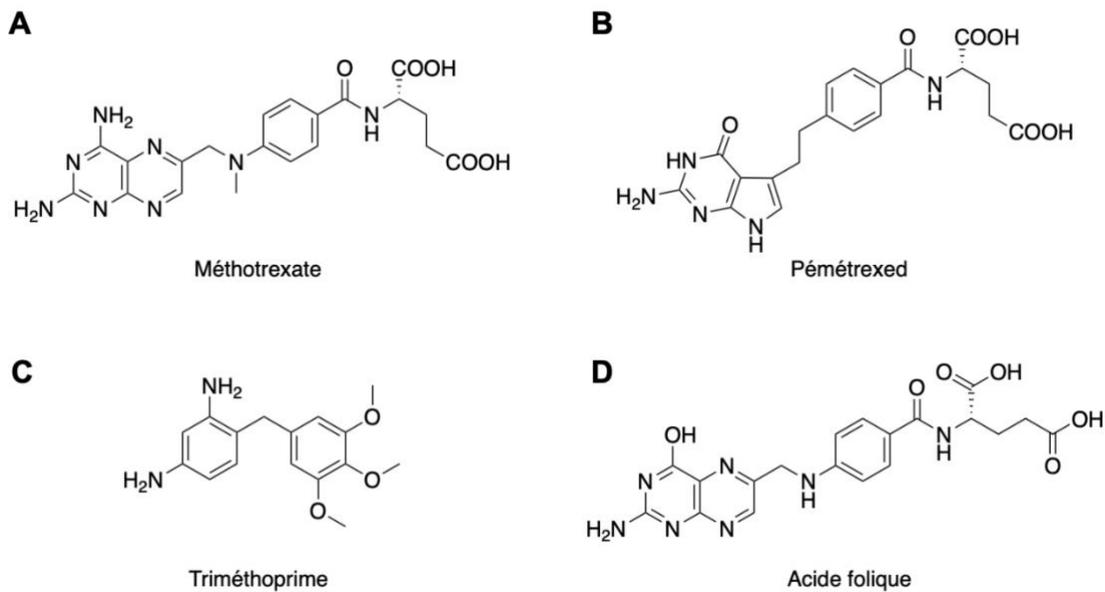


Figure 1.3. Antifolates utilisés en milieu clinique pour contrer des Dfr d'organismes variés. A) Le méthotrexate et B) le pémétréxed, deux antifolates utilisés en chimiothérapie de nombreux cancers. C) Le triméthoprimé, un antifolate ciblant sélectivement les Dfr microbiennes. D) L'acide folique, dont la voie de synthèse est inhibée par la liaison compétitive des antifolates aux Dfr respectives.

Le triméthoprimé (TMP) est un antifolate grandement utilisé en raison de son efficacité et de son faible coût. Le TMP fut initialement administré au début des années 1960 afin de traiter des infections des voies urinaires. Depuis la fin des années 1960, il est largement administré en association avec le sulfaméthoxazole (SMX), un antibiotique de type sulfamide, permettant le traitement de diverses infections bactériennes. Ce duo TMP-SMX permet d'inhiber deux étapes séquentielles dans la voie de biosynthèse du folate (figure 1.2). Le SMX inhibe la conversion de l'acide *p*-aminobenzoïque en dihydroptéroate, puis le triméthoprimé inhibe la Fola, soit la

réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate (figure 1.2). Bien que l'analogie structurelle entre le TMP et le DHF soit faible, le TMP inhibe de manière compétitive la Dfr en se liant à un sous-site différent qui chevauche le site de liaison du DHF (voir section 1.2.1) (20). À l'inverse, le MTX se lie au même site que le DHF afin d'inhiber la Dfr.

1.1.4 – La réaction enzymatique catalysée par les dihydrofolate réductases

Le TMP est un composé entièrement synthétique, ciblant avec une grande sélectivité ($K_i \sim 20$ pM) l'enzyme bactérienne dihydrofolate réductase (Dfr) chromosomale (FolA) (21). Les Dfr sont des oxydoréductases ubiquitaires et vitales pour toutes les cellules. Elles catalysent la réduction du dihydrofolate (DHF) en tétrahydrofolate (THF) par l'oxydation du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Plus précisément, la réaction est initiée par la protonation du DHF (atome N5, portion ptérine), suivi du transfert d'hydrure du NADPH au DHF (atome C6, portion ptérine), permettant la formation du produit, le THF (22).

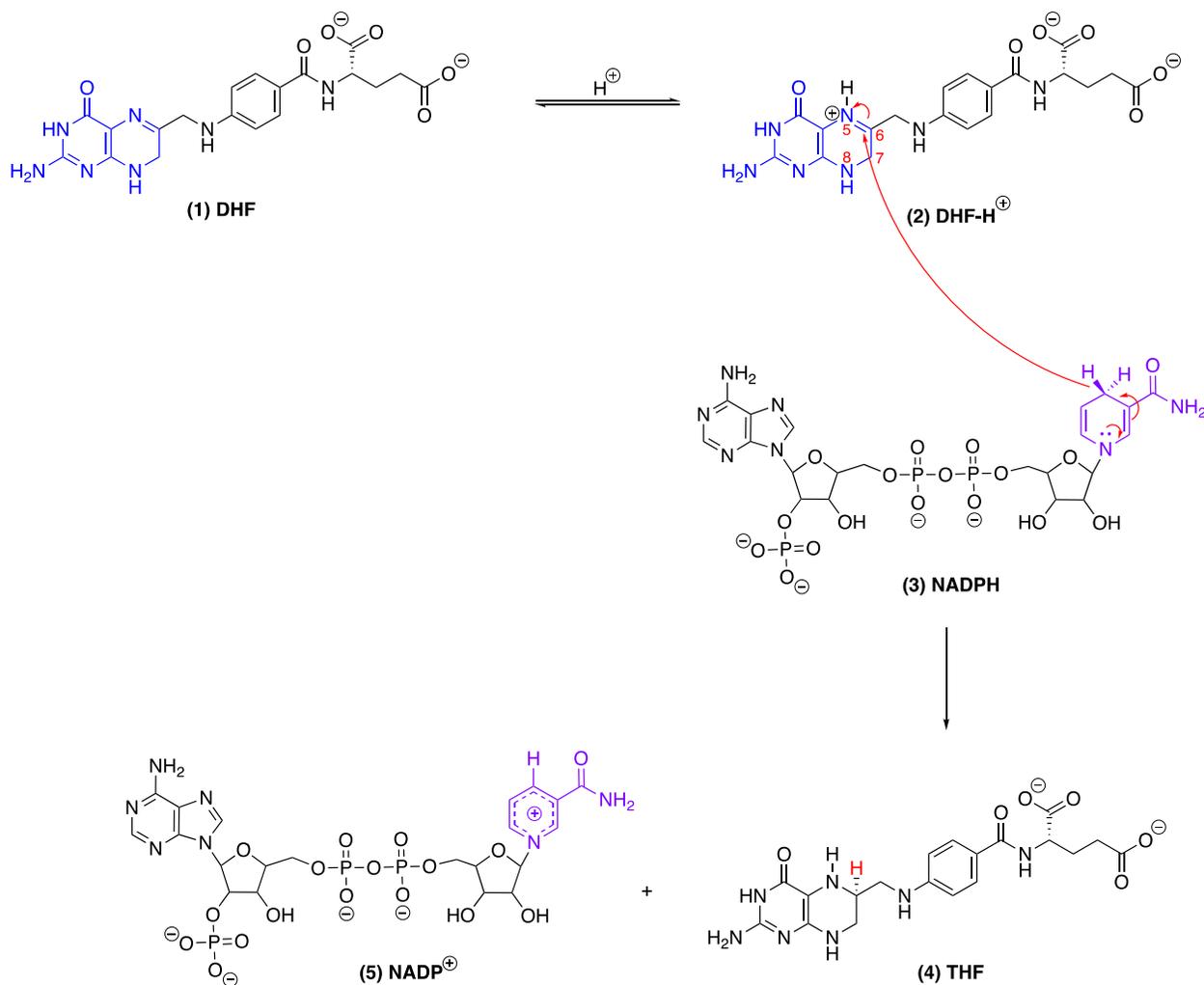


Figure 1.4. Réaction générale de réduction enzymatique du DHF. (1) La portion ptérine du dihydrofolate (DHF) est d'abord protonée sur N5, soit par l'enzyme dans le cas des Fola bactériennes ou des Dfr dont la Dfr humaine (hDfr), ou par le milieu réactionnel dans le cas des DfrB. Le transfert stéréospécifique de l'hydrure du (3) NADPH au C6 de l'imine réductible du (2) DHF-H⁺ produit le (4) tétrahydrofolate (THF) et le (5) NADP⁺. La portion ptérine du DHF est représentée en bleu, la portion nicotinamide du NADPH est représentée en mauve.

Le THF ainsi produit agit comme donneur de carbone et possède plusieurs rôles essentiels à la prolifération cellulaire des bactéries. Par exemple, il est employé dans la synthèse des précurseurs d'ADN, soient les purines et le dTMP. De plus, il est utilisé dans la synthèse de certains acides aminés tels que la méthionine et l'histidine, de telle façon que la perturbation de la voie métabolique du folate par les antifolates est cytotoxique (17). La Fola de *E. coli* a une structure similaire à la hDfr (RMSD = 1,257 Å), démontrant leur lien évolutif. Cependant, ces enzymes ne partagent qu'une faible identité de séquence (25,7 %). Ces différences et son rôle essentiel dans la

prolifération bactérienne font de Fola une cible thérapeutique de choix pour le traitement d'infections bactériennes. Ainsi, l'inhibition efficace de la Fola microbienne par le TMP ($K_i \sim 20$ pM) provoque la mort cellulaire, permettant de contrôler la propagation des infections bactériennes. Ceci présente un avantage thérapeutique, puisque la hDfr ($K_i = 0,96 \mu\text{M}$) n'est pas affectée par le TMP aux concentrations administrées (23).

En plus de son utilisation clinique, le TMP est largement utilisé dans l'élevage de bétail et en pisciculture, causant la dissémination de grandes quantités de TMP dans l'environnement. La surutilisation de TMP aurait donc provoqué l'émergence d'une résistance contre cet antibiotique peu après son introduction sur le marché (24). Ainsi, la résistance au TMP peut s'être produite par le biais de mutations du gène *folA*, permettant d'augmenter les niveaux d'expression ou diminuer l'affinité de liaison entre le TMP et la Fola (20). Par exemple, certaines mutations sont effectuées à l'extérieure de la région codante, permettant l'augmentation d'expression du gène encodant la Dfr. De plus, la dissémination de la résistance s'est principalement faite par des EGM, tels que les intégrons, contenant des gènes résistants au TMP, nommés *dfr* (20). Parmi les *dfr*, nous nous penchons sur l'émergence des dihydrofolate réductases de type B (DfrB), des enzymes intrinsèquement résistantes au TMP. Il existe également les DfrA, une famille d'enzyme résistante au TMP et homologue à *E. coli* Fola, grandement retrouvé dans des échantillons cliniques; toutefois, cette famille d'enzyme ne sera pas abordée dans cet ouvrage.

1.2 – Les dihydrofolate réductases de type B (DfrB)

1.2.1 – La relation structure-activité de la DfrB1

La famille d'enzymes DfrB, initialement identifiée par la découverte du gène *dfrB1* sur un plasmide peu après l'introduction du TMP sur le marché, ne partage aucune homologie génétique ou structurale avec la Fola de *E. coli* (figure 1.5) (25). Les DfrB ont évolué indépendamment des Fola. Bien que ces deux familles de Dfr catalysent la même réaction de réduction, les DfrB sont 100× moins efficaces, soit avec un k_{cat} de $1,3 \text{ s}^{-1}$ chez la DfrB1 par rapport à 238 s^{-1} chez Fola de *E. coli* (26). Chez les Fola, la protonation du DHF implique un résidu protonable. L'interaction du résidu Asp27 de la Fola avec une molécule d'eau environnante permet de stabiliser la protonation de l'atome N5 du DHF (27). De plus, l'environnement enzymatique augmente le pK_a de l'atome N5 du DHF de 2,5 à 6,5 lorsque le complexe tertiaire (NADPH•E•DHF) est formé (26). Cette

interaction favorise par la suite le transfert d'hydrure du NADPH à l'atome C6 du DHF au pH physiologique (26).

L'absence d'un résidu donneur de proton au site actif des DfrB oblige la protonation du DHF par le milieu réactionnel. Toutefois, l'équilibre de protonation au pH physiologique de l'atome N5 du DHF est défavorable car son pK_a demeure à 2,5 lorsque lié à la DfrB (26). Néanmoins, l'activité enzymatique des DfrB est suffisante pour assurer la survie bactérienne en cas d'une inactivation de la FoaA par le TMP.

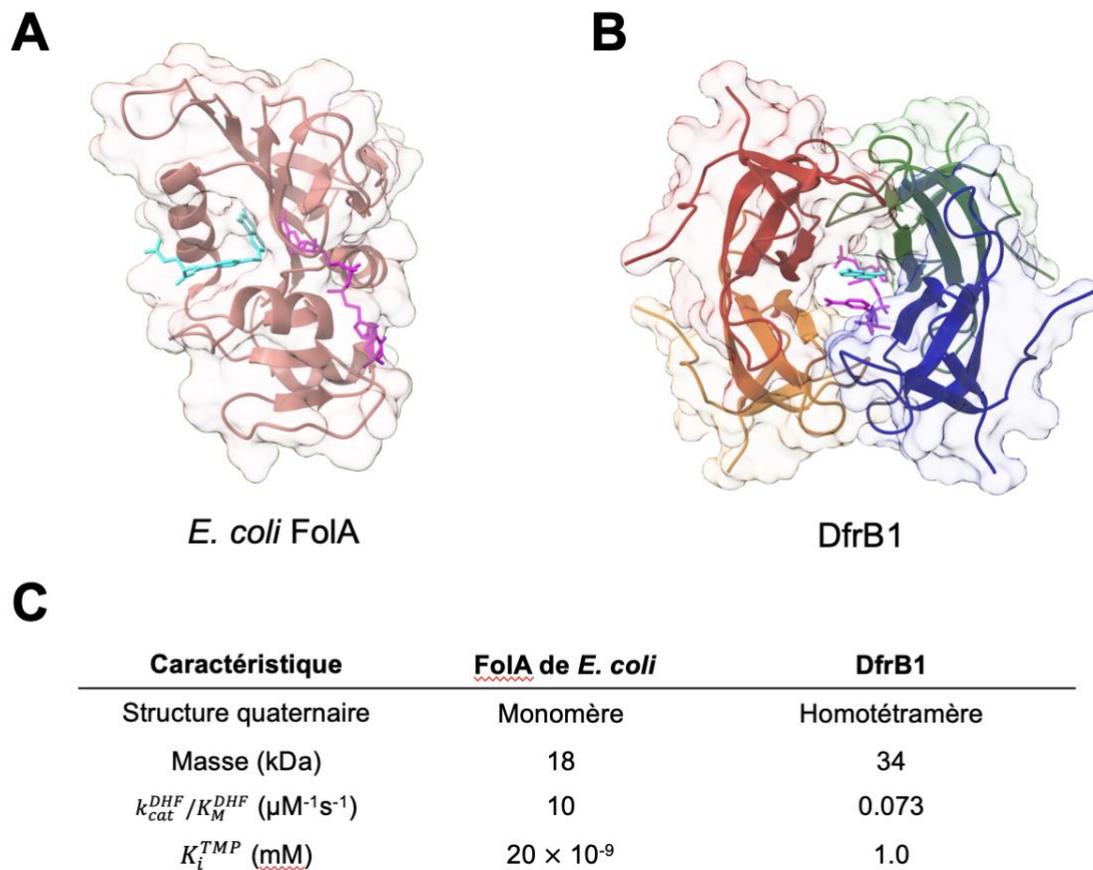


Figure 1.5. Structures de la dihydrofolate réductase chromosomale bactérienne (FoaA de *E. coli*) et la DfrB1. A) Structure tridimensionnelle de FoaA de *E. coli* (PDB 4RGC). L'acide folique (analogue du substrat DHF) est représenté en cyan et le NADPH en magenta. B) Structure tridimensionnelle de l'homotétramère DfrB1 (PDB 2RK1). L'homotétramère est formé de 4 monomères identiques (orange, rouge, vert et bleu). DHF représenté en cyan; NADPH représenté en magenta. La queue pABA-Glu du DHF n'a pas été résolue en raison de mouvements dynamiques. Structures préparées avec UCSF ChimeraX (version 1.4). C) Caractéristiques structurales (28) et cinétiques (21) de la FoaA de *E. coli* et de la DfrB1.

Parmi les 10 membres connus de la famille des DfrB, l'enzyme DfrB1 est la seule dont la structure a été résolue (29). La DfrB1 est un homotétramère de 34 kDa, ayant un site actif unique et symétrique en sa cavité centrale qui est d'une longueur de 25 Å (30). Chaque monomère est composé d'un domaine SH3-like, soit 78 acides aminés hautement conservés formant un tonneau de cinq brins β antiparallèles (figure 1.6) (30).

La présence d'un seul site actif formé simultanément par quatre monomères d'une enzyme est inhabituelle. Dans ce cas-ci, la mutation d'un résidu engendre 4 mutations simultanées (une par monomère) dans le site actif, pouvant causer un désavantage au niveau de la liaison des substrats, la stabilité protéique ou la catalyse enzymatique (31).

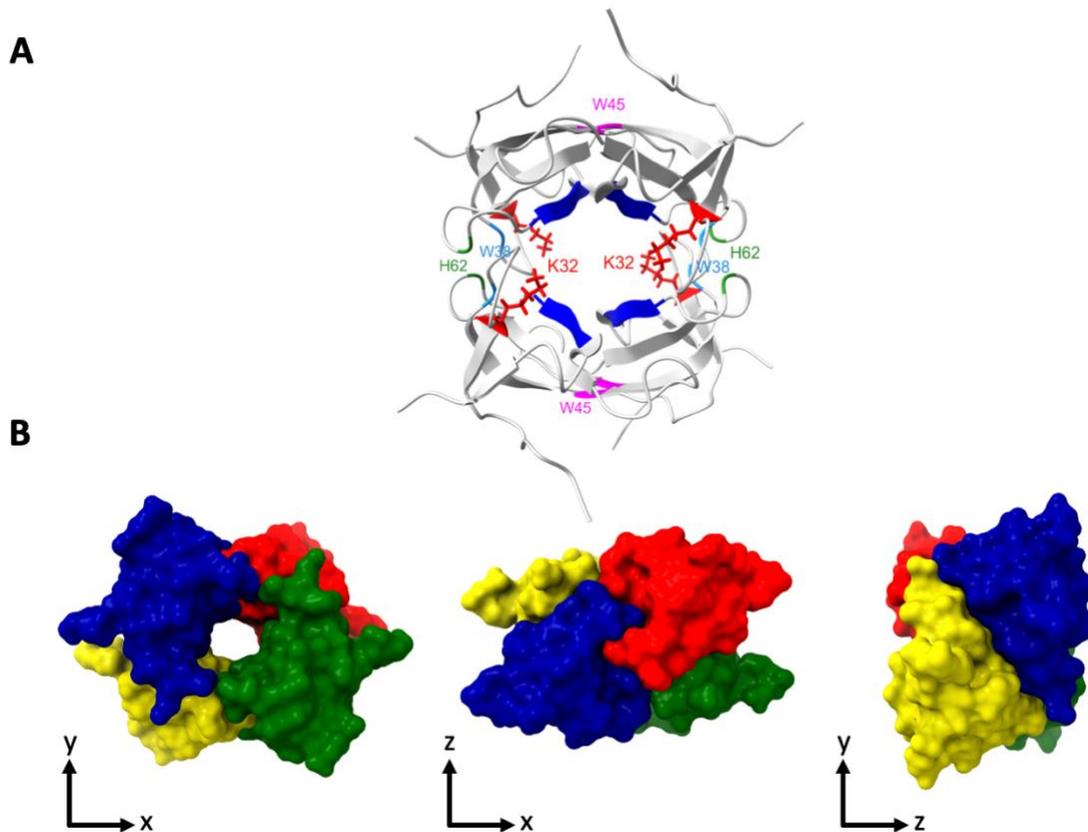


Figure 1.7. La symétrie 222 produite par la tétramérisation des monomères, et certains résidus impliqués dans la liaison du DHF et du NADPH au site actif. A) Les résidus essentiels de la DfrB1 (PDB 1VIE) pour la liaison des substrats. La tétrade catalytique (Val66, Glu67, Ile68 et Tyr69) est représentée en bleu foncé, sous forme de ruban, les Lys32 sont représentées en bâtonnets rouges, les résidus His62 sont représentés en vert et les Trp38 et Trp45 sont représentés en bleu clair et magenta respectivement, sous forme de ruban. B) Représentation graphique de la symétrie 222 selon les coordonnées cartésiennes x, y et z. Chacun des quatre monomères identiques est représenté par une couleur différente. Figure préparée avec UCSF ChimeraX (version 1.4).

Au contraire de la FoaA qui possède un site de liaison distinct pour chacun des deux substrats (figure 1.5), la symétrie du site de liaison de la DfrB1 permet au NADPH et au DHF d'y pénétrer sans distinction à partir de l'une ou l'autre des bouches identiques de la cavité (figure 1.7). Ainsi, l'association unique des monomères produit une symétrie 222 au site actif de la DfrB1. La symétrie

222 démontre que pour chaque site de liaison, il existe trois sites reliés par la symétrie démontrés par une rotation de 180° selon les axes x, y et z; ceci forme l'unique site de liaison des substrats (figure 1.7) (30). Seuls deux composés peuvent être accommodés à l'intérieur du site actif, en raison de l'espace limité. Ainsi, cette cavité peut former des complexes « non productifs » lorsque deux molécules de NADPH (E•2NADPH) ou deux molécules de DHF (E•2DHF) se lient simultanément dans le site actif (figure 1.8). La formation du complexe « productif » E•NADPH•DHF est toutefois favorisé car la liaison du NADPH ($K_{d1} = 2,5 \mu\text{M}$) favorise la liaison subséquente du DHF ($K_M = 4,2 \mu\text{M}$) par coopérativité positive (32). Ainsi, on note que ces constantes sont plus favorables que celles caractérisant la formation des complexes non-productifs (figure 1.8).

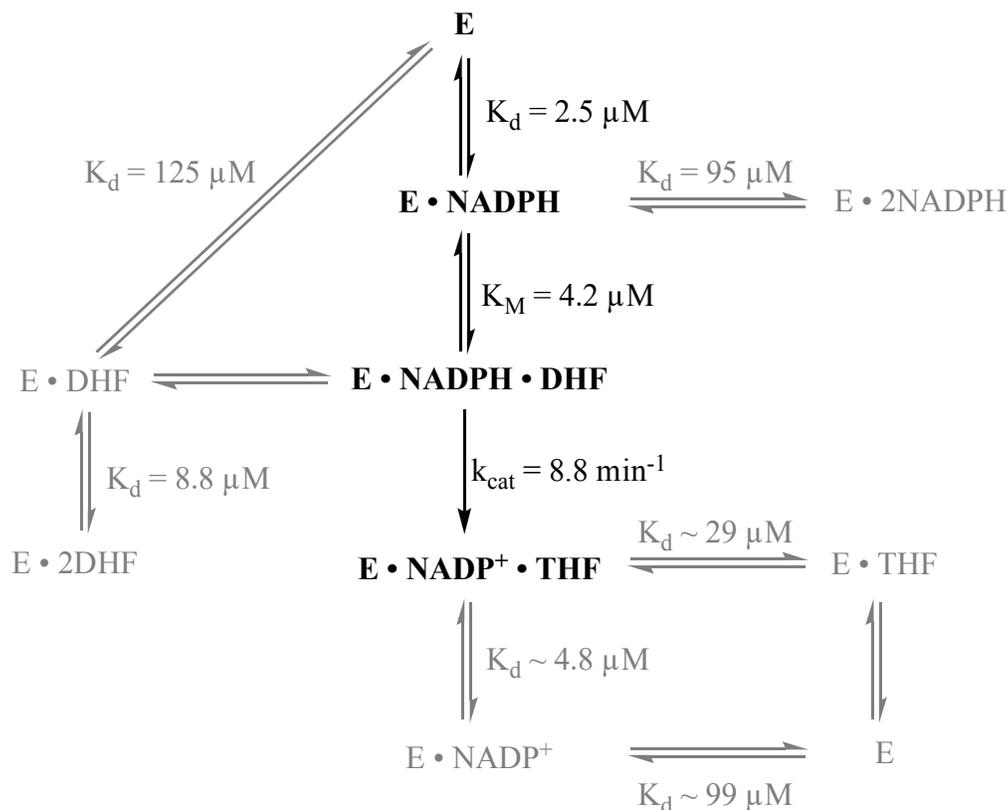


Figure 1.8. Schéma de liaison des composés impliqués dans la réaction de réduction de la DfrB1. La réaction favorisée est représentée en gras : la liaison du NADPH en premier lieu est favorisée, suivi de la liaison du DHF. La formation des complexes « non productifs » est représentée en gris. Les valeurs de K_d ont été déterminées par titration calorimétrique isotherme (ITC). Figure inspirée de la référence (28).

La formation du complexe productif est principalement déterminée par la tétrade catalytique composée des acides aminés Val66, Gln67, Ile68 et Tyr69, nommée « motif VQIY » (figure 1.6) (22). Formant ensemble la paroi interne du tunnel, les quatre motifs relativement hydrophobes VQIY orientent en *endo* la portion nicotinamide du NADPH relativement à la portion ptérine du DHF, offrant une distance et une orientation relative qui favorisent le transfert stéréospécifique d'hydrure (32). Un réseau de ponts d'hydrogène engendré par deux paires de résidus Gln67-Tyr69 du motif VQIY emprisonne les substrats au site actif, favorisant la catalyse (32). Aussi, les résidus Lys32, retrouvés de manière symétrique aux deux entrées identiques du tunnel (figure 1.7), forment des liens ioniques avec les groupements phosphates du NADPH à l'une des entrées et avec les deux groupements carboxylates de la queue glutamate du DHF à l'autre entrée (33).

La faible affinité entre la DfrB1 et le TMP ($K_i \sim 1 \text{ mM}$) s'explique par l'absence d'acides aminés chargés dans le site actif relativement hydrophobe de la DfrB1. Ceci empêche toute interaction électrostatique avec le TMP protoné, tel qu'observé lors de l'inhibition de la Fola de *E. coli* par le TMP (28). L'absence de charge négative sur le TMP, au contraire du DHF et du NADPH, empêche également l'établissement d'interactions électrostatiques avec les résidus Lys32 aux deux entrées du tunnel (32). De plus, l'absence d'un groupement amide sur le TMP empêche la formation de ponts d'hydrogène avec le résidu Ile68 du site actif de la DfrB1, comme le fait le NADPH. Ainsi, l'absence d'interactions spécifiques entre le TMP et la DfrB1 fait d'elle une enzyme hautement résistante à cet antibiotique (21).

1.2.2 – L'origine évolutive inconnue des DfrB

L'origine évolutive de la famille DfrB n'a pas été examinée, ni leur prévalence et émergence dans des échantillons cliniques et environnementaux (29). Afin d'obtenir un aperçu plus éclairé sur les DfrB, une étude génomique a été effectuée au laboratoire Pelletier en analysant les séquences publiques disponibles contenant les gènes *dfrB*. Dans cette étude, 61 différentes séquences génomiques, contenant le gène *dfrB*, ont été identifiées dans des échantillons cliniques (74 %), environnementaux et de sources inconnues (25 %), ce qui a permis de conclure que cette famille d'enzyme est répandue mondialement. De plus, ces séquences ont toutes été identifiées à proximité d'au moins un gène de résistance (83 % des séquences sont à proximité d'au moins 3 gènes de résistance), et se situent à proximité d'éléments génétiques mobiles permettant de transférer les gènes d'une bactérie à une autre (29). Il est donc important de suivre l'émergence et la prévalence

de cette famille d'enzymes afin de bâtir un aperçu plus précis sur la résistance au TMP. De plus, l'étude évolutive est la première étape pour développer une manière de traiter les infections bactériennes qui contiennent ces gènes de résistance rendant inefficace le TMP.

1.2.3 – Les homologues distants des DfrBs

Le fait d'avoir peu d'information au sujet de la famille DfrB sur leur émergence, leur prévalence et sur l'apparition de résistance, nous encourage à aborder leur trajectoire évolutive. L'identification et la caractérisation d'homologues de séquence protéique des DfrB, soit les DfrB-H (pour homologues des DfrB), permettent d'obtenir plus d'information sur ces domaines SH3-*like* hautement conservés et importants, retrouvé chez les DfrB. En effet, Lemay-St-Denis *et al.* (en révision) ont identifié 28 séquences protéiques homologues à la DfrB1, comportant toutefois des domaines protéiques supplémentaires au domaine SH3-*like*. Parmi ces séquences, cinq séquences putatives possédant 10 à 80 % d'homologie de séquence globale avec la DfrB1 ont été exprimées; quatre de ces DfrB-H possédaient de l'activité Dfr et de la résistance au TMP. Ainsi, une caractérisation détaillée de leurs propriétés est nécessaire, puisque rien n'est connu au sujet de ces premiers homologues distants des DfrB jusqu'à présent.

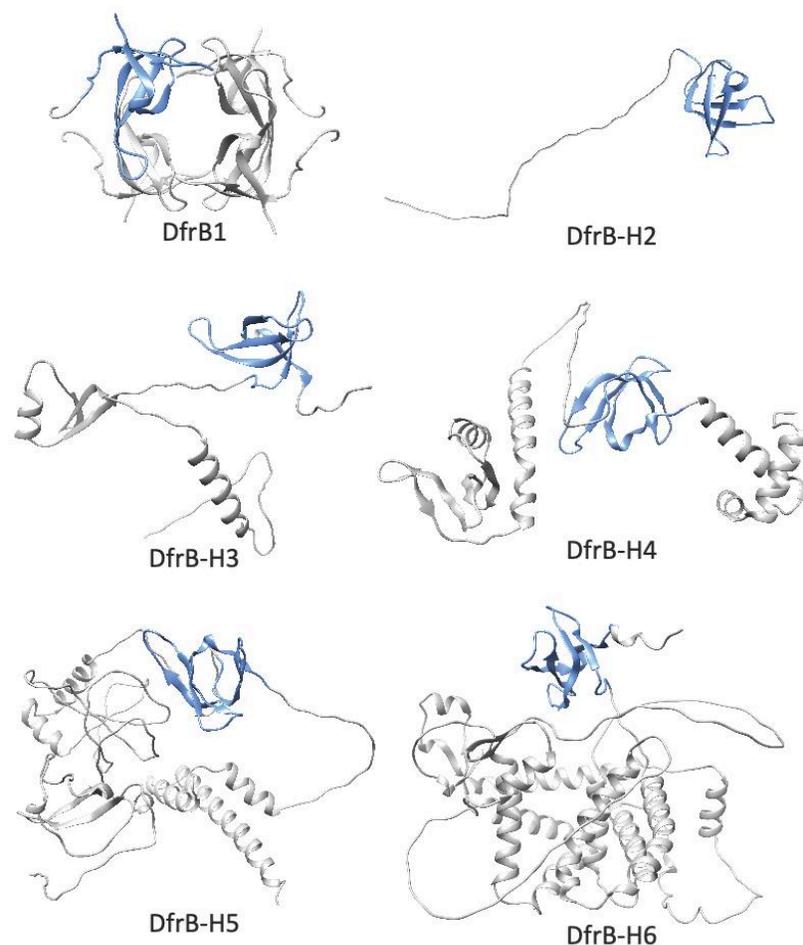


Figure 1.9. Homologues distants de la famille DfrB. DfrB1 (PDB : 1VIE), domaine SH3-*like* représenté en bleu et 5 séquences homologues putatives (DfrB-H) prédites par ColabFold (Lemay-St-Denis *et al.*, en révision).

1.2.4 – Inhibition des DfrB

Tel que discuté ci-dessus, la prévalence des DfrB et de leurs homologues DfrB-H est méconnue et sous-estimée en raison du manque de suivi malgré que les DfrB soient retrouvées dans un contexte de pathogénicité et de multirésistance (29). La conception de molécules pouvant inhiber spécifiquement ces familles de dihydrofolate réductases résistantes au TMP s'avère nécessaire, afin de ralentir et d'agir contre cette facette particulière de la résistance au TMP.

La novobiocine, un inhibiteur de l'ADN gyrase et le rouge congo, un colorant diazoïque, furent les premiers inhibiteurs découverts pour les DfrB ($K_i = 70 \mu\text{M}$ et $2 \mu\text{M}$ respectivement) (28). Les deux inhibent de manière non-spécifique la DfrB1(28). La novobiocine inhibe compétitivement la

gyrase d'ADN bactérienne (famille des ADN topoisomérases de type II). La novobiocine cible la sous-unité GyrB de l'enzyme, impliquée dans le transfert d'énergie essentiel à sa fonction de surenroulement négatif de l'ADN requis lors de la réplication du chromosome circulaire microbien (34). En raison d'une faible efficacité thérapeutique et d'un poids moléculaire élevé (612 g/mol), ce médicament ne fut pas retenu dans le design d'inhibiteur pour la DfrB1.

Quant à lui, le rouge congo est un colorant organique diazoïque, grandement utilisé en microscopie pour des coupes histologiques. Toutefois, ce composé est désormais peu utilisé sur le marché en raison d'une toxicité élevée. En effet, ce composé aurait un effet néfaste sur la fertilité, le développement humain et serait carcinogène (35). Malgré que ces deux composés ne soient pas utilisés en milieu clinique et qu'ils n'ont aucune ressemblance structurelle avec ni le NADPH ni le DHF, ils ont permis d'obtenir des informations structurelles pertinentes dans le design d'inhibiteurs, tel que décrit ci-dessous (36).

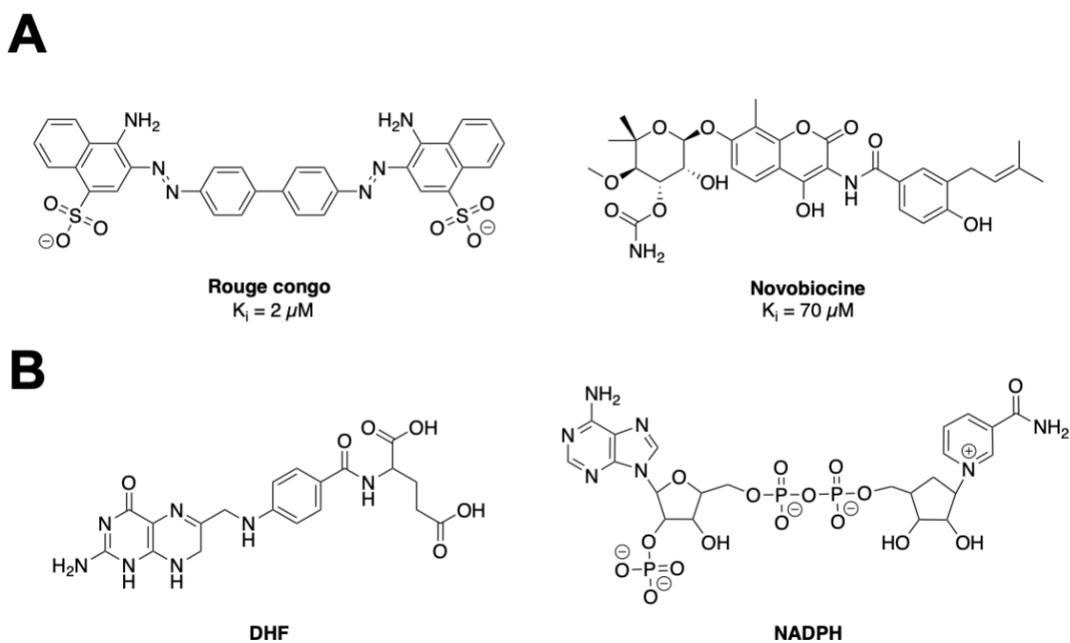


Figure 1.10. Inhibiteurs non-spécifiques et substrats de la DfrB1. A) Les deux inhibiteurs connus et non-spécifiques de la DfrB1 servant de modèle dans le design d'inhibiteurs, le rouge congo ($K_i = 2 \mu\text{M}$) et la novobiocine ($K_i = 70 \mu\text{M}$). B) Les substrats nécessaires pour la réaction de réduction du dihydrofolate.

Les extrémités chargées négativement sur le rouge congo pourraient reproduire les interactions électrostatiques retrouvées entre le groupement glutamate du DHF et les phosphates du NADPH avec les résidus Lys32 à l'entrée du site actif (36). D'un autre côté, les cycles aromatiques constituant ces deux composés pourrait imiter les interactions d'empilement observées lors de la liaison du NADPH et du DHF au site actif. De plus, la partie centrale hydrophobe du rouge congo pourrait être un atout pour un inhibiteur étant donné l'hydrophobie du site actif de la DfrB1. Finalement, la symétrie du rouge congo ainsi que sa longueur sont le reflet du site actif symétrique de la DfrB1 (36).

1.2.5 – Découverte d'inhibiteurs de la DfrB1

À ce jour, le groupe Pelletier est le seul à avoir publié des travaux sur le développement d'inhibiteurs spécifiques aux DfrB. Trois approches ont été utilisées, soient le design à base de fragments, l'approche par relation activité-structure (SAR) et la création d'inhibiteurs à doubles cibles.

Le design à base de fragments a été effectué en criblant environ 100 petites molécules disponibles commercialement, majoritairement constituées de cycles aromatiques possédant les hétéroatomes azote (N) et oxygène (O), pour imiter les groupements ptérine et nicotinamide du DHF et du NADPH respectivement (36). De faibles inhibiteurs de la DfrB1 y ont été identifiés (IC_{50} entre 1,7 et 17 mM). Parmi ces molécules, l'acide 1H-benzimidazole-5-carboxylique (fragment **4**) a été sélectionné comme 'fragment' de départ puisqu'il possédait des valeurs d'inhibition IC_{50} et K_i semblables aux autres fragments, mais démontrait une meilleure sélectivité (figure 1.11A et 1.11B) en inhibant plus faiblement la hDfr (activité relative hDfr 75%, figure 1.11B). Dans l'optique d'augmenter son affinité, des molécules de poids moléculaire plus élevé, symétriques et complexes furent conçues et synthétisées, à partir de deux molécules du fragment **4** reliées par des espaceurs hydrophobes de longueurs variables (figure 1.11C). Basé sur le fait que le site actif de la DfrB1 est symétrique, l'hypothèse fut posée que des inhibiteurs symétriques pourraient augmenter l'affinité de ces dernières envers ce site actif spécifique. Deux inhibiteurs symétriques de type bisbenzimidazole ont été retenus, soit les molécules **8** et **9** (figure 1.11C) en raison d'une sélectivité (activité relative hDfr 95 %) et d'une puissance améliorée (IC_{50} de 64 et 130 mM respectivement) (Figure 1.11D) (36).

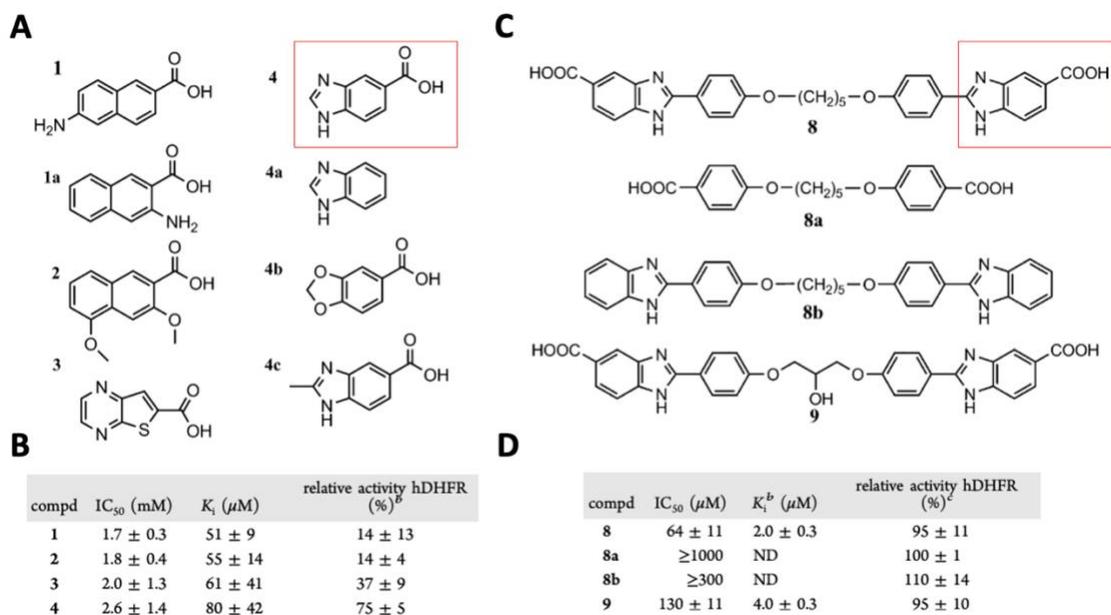


Figure 1.11. Évolution de la découverte d'inhibiteurs par design à base de fragments. La molécule de départ pour la formation des inhibiteurs symétriques est l'acide 1H-benzimidazole-5-carboxylique (**4**), représenté dans l'encadré rouge. **A)** Les fragments de départ criblés. **B)** Valeurs d'inhibition obtenues IC₅₀, K_i et activité relative de la hDfr (%) respectifs aux fragments. **C)** Inhibiteurs symétriques de type bisbenzimidazole contenant deux molécules **4** (encadré rouge), reliées par un espaceur de longueur variable. **D)** Valeurs d'inhibition (IC₅₀, K_i) et activité résiduelle relative de la hDfr (%) respectives aux bisbenzimidazoles. Figure modifiée à partir de la référence (36).

En raison de leur efficacité modeste, les inhibiteurs **8** et **9** ont été a posteriori optimisés à l'aide du concept relation activité-structure (SAR, *structure activity-relationship*). L'idée était de déterminer une relation entre les groupements chimiques constituant ces composés et l'activité relative de la DfrB1; le tout dans le but d'améliorer la puissance, l'efficacité et la sélectivité des inhibiteurs contre la DfrB1. Ainsi, des analogues aux composés **8** et **9** ont été synthétisés afin d'évaluer l'importance des différents groupements chimiques spécifiques (37). À l'aide de l'analyse SAR, il a été possible de déterminer que la substitution des groupements carboxyliques terminaux (figure 1.12A) sont importants pour l'inhibition de la DfrB1, en raison de leurs interactions électrostatiques avec les Lys32 aux deux entrées du site actif (37). De plus, la longueur des espaceurs centraux (figure 1.12A) influence directement l'interaction simultanée des groupements carboxyliques à chaque entrée du site actif (37). Cependant, les charges négatives des groupements carboxyliques peuvent influencer la perméabilité de l'inhibiteur, dû aux forces de répulsion entre les carboxyles et la

membrane cellulaire hydrophobe. Pour confirmer cette hypothèse, l'estérification des carboxyles a été évaluée puisqu'elle neutralise réversiblement les charges négatives; les esters seront subséquentement hydrolysés par les estérases intracellulaires afin de libérer l'inhibiteur actif (38). Toutefois, l'estérification contribue à une diminution importante de la solubilité aqueuse de l'inhibiteur, ce qui empêche d'évaluer son efficacité (36). De futures modifications de structure devront être entreprises pour contrer ce problème. Par exemple, l'ajout de charges positives permettrait d'améliorer la pénétrance cellulaire et la solubilité aqueuse des composés mais pourrait empêcher l'interaction bénéfique avec les Lys32.

Au fil des travaux, des données cristallographiques et des analyses cinétiques ont permis de déterminer que deux molécules d'inhibiteurs de type bisbenzimidazole interagissent simultanément dans le site actif de la DfrB1 (37). Le ratio stœchiométrique 2:1 (inhibiteurs/DfrB1) engendre un coût entropique plus élevé, en raison du nombre d'interactions supérieures entre le site actif et les deux inhibiteurs. Pour tenter d'obtenir un ratio stœchiométrique idéal de 1:1, un analogue tétramérique sous forme de « X » a été synthétisé (figure 1.12B, composé **31**) (37). Ce dernier a démontré une puissance améliorée. Toutefois, en raison de son poids moléculaire élevé, ce composé peut avoir un désavantage selon « la règle des 5 » de Lipinski, décrite plus bas. Il peut conséquemment influencer la perméabilité cellulaire et la solubilité, ce qui peut donner des effets secondaires non désirables, si l'inhibiteur est administré en tant que médicament.

Brièvement, « la règle des 5 » de Lipinski stipule qu'un médicament efficace administré oralement doit respecter au minimum 3 parmi les 5 critères suivants : i) l'inhibiteur d'intérêt ne doit pas contenir plus de 5 liaisons hydrogènes donneurs, c'est-à-dire la quantité totale d'interactions (N-H et/ou O-H) doit être inférieure ou égale à 5; ii) le composé doit comporter au maximum 10 liaisons hydrogènes accepteurs, soit tous les atomes d'oxygènes et d'azotes; iii) la masse moléculaire doit être inférieure à 500 Daltons (Da); iv) le LogP, soit le coefficient de partage octanol/eau, ne doit pas excéder 5. Ce coefficient permet d'évaluer l'hydrophobicité de l'inhibiteur, en évaluant son rapport de solubilité dans l'eau et l'octanol (39); v) la flexibilité du substrat (degré de liberté) doit être inférieur ou égal à 5 (39). Il est important à noter que plusieurs exceptions sont retrouvées; de nombreux inhibiteurs ne se soustraient pas à « la règle des 5 » de Lipinski, notamment les macrolides et peptides thérapeutiques (40). Un nombre croissant de molécules utilisées en milieu clinique possèdent un poids moléculaire plus élevé que 500 Da. Le sulfate de néomycine, un

antibiotique d'une masse moléculaire d'environ 615 Da, est utilisé pour diminuer les risques d'infections de micro-organismes anaérobiques (41).

Ainsi, afin d'améliorer l'effet entropique du composé bisbenzimidazole en forme de X, un composé d'un poids moléculaire réduit fut synthétisé en forme de « V » (figure 1.12B, composé **33**). Ce composé a permis d'obtenir des valeurs de K_i similaires envers la DfrB1 ($K_i = 7,4 \pm 2,7 \mu\text{M}$) aux inhibiteurs bisbenzimidazoles **8** et **9** ($K_i 2,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et $4,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ respectivement) (36, 37). Fait à noter, le laboratoire Pelletier a également confirmé l'inhibition de la DfrB4, un autre membre de la famille des DfrB, avec 5 inhibiteurs de la DfrB1 (37). Étant donné la forte conservation de séquence parmi tous les membres de cette famille et la similarité des valeurs d'inhibition (K_i) entre la DfrB1 et la DfrB4 (21), l'hypothèse que le développement d'inhibiteurs de la DfrB1 servira à inhiber tous les membres de la famille peut être posée. De plus, les résidus catalytiques du site actif et ceux présents à l'entrée du site actif qui ont démontré de l'interaction avec les inhibiteurs sont conservés chez tous les membres (figure 1.6B).

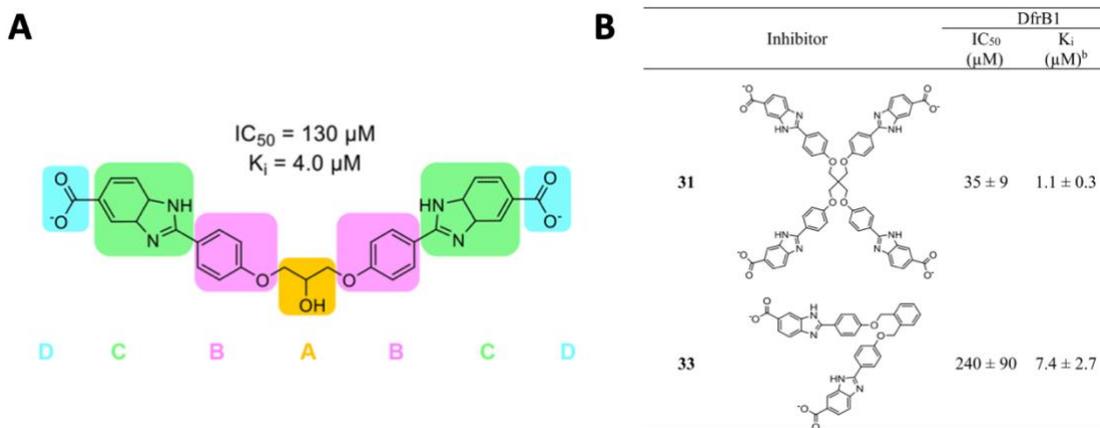


Figure 1.12. Méthode SAR afin d'optimiser les inhibiteurs de type bisbenzimidazole et optimisation du coût entropique. **A)** Substitution des différents groupements formant l'inhibiteur : A) Partie centrale, B) Portion phénoxy-, C) Portion benzimidazole, D) Portion carboxylate. **B)** Analogues d'inhibiteurs symétriques de type bisbenzimidazole en forme de « X » et en forme de « V », avec valeurs d'inhibition IC_{50} et K_i . Figures provenant de la référence (37).

Un second type d'inhibiteur de la DfrB1 a également été conçu dans le laboratoire Pelletier: les bisubstrats, des inhibiteurs à double cibles. Ces derniers peuvent être formés à l'aide de deux pharmacophores, reliés par un espaceur, où chacun interagit directement avec une cible précise

(42). Dans le cas présent, les bisubstrats imitent les deux substrats essentiels de la DfrB1 afin d'occuper complètement le site actif de l'enzyme. Ces bisubstrats sont optimisés pour une meilleure reconnaissance pour maximiser leurs liaisons au site actif et par le fait même, l'inhibition. De plus, l'objectif était de développer et d'optimiser des bisubstrats pouvant à la fois inhiber la DfrB1 et l'enzyme procaryote pyrophosphokinase de 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine (HPPK), également essentielle dans la voie de biosynthèse du folate (figure 1.2) (21). Alors que la DfrB1 qui utilise le DHF comme substrat et le NADPH comme cofacteur, la HPPK utilise un dérivé du DHF, soit le 6-hydroxyméthyle-7,8-dihydroptérine (DHP) et l'ATP comme cofacteur, une molécule à base d'adénosine (21). Ainsi, on a investigué la capacité des inhibiteurs bisubstrats connus de la HPPK à inhiber la DfrB1. Ces bisubstrats se révèlent être inhibiteurs de la DfrB1, avec des valeurs de K_i semblables à celles de HPPK, soit une inhibition dans l'ordre du micromolaire (μM) (figure 1.13B) (21).

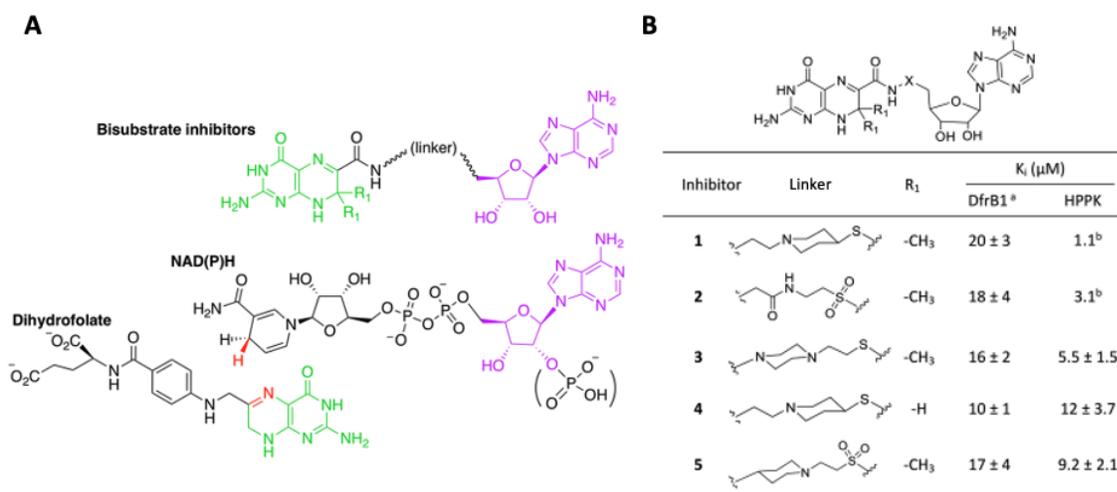


Figure 1.13. Représentation des inhibiteurs bisubstrats et des valeurs d'inhibition obtenues.

A) Le groupement ptérine imitant le DHF est représenté en vert et le groupement nicotinamide imitant le NAD(P)H est représenté en mauve. **B)** Valeurs d'inhibition (K_i) obtenues des divers espaceurs (« linker ») formant les bisubstrats envers la DfrB1 et la HPPK respectivement.

Il est à noter que la DfrB1 utilisée dans ces études comportait une étiquette poly-histidine (6' His) à son extrémité N-terminale. Afin d'évaluer l'impact possible de ces étiquettes sur les valeurs obtenues, les essais d'inhibition ont été subséquemment répétés sans présence d'étiquette. Les valeurs de K_i obtenues pour la DfrB1 sans étiquette ont démontré que cette dernière influence l'inhibition, en augmentant d'au moins 8 fois les valeurs de K_i (21). En effet, étant donné que le

monomère ne comporte que 78 acides aminés, l'ajout de cette étiquette de 6 résidus His influence significativement la masse et la taille de la protéine. De plus, au pH physiologique, cela ajoute 24 charges positives par tétramère d'enzyme; il n'est donc pas surprenant que l'étiquette améliore la liaison des inhibiteurs possédant des charges négatives aux extrémités.

En raison de cette observation, la caractérisation des DfrB1 sans étiquette poly-histidine est préférable pour obtenir des valeurs d'inhibition plus réalistes. Finalement, cette approche a permis de conclure que certains inhibiteurs peuvent inhiber de manière satisfaisante deux cibles dans la même voie métabolique. L'optimisation de ces inhibiteurs est prometteuse pour tenter de ralentir la résistance des bactéries, en administrant à la fois le TMP pour inhiber la Fola, ubiquitaire chez les bactéries, et un inhibiteur bisubstrat qui inhibe conjointement les DfrB et HPPK. Cette approche s'avère prometteuse pour cibler la voie métabolique des folates chez les bactéries.

Étant donné la conservation des résidus importants des DfrB (figure 1.6), l'activité Dfr et la résistance au TMP, il est impératif de mieux caractériser le profil d'activité des DfrB et leur homologues (DfrB-H), ainsi que leur inhibition.

1.3 – L'hypothèse de ce mémoire

L'hypothèse de ce mémoire propose que la caractérisation de l'activité, de l'inhibition et de la thermostabilité des homologues et des DfrB permettra de mieux comprendre le contexte évolutif de ces enzymes dans un contexte de résistance aux antibiotiques. Le chapitre 2 examinera l'activité enzymatique et la résistance au TMP de 10 nouveaux membres de la famille des DfrB en établissant une méthode n'exigeant pas la purification des protéines. Le chapitre 3 abordera l'inhibition en tentant d'identifier de nouveaux inhibiteurs des DfrB à l'aide de méthodes établies. Le chapitre 4 portera sur la caractérisation de la thermostabilité des DfrB et de leurs homologues afin de déterminer si cette propriété physico-chimique est conservée à travers ces protéines. Le chapitre 5 mettra en place un essai d'activité plus sensible permettant de caractériser l'activité de variants DfrB qui sont faiblement exprimés. Le chapitre 6 présente la conclusion des travaux.

Références du chapitre 1

1. Grave K, Torren-Edo J, Mackay D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(9):2037-40.
2. Ghoul M, Mitri S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol.* 2016;24(10):833-45.
3. Thaker MN, Wright GD. Opportunities for Synthetic Biology in Antibiotics: Expanding Glycopeptide Chemical Diversity. *ACS Synth. Biol.* 2015;4(3):195-206.
4. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 2017;33(3):300-5.
5. O'Brien TJ, Figueroa W, Welch M. Decreased efficacy of antimicrobial agents in a polymicrobial environment. *ISME J.* 2022;16(7):1694-704.
6. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 1997;24:S19-45.
7. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New β -Lactamases. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(4):380-91.
8. Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect. Drug Resist.* 2019;12:3903-10.
9. Bottery MJ, Pitchford JW, Friman V-P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *ISME J.* 2021;15(4):939-48.
10. Munita JM, Arias CA, Kudva IT, Zhang Q. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 2016;4(2):4.2.15.
11. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482-501.
12. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018;16(9):523-39.
13. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(4):a025387-a.
14. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004;28(5):519-42.
15. Wistrand-Yuen E, Knopp M, Hjort K, Koskiniemi S, Berg OG, Andersson DI. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nat. Commun.* 2018;9(1):1599.
16. Ma L, Li AD, Yin XL, Zhang T. The Prevalence of Integrons as the Carrier of Antibiotic Resistance Genes in Natural and Man-Made Environments. *Environ. Sci. Technol.* 2017;51(10):5721-8.
17. Wright DL, Anderson AC. Antifolate agents: a patent review (2006 - 2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2011;21(9):1293-308.
18. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The antifolates. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2012;26(3):629-48, ix.
19. Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012;11(10):751-61.
20. Sánchez-Osuna M, Cortés P, Llagostera M, Barbé J, Erill I. Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim. *Microb. Genom.* 2020;6(11).
21. Toulouse JL, Shi G, Lemay-St-Denis C, Ebert MCCJC, Deon D, Gagnon M, et al. Dual-Target Inhibitors of the Folate Pathway Inhibit Intrinsically Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020;11(11):2261-7.

22. Schmitzer AR, Lépine F, Pelletier JN. Combinatorial exploration of the catalytic site of a drug-resistant dihydrofolate reductase: creating alternative functional configurations. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004;17(11):809-19.
23. Timchenko N. La dihydrofolate réductase R67, comme une cible d'antibiotiques et biocatalyseur potentiel [Mémoire]: Université de Montréal; 2011.
24. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(2):279-89.
25. Pattishall KH, Acar J, Burchall JJ, Goldstein FW, Harvey RJ. Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups. *J. Biol. Chem.* 1977;252(7):2319-23.
26. Deng H, Callender R, Howell E. Vibrational Structure of Dihydrofolate Bound to R67 Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 2001;276(52):48956-60.
27. Howell EE, Villafranca JE, Warren MS, Oatley SJ, Kraut J. Functional Role of Aspartic Acid-27 in Dihydrofolate Reductase Revealed by Mutagenesis. *Science.* 1986;231(4742):1123-8.
28. Howell EE. Searching sequence space: two different approaches to dihydrofolate reductase catalysis. *Chembiochem.* 2005;6(4):590-600.
29. Lemay-St-Denis C, Diwan S-S, Pelletier JN. The Bacterial Genomic Context of Highly Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases Highlights an Emerging Threat to Public Health. *Antibiotics.* 2021;10(4):433.
30. Narayana N, Matthews DA, Howell EE, Nguyen-huu X. A plasmid-encoded dihydrofolate reductase from trimethoprim-resistant bacteria has a novel D2-symmetric active site. *Nat. Struct. Biol.* 1995;2(11):1018-25.
31. Stinnett LG, Smiley RD, Hicks SN, Howell EE. "Catch 22," the effects of symmetry on ligand binding and catalysis in R67 dihydrofolate reductase as determined by mutations at Tyr-69. *J. Biol. Chem.* 2004;279(45):47003-9.
32. Krahn JM, Jackson MR, DeRose EF, Howell EE, London RE. Crystal Structure of a Type II Dihydrofolate Reductase Catalytic Ternary Complex. *Biochemistry.* 2007;46(51):14878-88.
33. Hicks SN, Smiley RD, Stinnett LG, Minor KH, Howell EE. Role of Lys-32 residues in R67 dihydrofolate reductase probed by asymmetric mutations. *J. Biol. Chem.* 2004;279(45):46995-7002.
34. Collin F, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;92(3):479-97.
35. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci Rep.* 2019;39(1).
36. Bastien D, Ebert MC, Forge D, Toulouse J, Kadnikova N, Perron F, et al. Fragment-based design of symmetrical bis-benzimidazoles as selective inhibitors of the trimethoprim-resistant, type II R67 dihydrofolate reductase. *J. Med. Chem.* 2012;55(7):3182-92.
37. Toulouse JL, Yachnin BJ, Ruediger EH, Deon D, Gagnon M, Saint-Jacques K, et al. Structure-Based Design of Dimeric Bisbenzimidazole Inhibitors to an Emergent Trimethoprim-Resistant Type II Dihydrofolate Reductase Guides the Design of Monomeric Analogues. *ACS Omega.* 2019;4(6):10056-69.
38. Ressler VT, Mix KA, Raines RT. Esterification Delivers a Functional Enzyme into a Human Cell. *ACS Chem. Biol.* 2019;14(4):599-602.
39. Roskoski R, Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol. Res.* 2020;152:104609.
40. Machado D, Girardini M, Viveiros M, Pieroni M. Challenging the Drug-Likeness Dogma for New Drug Discovery in Tuberculosis. *Front. Microbiol.* 2018;9:1367.

41. Arbid MS, Koriem KM, Asaad GF, Megahed HA. Effect of the antibiotic neomycin on the toxicity of the glycoside vicine in rats. *J. Toxicol.* 2013;2013:913128.
42. Guo ZR. [Strategy of molecular drug design: dual-target drug design]. *Acta pharm. Sin.* 2009;44(3):209-18.

Chapitre 2 – Caractérisation de l'activité enzymatique de nouvelles DfrB

2.1 Objectif du chapitre

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer si 10 nouveaux membres de la famille des DfrB possèdent des profils d'activité et de résistance au TMP semblables à la DfrB1. Afin d'accélérer la caractérisation de plusieurs nouvelles protéines en parallèle, nous avons mis en place un essai d'activité de DfrB qui ne nécessite pas la purification préalable de ces protéines. Cette méthode permet de déterminer l'activité enzymatique à partir de lysat clarifié de *E. coli* surexprimant les protéines, dans un format à haut-débit. Cette approche permettra de déterminer l'activité de nouvelles protéines DfrB par mesures spectrophotométriques, ainsi que leur résistance par essai de concentration minimale inhibitrice (CMI).

2.2 – Les essais enzymatiques

Les enzymes agissent en tant que catalyseurs naturels en augmentant la vitesse de réaction de manière importante. Divers essais enzymatiques peuvent être utilisés afin d'obtenir des données sur les différentes propriétés catalytiques des enzymes. Par exemple, il est possible d'effectuer des essais d'activité ou d'inhibition enzymatique en mesurant la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme en fonction de la concentration de substrat et la capacité de l'activité enzymatique à être moduler en présence de différentes molécules. Les effets de la variation de pH et de température sur l'activité enzymatique peuvent également fournir de l'information sur le type de résidus impliqué dans la catalyse ou la stabilité thermique de ces protéines (1). Ce type d'essais est largement utilisés en recherche, permettant d'améliorer les connaissances sur le fonctionnement des enzymes, les interactions possibles de ces dernières et les différentes molécules biologiques, etc. (2).

2.2.1 – Détermination de l'activité d'une enzyme

L'activité d'une enzyme est mesurée de façon *in vitro* selon des conditions généralement distinctes de celles retrouvées *in vivo*. L'intérêt de mesurer l'activité d'une enzyme *in vitro* est de déterminer la quantité d'enzyme présente selon des conditions précises, permettant de comparer l'activité entre

deux échantillons. Les conditions sont habituellement choisies afin d'observer une réaction enzymatique maximale, soit de définir le pH et la température optimale et d'utiliser des concentrations de substrats saturantes. Les différents facteurs pouvant affecter l'activité enzymatique sont la concentration des substrats, le pH, la salinité et la température (3). Ainsi, l'étude des différents facteurs pouvant influencer l'activité d'une enzyme permettra d'extrapoler l'activité attendue *in vivo* (3).

L'activité enzymatique se caractérise par le nombre de molécules de substrat converties par unité de temps (4). Ceci permet de mesurer l'efficacité catalytique d'une enzyme dans un essai selon des conditions définies. Plusieurs méthodes de détection des substrats et de produits de réaction existent afin de définir l'activité d'une enzyme *in vivo* et *in vitro*.

L'activité enzymatique peut être déterminée selon la vitesse initiale de la réaction. La vitesse initiale de la réaction correspond à la pente linéaire de la courbe de consommation de substrat en fonction du temps, avant l'atteinte du plateau, signifiant l'arrêt graduel de la conversion des substrats en produits alors que le substrat est consommé (5). Cette vitesse initiale peut être mesurée à l'aide des conditions Michaelis-Menten suivantes : la concentration de substrat [S] est largement plus élevée que la concentration d'enzyme [E] et la quantité de produit formé est négligeable (5).

En comparant les vitesses initiales en fonction d'une variation de concentrations de substrats, il est possible d'établir une courbe Michaelis-Menten (figure 2.1). Les constantes catalytiques d'une enzyme, telles que la constante de Michaelis (K_M) et la constante catalytique (le taux de roulement, k_{cat}) peuvent être ainsi déterminées.

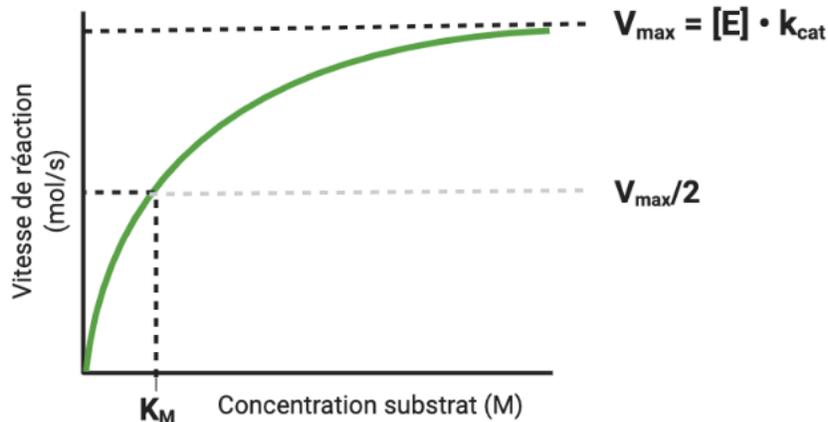


Figure 2.1. Graphique typique d'une courbe Michaelis-Menten. Courbe produite à l'aide de la vitesse de réaction en fonction de la variation de concentrations du substrat. L'atteinte du plateau représente la vitesse maximale (V_{\max}); la concentration à la moitié de V_{\max} ($V_{\max}/2$) représente la constante de Michaelis (K_M). La constante catalytique (k_{cat}) est calculée à l'aide de l'équation 2.1 ci-dessous. La concentration d'enzyme est représentée par le symbole $[E]$.

La constante de Michaelis (K_M), représentant l'affinité productive entre un substrat (S) et une enzyme (E), correspond à la concentration de substrat $[S]$ nécessaire afin d'atteindre la moitié de la vitesse réactionnelle maximale ($V_{\max}/2$) (6). La vitesse maximale (V_{\max}) correspond à l'asymptote horizontale de la courbe, soit la vitesse estimée à une concentration de substrat infinie. La constante catalytique (k_{cat}) et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) de l'enzyme sont principalement utilisées afin d'évaluer la capacité des enzymes à accélérer une réaction (5). Ces termes sont généralement calculés par régression non-linéaire.

La constante k_{cat} représente le nombre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme par unité de temps (en s^{-1}). Une valeur élevée de k_{cat} représente une enzyme efficace pour des concentrations élevées de substrat. La k_{cat} peut être calculée en divisant la vitesse maximale de réaction (V_{\max}) par la concentration d'enzyme $[E]$ utilisée lors de l'essai (équation 2.1) (7).

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]} \quad (\text{Éq. 2.1})$$

Afin de simplifier le calcul des constantes catalytiques obtenues par les courbes de Michaelis-Menten, il est possible d'utiliser l'analyse par double réciproque de Lineweaver-Burk. Dans cette représentation, l'inverse de la vitesse ($1/V$) est montré en fonction de la réciproque de la

concentration du substrat ($1/[S]$). Une régression linéaire permet de déterminer les constantes catalytiques (8). Bien que peu utilisée, l'approche de Lineweaver-Burk demeure utile dans certains cas où l'analyse par régression non-linéaire n'est pas possible. Par exemple, s'il n'est pas possible d'approcher de la saturation de l'enzyme avec le substrat, l'approche de Lineweaver-Burk sera favorisée.

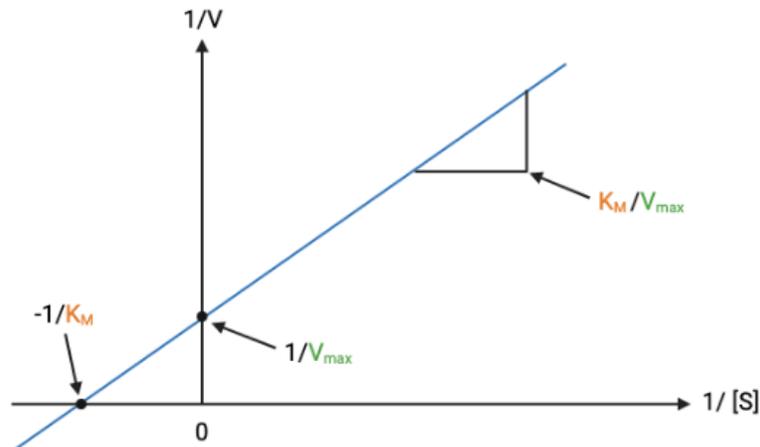


Figure 2.2. Représentation de Lineweaver-Burk de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de substrat. La réciproque de la vitesse trouvée expérimentalement en fonction de la réciproque de la concentration de substrat sont représentées. Il est possible d'effectuer une régression linéaire afin de déterminer les constantes catalytiques. L'ordonnée à l'origine correspond à $1/V_{max}$ et l'abscisse à l'origine correspond à $-1/K_M$. La pente de la régression équivaut à K_M/V_{max} . Figure inspirée de (8) et produite par BioRender.

L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) d'une enzyme permet d'effectuer une comparaison juste de la capacité d'une enzyme à accélérer une réaction (5). Une valeur élevée démontre une enzyme efficace en tenant compte de la vitesse maximale de la réaction catalysée et de la concentration de substrat requise pour l'atteinte de cette vitesse. Il a été démontré que la Fola de *E. coli* possède, en moyenne, une $k_{cat} \sim 12 \text{ s}^{-1}$ et une $k_{cat}/K_M \sim 10 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (9). Il a été démontré que les membres de la famille DfrB possèdent un k_{cat} entre $0,20 - 0,41 \text{ s}^{-1}$ et un k_{cat}/K_M entre $0,061 - 0,18 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, soit des valeurs largement inférieures à celles rapportées pour Fola de *E. coli*. (9). Malgré cette efficacité catalytique nettement plus faible que Fola et comme mentionné précédemment, cette famille d'enzymes permet néanmoins la croissance bactérienne, lorsque le Fola est inhibée par le TMP.

2.2.2 – Facteurs influençant l'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme typique est proportionnelle à la concentration de substrat, tel qu'illustré par la courbe de Michaelis-Menten. La concentration de substrat choisie pour l'essai doit respecter la constante K_M de l'enzyme (1). En effet, la vitesse d'une réaction varie davantage à une faible concentration de substrat (donc la formation des produits varie plus rapidement). Afin d'appliquer l'analyse de données par régression non-linéaire, qui est généralement plus précise, il est important d'utiliser un spectre de concentrations de substrat qui inclut des valeurs en-dessous de la valeur de K_M et des concentrations largement supérieures à K_M afin d'assurer l'atteinte de la vitesse maximale.

De plus, chaque enzyme possède une valeur de pH pour laquelle son activité est maximale (V_{max} maximale) (1). Dépendamment de l'enzyme, une grande variation du pH peut fortement affecter l'activité enzymatique, tandis que d'autres enzymes sont très stables aux changements. Dans la même optique, l'usage de divers tampons peut affecter l'activité également. Le niveau de salinité d'un tampon peut affecter certaines enzymes en réduisant l'activité. Par exemple, lorsque la concentration saline est basse, les acides aminés chargés peuvent s'attirer, ce qui dénature la structure et causera l'agrégation de l'enzyme (10).

Finalement, la température peut avoir un effet important sur l'activité de l'enzyme. La hausse de la température a pour effet d'augmenter les mouvements moléculaires, donc d'accélérer la vitesse de réaction. Toutefois, une température trop élevée peut mener à une perte de stabilité protéique, provoquant le dépliement de la structure tridimensionnelle ce qui engendre la perte d'activité enzymatique. Il est donc important de déterminer les conditions optimales afin de maximiser le fonctionnement de toute enzyme nouvellement identifiée.

2.3 – La détermination spectrophotométrique de l'activité enzymatique

La quantification de nombreuses molécules d'intérêt peut être déterminée par mesures spectrophotométriques, une méthode facilement accessible. L'absorbance d'une solution peut être déterminée par le logarithme du rapport d'intensité de la lumière ayant traversé un échantillon d'intérêt (I) sur l'intensité initiale (I_0), mesuré par un spectrophotomètre, à une longueur d'onde précise (équation 2.2) (11). L'absorbance de la solution (A) sera proportionnelle à la concentration d'un analyte [S] et la longueur du trajet optique (l). Une courbe de calibration de l'absorbance obtenue en fonction de la concentration d'analyte connue permet d'obtenir un coefficient d'absorptivité molaire (ϵ) et de déterminer ensuite la concentration d'analyte contenue dans un échantillon inconnu (équation 2.3). La mesure d'absorbance d'un échantillon référence, soit le milieu réactionnel sans analyte, permet d'éliminer la contribution de ce milieu à l'absorbance de la solution et de soustraire l'interférence occasionnée par la présence de d'autres molécules absorbant à la même longueur d'onde.

$$A = \log \frac{I_0}{I} \text{ (Éq. 2.2)}$$

Où A = absorbance (U.A.); I_0 = intensité initiale de la lumière; I = intensité de la lumière traversant échantillon d'intérêt.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot [S] \quad \text{(Éq. 2.3)}$$

Où A = absorbance (U.A.); ϵ = absorptivité molaire ($L \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$); l = trajet optique (cm); [S] = concentration du substrat (M).

Les faibles coûts et quantités de matériels associés aux expériences spectrophotométriques sont des avantages expliquant sa grande utilisation en laboratoire. De plus, cette méthode est facilement accessible, les résultats peuvent être rapidement recueillis et l'appareil peut mesurer une large gamme de longueurs d'ondes, incluant les spectres du visible, de l'ultraviolet et de l'infra-rouge.

Afin d'augmenter la rapidité d'exécution, les expériences peuvent être faites en plaques 96 puits au lieu d'employer des cuvettes en quartz, la méthode plus traditionnelle. Les plaques 96 puits permettent d'augmenter le nombre d'échantillons testés simultanément à l'inverse d'une lecture unique avec les cuvettes. De plus, les volumes nécessaires en plaques (20 à 300 μ L) sont largement inférieurs qu'eux utilisés en cuvette (1 à 3 mL). Ceci est avantageux en ce qui concerne le temps associé à l'acquisition de données et à la préparation de matériel. Malgré ces avantages, l'usage d'un spectrophotomètre apporte tout de même quelques désavantages. Par exemple, cet appareil offre une spécificité de l'essai plus faible en comparaison à d'autres approches, telle que la spectrométrie de masse. Lors de la réaction Dfr, l'analyse par spectrophotomètre ne permet pas de distinguer la consommation du substrat DHF et du cofacteur NADPH indépendamment, étant l'absorbance importante des deux à 340 nm. Enfin, l'utilisation des plaques de 96 puits devient onéreuse si l'on doit travailler à des longueurs d'onde inférieures à 300 nm, où le quartz doit être utilisé plutôt que le plastique.

2.3.1 – Mesure spectrophotométrique de l'activité enzymatique des DfrB

L'activité enzymatique des DfrB peut être déterminée par spectrophotométrie en mesurant la différence entre l'absorbance produite par les substrats (DHF et NADPH) et les produits (THF et NADP⁺). Plus précisément, le NADPH et le DHF absorbent plus fortement à 340 nm que le THF et le NADP⁺. Ainsi, lors de la réaction de réduction, les signaux d'absorbance diminueront proportionnellement à la consommation des substrats, permettant ainsi de déterminer l'activité Dfr. Afin d'obtenir des résultats comparables entre essais, la vitesse initiale produite sous les conditions Michaelis-Menten sera prise en compte dans le calcul de l'activité enzymatique. À noter que toutes les méthodes de caractérisation d'activité des DfrB dans ce mémoire sont basées sur ce protocole spectrophotométrique.

2.3.2 – Les conditions expérimentales utilisées pour la détermination de l'activité des DfrB

Certaines conditions ont été précédemment investiguées afin de maximiser le fonctionnement des DfrB1; ces paramètres doivent être pris en compte lors des essais afin de limiter l'impact sur les résultats. Il a été démontré que la tétramérisation de la DfrB1 est sensible aux variations de pH du milieu réactionnel, ce qui influence directement sa catalyse enzymatique. Par exemple, à un pH acide (*e.g.* pH 5 ou moins), l'homotétramère de la DfrB1 se dissocie en dimère inactif en raison de la protonation des quatre résidus His62 situés à l'interface dimère-dimère, qui jouent un rôle sur la dissociation du tétramère (12). En effet, à faible pH, les paires de résidus His62 seront protonés ce qui causera la dissociation du tétramère, en raison de la répulsion des deux charges positives. Ceci dissocie le site actif, ce qui empêche conséquemment son interaction avec les substrats (13). Ceci donne lieu à une diminution de l'activité (figure 2.3) (12). Cette dissociation peut également être déterminée en mesurant la fluorescence des résidus Trp38, également présents à l'interface dimère-dimère de la DfrB1, qui seront exposés à la surface des dimères une fois dissociés (14). De plus, la DfrB1 possède une activité maximale à un pH d'environ 6,5 où le transfert d'hydrure ($k_{cat} \sim 1,3 \text{ s}^{-1}$), l'étape limitante de la réaction de réduction, s'effectue le plus rapidement (15). Aussi, l'homotétramérisation peut être observée par fluorescence, puisque les résidus Trp38 seront cachés de la surface (14).

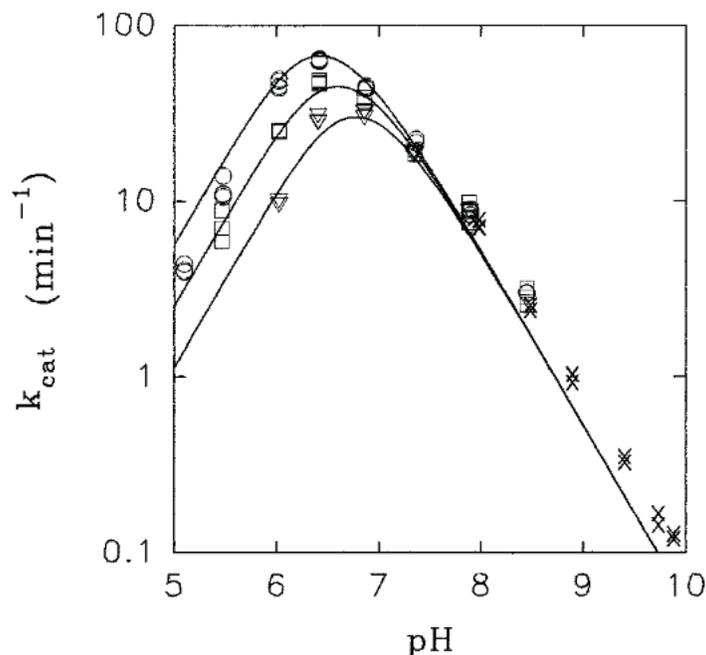


Figure 2.3. Profil d'activité (k_{cat}) de la DfrB1 selon la variation de pH à trois concentrations de protéine. La constante catalytique (k_{cat}) de la DfrB1 fut évaluée en fonction d'une variation de pH. Les concentrations de la DfrB1 sont de 828 nM, 370 nM et 166 nM, représentées respectivement par un cercle, un carré et un triangle. La figure est tirée de la référence (12).

À pH basique, le milieu réactionnel protone peu le DHF, nécessaire pour la réaction (voir section 1.2.1), réduisant graduellement l'activité enzymatique (figure 2.3). À l'inverse, en milieu réactionnel acide, le DHF sera davantage protoné, augmentant l'activité de la DfrB1. Toutefois, à un pH très acide, l'activité DfrB est réduite lorsque les résidus His62 sont protonés par le milieu. Ainsi, l'impact du pH sur la catalyse par la DfrB est une fonction complexe qui relève à la fois de la protonation de l'atome N5 du DHF et de la multimérisation, de sorte qu'il est essentiel de maintenir un pH qui favorise la réaction. Sur la base des résultats rapportés dans ces travaux antérieurs, les protéines DfrB et leurs homologues seront dilués dans un tampon à pH 7 afin d'obtenir une activité maximale des DfrB.

2.3.3 – Méthodes alternatives déterminant l'activité enzymatique

Il existe diverses méthodes permettant d'évaluer l'activité d'une enzyme. Il est important de noter que ces méthodes n'ont pas été employées lors des expériences, et servent simplement de

références théoriques. Une autre méthode spectrophotométrique consiste à appliquer un essai couplé. Ce type d'essai est employé lorsque la consommation de réactif ou la formation de produit de la réaction ne peuvent être directement quantifiées par spectrophotométrie. Dans ce cas, une deuxième réaction peut être utilisée, où le produit de la réaction enzymatique est converti en analyte quantifiable par spectrophotométrie (16). Par exemple, le dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase, une enzyme qui convertit le 2-oxoglutarate et l'aspartate en oxaloacétate et en glutamate, peut être fait par l'utilisation d'un essai couplé (17). Ainsi, l'oxaloacétate ne peut être détecté directement puisque son coefficient d'absorptivité molaire au maximum d'absorption (~260 nm) est trop faible, créant trop d'interférences avec les autres molécules présentes dans la réaction (18). L'ajout de l'enzyme malate déshydrogénase permet de convertir l'oxaloacétate produit en malate, à l'aide du NADH. On observe donc la déplétion du signal du NADH à 340 nm à mesure que l'oxaloacétate est transformé. Il est important que les conditions soient optimales afin que la seconde réaction ne soit pas limitante, rendant l'essai plus complexe qu'une détection directe. Ainsi, les essais couplés sont moins efficaces puisqu'ils dépendent de l'efficacité de la deuxième réaction; elle doit être complète et rapide, ce qui est rarement le cas ou difficile à mettre en place (16). Dans cette étude, la réaction de réduction du DHF peut être directement détectée à 340 nm, ne nécessitant pas l'usage d'essai couplé.

Lorsqu'une quantification directe des produits ou des substrats ne peut être faite, l'utilisation d'analogues structurels peut s'avérer utile afin de détecter l'activité d'une enzyme. Par exemple, l'activité des lipases peut être déterminée à l'aide d'analogues de substrats. Les lipases hydrolysent le groupement ester des triglycérides afin de former du glycérol et des acides gras. Toutefois, cette hydrolyse n'est pas détectable par spectrophotométrie puisque les triglycérides et les acides gras n'absorbent pas aux longueurs d'onde où les mesures peuvent aisément être prises. Il est possible de détecter et de doser la lipase en utilisant un substrat analogue, soit un ester de *para*-nitrophénol. La lipase hydrolyse les esters et libère l'acide gras et le *para*-nitrophénol, de couleur jaune détectable à 405 nm. Une limitation de cette technique est que le substrat natif n'est pas utilisé; dans cet exemple, l'ester de *para*-nitrophénol est activé relativement à un triglycéride, de sorte que son hydrolyse ne représente pas l'activité naturelle de la lipase.

La méthode de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (par exemple LC-MS) peut être employée comme méthode alternative aux essais spectrophotométriques pour déterminer

l'activité enzymatique. La chromatographie permet d'identifier des composés selon leurs propriétés physico-chimiques et est grandement utilisée pour séparer les peptides et les protéines (19). Les solutions sont séparées dans une colonne chromatographique, selon les interactions chimiques ou physiques entre l'analyte et les composantes de la colonne. Par la suite, les composés séparés sont identifiés par spectrométrie de masse (MS) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (19). La réaction est produite selon un temps défini, puis arrêtée (*e.g.* avec le changement de pH du milieu réactionnel) pour l'analyse. La courbe Michaelis-Menten peut être produite en variant les concentrations de substrats, permettant d'extrapoler les constantes cinétiques (figure 2.1). Un avantage du MS couplé à une colonne chromatographique est qu'il est possible d'analyser des mélanges de solutions très complexes. De plus, cette technique est très sensible, précise et reproductible, permettant d'étudier quantitativement les enzymes (20). Toutefois, la combinaison de ces deux méthodes s'avère plus complexe (choix des conditions pour sélectivité et reproductibilité optimale) que l'usage d'un spectrophotomètre pour déterminer l'activité des DfrB. Aussi, l'analyse de plusieurs échantillons simultanés est plus lente qu'avec l'usage des plaques 96-puits. Pour la réaction Dfr, il est plus difficile de mesurer la formation du produit THF par LC-MS, en raison d'une possibilité élevée d'oxydation spontanée du THF en DHF (21). Finalement, l'usage d'un instrument LC-MS engendre des coûts plus élevés pour son utilisation et sa maintenance.

2.4 - Partie expérimentale

2.4.1 - Solutions

Toutes les cultures bactériennes contiennent 50 µg/mL de kanamycine.

Milieu de culture d'autoinduction de l'expression de protéines : ZYP-5052 : Pour un volume final de 1L, combiner 928 mL de ZY (tryptone 1 % (m/v), extrait de levure 0,5 % (m/v)); 50 mL de 20 × P (Na₂HPO₄ • 7 H₂O 1.0 M, KH₂PO₄ 1.0 M, (NH₄)₂SO₄ 0.5 M; 20 mL de 50 × 5052 (glycérol 25 % (v/v), glucose 2.5 %, α-lactose 10 % (m/v)); 2 mL de MgSO₄ • 7 H₂O (1 M) et 0.2 mL de 1000 × oligo-éléments (FeCl₃ 50 mM, CaCl₂ 20 mM, MnCl₂ 10 mM, ZnSO₄ 10 mM, CoCl₂ 2 mM, CuCl₂ 2 mM, NiCl₂ 2 mM, Na₂MoO₄ 2 mM, Na₂SeO₃ 2 mM et H₃BO₃ 2 mM). Stériliser par autoclave.

Tampon de lyse bactérienne: KH₂PO₄-K₂HPO₄ 100 mM (pH 8), MgSO₄ 10 mM (Anachemia), dithiothréitol 1 mM (Fisher), lysozyme 0.5 mg/mL (MP Biomedicals), DNase 0.4 U (Thermo), benzamidine 1.5 mM (Fisher) et fluorure de phénylméthylsulfonyle 0.25 mM (Bioshop).

Tampon phosphate de potassium : KH₂PO₄-K₂HPO₄ 50 mM (pH 7).

Milieu de culture Lysogeny broth (LB) : Tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L et extrait de levures 5 g/L. Stériliser par autoclave.

Milieu solide LB-agar : Ajouter 3 g d'agar par tranche de 250 mL de LB. Stériliser par autoclave.

2.4.2 - Expression protéique et lyse des cultures bactériennes

Les DfrB nouvellement identifiées (homologues proches) ont été surexprimés en cellules *E. coli* BL21(DE3). Une préculture de *Lysogeny Broth* (LB) (5 mL) contenant de la kanamycine fut utilisée afin d'inoculer des cultures de milieu d'autoinduction ZYP-5052 (1 mL) contenant de la kanamycine à une densité optique (DO_{600nm}) de 0.1, puis incubées à 37 °C pendant 3h avec agitation à 230 rpm. Lorsqu'une DO_{600nm} entre 0.7 – 1 est atteinte, les cultures ont été incubées à 22 °C pendant 16 – 18 h, 230 rpm. Les cultures furent centrifugées à 20 800 ×g pendant 30 min à 21 °C, puis les culots furent conservés à -72 °C jusqu'à utilisation. Les culots ont été dégelés à température ambiante (TA), puis resuspendus en tampon de lyse bactérienne (400 µL) pour 2 h sous agitation

vigoureuse. Les lysats furent centrifugés à $20\,800 \times g$ pendant 30 min à 21 °C, et les surnageants résultants (nommés ‘lysats’ pour le reste du mémoire) furent utilisés pour les essais subséquents d’activité enzymatique.

2.4.3 - Essais d’activité dihydrofolate réductase en lysat

Le substrat dihydrofolate (DHF) et le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) furent quantifiés à leur maximum d’absorption respectif par spectrophotométrie (Cary 100 Bio UV-Visible Agilent) dans du tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7) avec un coefficient d’extinction molaire de $\text{DHF}_{282\text{nm}} 28\,400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\text{NADPH}_{340\text{nm}} 6\,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (22). Dans des plaques de 96-puits en acrylique (Corning, CLS9017), le lysat bactérien (10 μL) contenant la protéine d’intérêt fut ajouté à 100 μM de NADPH et 100 μM de DHF dans un volume final de 100 μL de tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7). L’activité enzymatique initiale fut déterminée en mesurant la diminution du signal d’absorbance à 340 nm à l’aide d’une lectrice à plaques (Beckman Coulter DTX880) pendant 5 min. Les essais ont été effectués en triplicat.

2.4.4 - Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les essais CMI furent effectués en triplicat sur milieu solide selon la méthode de microdilution (23). Des cultures *E. coli* BL21(DE3) contenant les gènes encodant pour les homologues proches DfrB, la DfrB1 (contrôle positif) et cTEM19m (contrôle négatif) ont été propagés dans du LB (1 mL) contenant de la kanamycine, puis incubés pour 16 – 18 h à 37 °C, 230 rpm. Ces cultures ont servi à inoculer des milieux solides de LB-agar contenant 0.25 mM d’IPTG (ThermoFisher) et du triméthoprime (TMP) (Sigma) à diverses concentrations (0 à 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solubilisé dans 5 % méthanol (MeOH). Un inoculum de 1×10^4 cfu/mL des cellules exprimant les DfrB d’intérêt fut déposé sur les plaques contenant différentes concentrations de TMP, puis incubé pour 16 – 18 h à 37 °C. La plus basse concentration de TMP inhibant visiblement la croissance bactérienne fut considérée comme étant la concentration minimale inhibitrice.

2.5 - Résultats et discussion

2.5.1 - Caractérisation d'homologues proches des DfrB

Préalablement à cette étude, les enzymes DfrB1 à DfrB9 avaient été rapportées dans la base de données CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*). Avant le début de ma maîtrise, le laboratoire Pelletier a identifié et caractérisé deux membres additionnels de la famille des DfrB, soit DfrB10 et DfrB11 (figure 1.6). Les gènes qui les encodent furent identifiés dans des contextes reliés aux activités humaines, tels les contextes cliniques et les eaux usées (24). Justement, un des aspects sous-étudiés chez les DfrB est leur prévalence dans divers environnements (section 1.2.2). Ainsi, un objectif auquel ce mémoire s'intéresse est d'investiguer si de nouvelles séquences DfrB peuvent être identifiées dans divers environnements indépendants des activités humaines.

À cet effet, une recherche dans une base de données métagénomique (JGI/IMG) a permis d'identifier plus de 3000 gènes *dfrB* homologues à l'aide du module de recherche Pfam et de caractériser dix séquences identifiées comme homologues proches aux DfrB connues. À cet effet, des critères furent établis au sein du laboratoire afin de distinguer les familles d'homologues trouvées; les homologues proches sont caractérisés par une identité de séquence de 63 à 92 %. Ces travaux de recherches ont été effectués par Stella Cellier-Goetghebeur et Claudèle Lemay-St-Denis, laboratoire Pelletier; en collaboration avec Dr. Janine Copp, Université de la Colombie-Britannique. Il fut possible d'observer une haute conservation des résidus clés encodés dans le domaine SH3-like chez toutes les DfrB (figure 2.4). Cette conservation suggère que ces homologues pourraient conférer de la résistance au TMP et posséderaient de l'activité Dfr. Afin d'évaluer cette hypothèse, des essais de concentration inhibitrice minimale (CMI) de TMP furent entrepris en bactéries *E. coli* exprimant les homologues de *dfrB*, suivi d'essais d'activité en lysats *E. coli*, tel que décrit dans la section suivante.

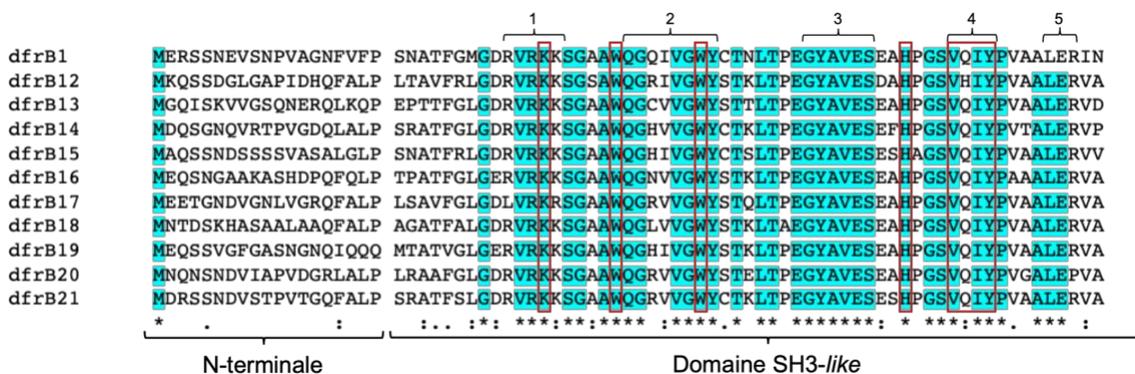


Figure 2.4. Alignement des homologues proches et de la DfrB1. La séquence DfrB1 sert de référence. La séquence de 78 acides aminés comporte une extrémité N-terminale peu conservée et un domaine SH3-like hautement conservé. Les résidus importants pour la catalyse ou pour l’homotétramérisation sont encadrés en rouge. Les 5 brins b antiparallèles formant le domaine SH3-like sont représenté par les 5 chiffres au-dessus de l’alignement. L’alignement fut produit à l’aide du logiciel de MAFFT. Le niveau de conservation entre les séquences est caractérisé par: (*) conservation parfaite, avec surlignage bleu; (:) conservation entre groupe de propriétés similaire élevée et (.) conservation entre groupe de propriété similaire faible

2.5.2 - Caractérisation des homologues proches de DfrB1

Les essais de CMI et la caractérisation de l’activité Dfr initiale en lysats fut entreprise pour les nouveaux homologues DfrB12 à DfrB22 (figure 2.5). Seule la DfrB12 a conféré une résistance plus faible au TMP ([TMP] = 300 µg/mL) comparativement aux autres homologues proches (figure 2.5A), qui furent résistants jusqu’à la plus haute concentration soluble de TMP, soit 600 µg/mL. De plus, l’activité *in vitro* (figure 2.5B) variant entre 10 % et 70 % de l’activité de celle de la DfrB1 fut observée pour tous les homologues en lysat, de nouveau à l’exception de la DfrB12; les courbes représentant la progression de la réaction sont en figure 2.5B et les vitesses initiales calculées à partir des courbes sont en figure 2.5A. Ainsi, une pente plus abrupte représente une activité enzymatique plus forte. Il est à noter que la vitesse initiale calculée de la majorité des homologues (sauf DfrB14 et DfrB15) fut sous-estimée en raison de leur réactivité trop forte en lysat. Ceci est observé lorsque l’absorbance initiale est significativement plus faible que celle du contrôle négatif, démontrant que la réaction était amorcée avant la prise des premières lectures d’absorbance. Deux facteurs ayant contribué à sous-estimer la vitesse initiale sont le délai entre le mélange des réactifs et la première lecture d’absorbance prise en lectrice à plaques, ainsi que l’utilisation directe de lysats bactériens non dilués. Malgré l’absence d’activité observable pour la DfrB12 par essai spectrophotométrique de lysat d’*E. coli*, l’expression de la DfrB12 a conféré une résistance

significative au TMP, permettant la croissance jusqu'à 150 $\mu\text{g/mL}$ sur milieu solide; en conséquence la concentration minimale inhibitrice (CMI) est de 300 $\mu\text{g/mL}$ (figure 2.5A). Ceci suggère que même une activité de Dfr trop faible pour être observée selon cette méthode assure tout de même une prolifération cellulaire importante pour la bactérie. Ainsi, les essais CMI sont plus sensibles que la détection d'activité par lysat d'*E. coli*. La résistance et l'activité plus faibles de la DfrB12 pourraient être causées par la substitution du résidu Q67 par une histidine (Q67H) dans la tétrade catalytique VQIY (donc VHIY ici) (figure 2.4). Des analyses plus approfondies seront nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

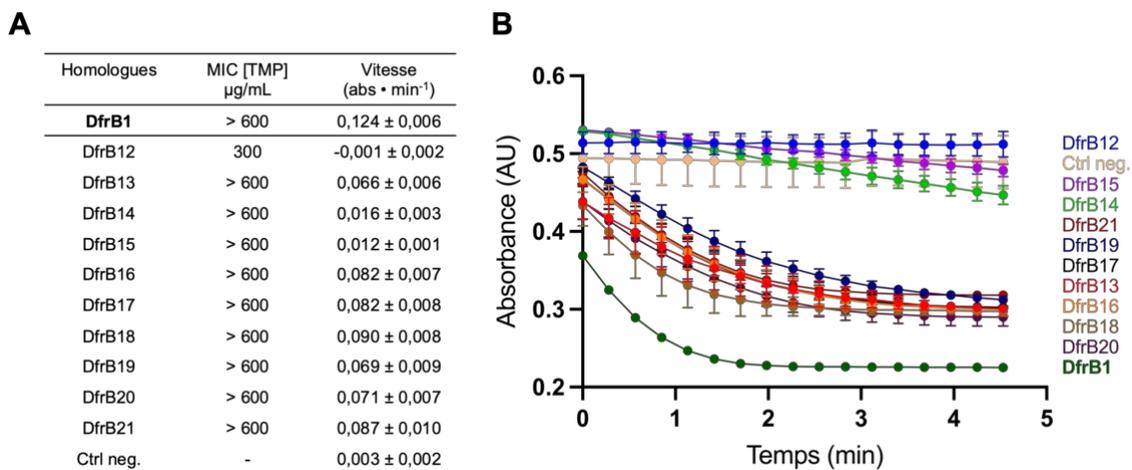


Figure 2.5. Les homologues DfrB1 nouvellement identifiés confèrent de la résistance au TMP et possèdent une activité Dfr. **A)** Concentration inhibitrice minimale (CMI) ont été produites sur milieu solide avec des concentrations de TMP variant de 0 à 600 $\mu\text{g/mL}$. Les valeurs rapportées correspondent à la plus faible concentration de TMP où la croissance bactérienne est absente selon l'inspection visuelle. La vitesse de réaction (abs \cdot min⁻¹) des homologues fut calculée à l'aide de la régression linéaire de la vitesse initiale (premier 20% de conversion du substrat) (n = 3, moyenne \pm écart-type). La vitesse calculée de plusieurs homologues est sous-estimée car les lectures d'absorbance n'ont pas capturé le début de la réaction. **B)** L'activité Dfr fut déterminée en lysat d'*E. coli* à la suite de la surexpression des homologues. La consommation des substrats fut détectée à 340 nm pendant 5 min (n = 3), les barres d'erreur représentent l'écart-type. Le contrôle négatif (cTEM19m) ne contient aucun gène *dfrB* et exprime le gène de la b-lactamase TEM-1 à sa place.

Ainsi, la démonstration d'une activité Dfr et d'une résistance au TMP (figure 2.5) permettent de conclure que ces dix homologues proches appartiennent à la famille DfrB en tant que nouveaux membres, et seront formellement nommés DfrB12 à DfrB21. Ceci démontre que l'identité de séquence en acides aminés élevée avec les DfrB1 à DfrB11 et la conservation des résidus retrouvés

dans le domaine SH3-*like* (figure 2.4) sont des critères de recherche qui suffisent pour identifier de nouveaux membres de la famille DfrB. Ceci servira d'outil facilitant l'identification d'homologues DfrB dans divers environnements subséquentement. Les résultats de la figure 2.5 sont compris dans le manuscrit (25).

Références du chapitre 2

1. Scopes RK. Enzyme Activity and Assays. Encyclopedia of Life Sciences: Macmillan Publishers Ltd; 2002.
2. Tang Q, Leyh TS. Precise, facile initial rate measurements. *J. Phys. Chem. B.* 2010;114(49):16131-6.
3. Golynskiy MV, Haugner JC, 3rd, Morelli A, Morrone D, Seelig B. In vitro evolution of enzymes. *Methods Mol. Biol.* 2013;978:73-92.
4. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015;59:1-41.
5. Srinivasan B. A guide to the Michaelis-Menten equation: steady state and beyond. *FEBS J.* 2021.
6. Bar-Even A, Noor E, Savir Y, Liebermeister W, Davidi D, Tawfik DS, et al. The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry.* 2011;50(21):4402-10.
7. Park C. Visual Interpretation of the Meaning of k_{cat}/K_M in Enzyme Kinetics. *J. Chem. Educ.* 2022;99(7):2556-62.
8. Waldrop GL. A qualitative approach to enzyme inhibition. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2009;37(1):11-5.
9. Toulouse JL, Shi G, Lemay-St-Denis C, Ebert MCCJC, Deon D, Gagnon M, et al. Dual-Target Inhibitors of the Folate Pathway Inhibit Intrinsically Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020;11(11):2261-7.
10. Zapadka KL, Becher FJ, Gomes Dos Santos AL, Jackson SE. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus.* 2017;7(6):20170030.
11. Swinehart DF. The Beer-Lambert Law. *J. Chem. Educ.* 1962;39(7):333.
12. Park H, Zhuang P, Nichols R, Howell EE. Mechanistic Studies of R67 Dihydrofolate Reductase: EFFECTS OF pH AND AN H62C MUTATION*. *J. Biol. Chem.* 1997;272(4):2252-8.
13. Narayana N, Matthews DA, Howell EE, Nguyen-huu X. A plasmid-encoded dihydrofolate reductase from trimethoprim-resistant bacteria has a novel D2-symmetric active site. *Nat. Struct. Biol.* 1995;2(11):1018-25.
14. Hicks SN, Smiley RD, Stinnett LG, Minor KH, Howell EE. Role of Lys-32 residues in R67 dihydrofolate reductase probed by asymmetric mutations. *J. Biol. Chem.* 2004;279(45):46995-7002.
15. Kamath G, Howell EE, Agarwal PK. The Tail Wagging the Dog: Insights into Catalysis in R67 Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry.* 2010;49(42):9078-88.
16. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science.* 2014;1(1):41-55.
17. Huang X-J, Choi Y-K, Im H-S, Yarimaga O, Yoon E, Kim H-S. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors.* 2006;6(7):756-82.
18. Hess JL, Reed RE. Considerations of oxalacetic acid keto-enol equilibria in various solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* 1972;153(1):226-32.
19. Tuli L, Ransom HW. LC-MS Based Detection of Differential Protein Expression. *J. Proteom. Bioinform.* 2009;2:416-38.
20. Bothner B, Chavez R, Wei J, Strupp C, Phung Q, Schneemann A, et al. Monitoring enzyme catalysis with mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 2000;275(18):13455-9.

21. Chen L, Ducker GS, Lu W, Teng X, Rabinowitz JD. An LC-MS chemical derivatization method for the measurement of five different one-carbon states of cellular tetrahydrofolate. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017;409(25):5955-64.
22. Toulouse J, Abraham SMJ, Kadnikova N, Bastien D, Gauchot V, Schmitzer A, et al. Investigation of Classical Organic and Ionic Liquid Cosolvents for Early-Stage Screening in Fragment-Based Inhibitor Design with Unrelated Bacterial and Human Dihydrofolate Reductases. *Assay Drug Dev. Technol.* 2017;15.
23. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 2008;3(2):163-75.
24. Lemay-St-Denis C, Diwan S-S, Pelletier JN. The Bacterial Genomic Context of Highly Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases Highlights an Emerging Threat to Public Health. *Antibiotics.* 2021;10(4):433.
25. Cellier-Goetghebeur S, Lafontaine K, Lemay-St-Denis C, Tsamo P, Bonneau-Burke A, Copp JN, et al. Discovery of Highly Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases in Diverse Environmental Settings Suggests an Evolutionary Advantage Unrelated to Antibiotic Resistance. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(12).

Chapitre 3 – Caractérisation de l’inhibition enzymatique des DfrB

3.1 - Objectif de ce chapitre

L’objectif du chapitre 3 est de tenter d’identifier de nouveaux inhibiteurs des DfrB. Les inhibiteurs actuellement identifiés offrent une inhibition médiocre jumelés avec une solubilité aqueuse faible, ainsi qu’un manque de perméabilité membranaire. Un analogue d’inhibiteur connu et quelques dizaines de composés dont les structures ne sont pas analogues aux inhibiteurs connus seront examinés à l’aide d’essais spectrophotométrique mesurant l’activité enzymatique.

3.2 – Les inhibiteurs réversibles et irréversibles

Lors du processus de développement d’un médicament destiné aux traitements d’infections bactériennes chez l’humain, une des étapes initiales est de caractériser l’effet de molécules avec un potentiel d’effet thérapeutique sur une cible moléculaire *in vitro*. Ainsi, lorsqu’une enzyme est la cible thérapeutique, il est possible d’étudier l’effet de ces composés sur l’activité de l’enzyme à l’aide d’essais d’activité en présence d’inhibiteurs (essais d’inhibition). Une des voies métaboliques bactériennes grandement étudiées dans le développement d’antibiotiques est la voie de biosynthèse du folate, nécessaire à la prolifération bactérienne (figure 1.2). Afin qu’un inhibiteur puisse être utilisé en milieu clinique en tant que médicament, il est important que certaines caractéristiques physico-chimiques soient évaluées expérimentalement, telles que la puissance, l’affinité et la sélectivité.

Un inhibiteur est un composé ayant la capacité de réduire l’activité d’une enzyme. Les composés inhibiteurs peuvent agir via différents mécanismes d’action, selon la cible enzymatique. On distingue deux grands types d’inhibition : les liaisons réversibles et irréversibles. Un inhibiteur provoquant une liaison irréversible implique la formation d’un lien covalent entre l’enzyme et l’inhibiteur, inactivant indéfiniment cette enzyme. Une inhibition réversible peut quant à elle être décrite par trois mécanismes distincts, soit une inhibition compétitive, non compétitive ou incompétitive (1). La liaison de l’inhibiteur au site actif de l’enzyme libre implique un mécanisme d’inhibition compétitive. Une concentration élevée de substrat par rapport à la concentration en

inhibiteur permet ainsi de contrer ce type d'inhibition. La vitesse maximale de la réaction reste inchangée, mais l'affinité productive de l'enzyme pour son substrat sera diminuée (V_{max} constant, K_M augmentée).

Lorsque l'inhibiteur se lie à un endroit différent du site de liaison des substrats, on parle d'inhibition allostérique. Cette liaison provoque un changement conformationnel qui inactive l'enzyme. La liaison à ce site peut être indépendante de la présence de substrat, où l'inhibiteur se lie avec des affinités comparables à la forme libre (E) ou au complexe enzyme-substrat (E•S). On parle ainsi d'inhibition non-compétitive. Un changement dans la concentration relative entre les substrats et l'inhibiteur n'a donc plus d'effet; une concentration suffisante en inhibiteur empêchera la réaction catalytique (2). Lors d'une inhibition non-compétitive, la vitesse maximale de réaction sera diminuée, mais l'affinité productive de l'enzyme reste inchangée (V_{max} diminuée, K_M constante). Finalement, une inhibition incompétitive est possible lorsque l'inhibiteur provoque un changement conformationnel en liant le complexe enzyme-substrat (E•S) exclusivement, bloquant ainsi la formation des produits (par la formation du complexe E•S•I). Dans ce cas, la vitesse et l'affinité productive de l'enzyme seront modifiées par la présence de l'inhibiteur (V_{max} diminuée, K_M augmenté). Le développement d'inhibiteurs compétitifs est le plus fréquent, étant donné que la ressemblance structurelle des molécules avec le substrat en favorise la conception rationnelle (2).

Bien que la régression non-linéaire soit généralement utilisée pour déterminer les paramètres d'inhibiteurs, la transformation des données sous forme de représentation de Lineweaver-Burk est plus intuitive (3). En effet, en présence d'un inhibiteur compétitif, l'ordonnée à l'origine ($1/V_{max}$) restera inchangée, alors que l'abscisse à l'origine ($-1/K_M$) sera augmentée (équation 3.1) ceci peut être observé à la figure 3.1 (4).

$$K_{Mapp} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (\text{éq. 3.1})$$

Où K_{Mapp} représente le K_M apparent de l'enzyme en présence d'inhibiteur (M); K_M représente la constante de Michaelis de l'enzyme sans inhibiteur (M); $[I]$ représente la concentration d'inhibiteur (M) et K_i représente la constante d'inhibition (M).

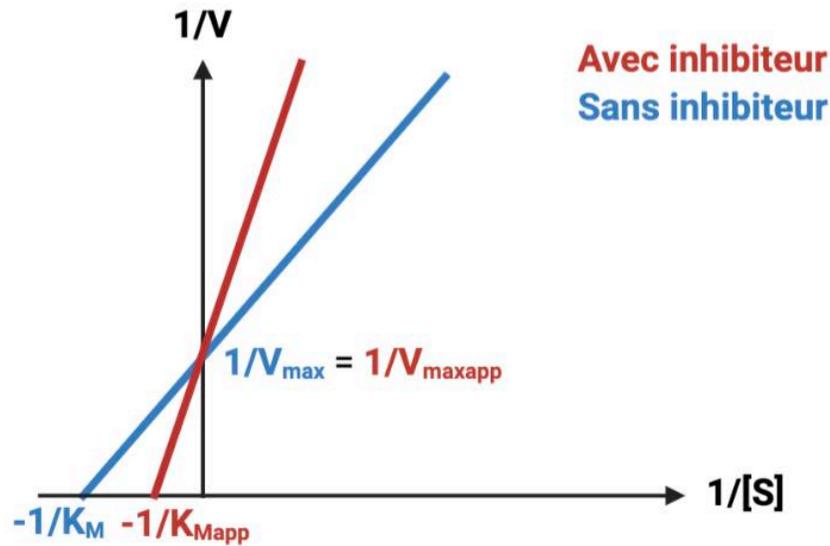


Figure 3.1. Représentation de Lineweaver-Burk d'une inhibition compétitive. La réciproque de la vitesse trouvée expérimentalement en fonction de la réciproque de la concentration de substrat sont représentées en absence (bleu) et en présence d'inhibiteur (rouge). L'ordonnée à l'origine demeure constante où $1/V_{\max} = 1/V_{\max\text{app}}$ et l'abscisse à l'origine augmentera en présence d'inhibiteur où $-1/K_M < -1/K_{M\text{app}}$. La pente de la régression équivaut à K_M/V_{\max} . Graphique inspiré de (3) et produit avec GraphPad Prism 9.

Ainsi, lorsque l'inhibiteur est compétitif, la K_i peut être déterminée avec une K_M apparente (en présence d'inhibiteur). La K_i est obtenue en variant une gamme de concentrations de substrat en fonction d'une concentration d'inhibiteur constante.

Divers inhibiteurs enzymatiques sont utilisés comme traitement en milieu clinique selon plusieurs mécanismes d'inhibition. Par exemple, le méthotrexate, anciennement appelé améthoptérine, est utilisé comme inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase humaine (hDfr) afin de traiter certaines maladies auto-immunes et des cancers, comme la leucémie (5). Un autre exemple est la nifédipine, un inhibiteur non compétitif de l'enzyme CYP2C9 de la famille des cytochromes P450, une enzyme cruciale dans le métabolisme des médicaments qui permet l'oxydation de composés xénobiotiques et de composés endogènes (6). Les inhibiteurs incompétitifs peuvent être utilisés dans le traitement de certains cancers. Par exemple, la phosphatase alcaline humaine peut être surexprimée dans divers cancers, et le peptide L-phénylalanine-glycyl-glycine (PGG) agit en tant qu'inhibiteur incompétitif de cette enzyme (7).

3.3 – Les paramètres de l’inhibition enzymatique

Étant donné que la famille d’enzymes des DfrB confère une forte résistance au TMP, il est d’intérêt de découvrir des inhibiteurs de cette famille pour contrer la résistance à cet antibiotique. Dans ces travaux, il a été possible d’examiner la capacité inhibitrice de divers composés de structures variées envers l’activité des DfrB par des essais d’inhibition.

Pour ce faire, nous déterminons la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) et la constante d’inhibition (K_i), qui informent respectivement sur la puissance et l’affinité d’un inhibiteur. L’ IC_{50} mesure la concentration d’inhibiteur nécessaire afin d’inhiber la moitié de l’activité enzymatique sous des conditions spécifiées; il ne s’agit donc pas strictement d’une constante (8). L’ IC_{50} peut être déterminé graphiquement par une représentation de l’activité relative de l’enzyme en fonction du logarithme des concentrations d’inhibiteurs, où le point d’inflexion de la courbe représente l’ IC_{50} (figure 3.2). Une faible valeur d’ IC_{50} représente un inhibiteur puissant, puisqu’une faible concentration d’inhibiteur est nécessaire pour diminuer de moitié l’activité de l’enzyme (8).

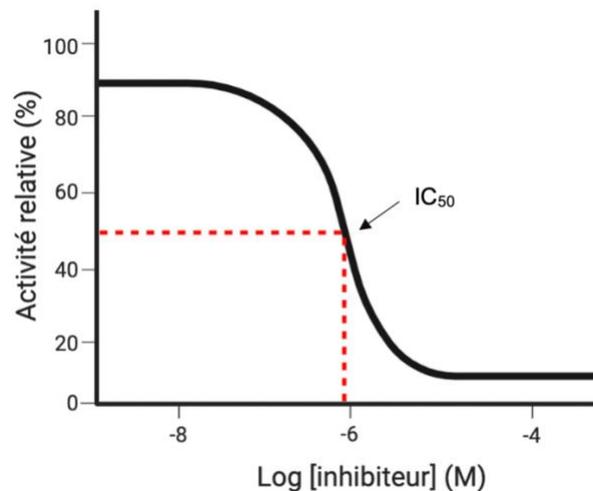


Figure 3.2. Graphique caractéristique d’une courbe d’ IC_{50} . La courbe noire représente les valeurs d’activité relative (%) en fonction du logarithme de la concentration d’inhibiteur (M). Les coordonnées du point indiqué par la flèche sont mises en évidence par des lignes rouges. L’ IC_{50} représente la concentration d’inhibiteur nécessaire afin d’inhiber la moitié de l’activité relative de l’enzyme.

La constante d'inhibition K_i représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour lier la moitié des sites actifs (8). Cette constante évalue l'affinité de l'inhibiteur envers une enzyme: un inhibiteur ayant une affinité élevée se caractérise par une faible K_i . Ceci est avantageux, car la concentration d'inhibiteur administrée sera faible, réduisant les risques d'engendrer de la toxicité cellulaire.

La K_i peut être déterminée à partir de l' IC_{50} selon l'équation de Cheng-Prusoff (équation 3.2) (9), définie pour les inhibiteurs de type compétitif.

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (\text{Éq. 3.2})$$

À ce jour, tous les inhibiteurs connus de DfrB sont de type compétitif. Ainsi, comme première approximation, l'acquisition et le traitement des données d'inhibition dans ces travaux impliqueront la détermination de valeur d' IC_{50} suivie de la transformation Cheng-Prusoff. Si un inhibiteur était identifié, la confirmation de son mode d'inhibition pourrait ensuite être entreprise, si cela semble pertinent.

3.4 – Mesure spectrophotométrique pour détermination de l'inhibition enzymatique des DfrB

Dans ces travaux les valeurs d' IC_{50} seront déterminées expérimentalement en mesurant la variation du signal d'absorbance si un inhibiteur réduit l'activité DfrB. Ainsi, on mesure la consommation des substrats (DHF et NADPH) en fonction du temps (section 2.2.1) selon la concentration d'inhibiteur, à une concentration constante de substrat (figure 3.2).

Il est possible que certains composés interfèrent avec l'analyse de l'activité, notamment en absorbant à la même longueur d'onde que les substrats suivis par spectrophotométrie. Cette absorbance peut même dépasser la limite de détection de l'appareil et donc rendre impossible l'acquisition de données par spectrophotométrie. Afin de contrôler ce paramètre, il est donc essentiel de déterminer l'absorbance des composés sous investigation à la longueur d'onde d'intérêt. La linéarité de la réponse optique de l'appareil est déterminée à l'aide d'une régression linéaire (10). Lorsque l'absorbance d'un inhibiteur aux concentrations d'intérêt fait dévier de la linéarité, il est possible de réduire le trajet optique de l'échantillon selon la loi de Beer-Lambert.

3.4.1 – Détermination des conditions expérimentales

La faible solubilité en milieu aqueux de certains composés organiques à tester en tant qu'inhibiteurs potentiels cause de la précipitation lors des essais. Cette interférence optique empêche l'acquisition de données spectrophotométriques interprétables. L'utilisation de co-solvant organique (*e.g.* DMSO) peut améliorer la solubilité des composés. Cependant, l'ajout de solvant organique peut affecter l'activité enzymatique, en dénaturant l'enzyme. De plus, une solubilisation incomplète des composés peut mener à l'obtention de faux négatifs, puisque la concentration effective du composé dans l'essai sera surestimée. Dans ces travaux, l'effet inhibiteur du co-solvant DMSO sur l'activité de la DfrB1 a été investigué (section 3.6.1).

3.4.2 – Méthodes alternatives pour le design d'inhibiteurs

Une approche pouvant être utilisée pour l'identification de composés inhibiteurs est le criblage à haut débit (HTS, *High throughput screening*). Cette approche consiste à développer diverses bibliothèques de $10^3 - 10^6$ petites molécules d'un poids moléculaire plus élevé (~ 500 Da), dans le but d'identifier par criblage des molécules ayant une activité pharmacologique ou biologique d'intérêt. L'objectif est alors d'augmenter les chances d'identifier un composé actif en fonction du nombre élevée de molécules testées sur une cible. Ces criblages permettent d'éliminer rapidement des composés pouvant être inadéquats pour le développement d'un inhibiteur (11). Cette approche est largement employée dans les étapes préliminaires pour la découverte de molécules pouvant servir comme nouvelles pistes de médicaments (12). Le HTS a comme avantage d'effectuer des criblages très rapidement où plus de 10 000 composés peuvent être criblés par jours. Un outil grandement utilisé afin de faire du criblage HTS est l'arrimage moléculaire (*molecular docking*). Cette méthode *in silico* consiste à prédire l'énergie d'interaction et le positionnement le plus favorable entre une molécule d'intérêt et la cible enzymatique. Les molécules prédites pour avoir l'énergie de liaison la plus faible seront conservées afin d'être optimisées (13).

Un grand nombre de molécules est criblé afin de prédire les composés actifs. Toutefois, la génération des conformations possibles des ligands est laborieuse. Malgré le coût informatique d'observer toutes les conformations possibles d'un composé de taille moyenne, des algorithmes ont été développés afin de simplifier les calculs (13). De plus, le criblage informatique permet de restreindre le criblage *in vitro* subséquent, limitant les efforts expérimentaux.

Une étudiante du groupe Pelletier, Lorea Alejaldre a effectué une collaboration avec le groupe du Dr. David Koes (U. Pittsburg) où l'arrimage moléculaire fut utilisé dans le but de cribler informatiquement des peptides conçus pour inhiber la formation du tétramère DfrB1. Ainsi, ces inhibiteurs potentiels pourraient empêcher la formation de l'interface dimère-dimère. Malheureusement, aucun résultat concluant n'a été tiré de cette collaboration.

3.5 – Sélectivité des inhibiteurs de DfrB

Il est important d'évaluer la sélectivité des inhibiteurs de DfrB envers la dihydrofolate réductase humaine (hDfr) puisque l'inhibition de la hDfr pourrait causer des effets secondaires non-désirés. Un inhibiteur sélectif n'affectant que la DfrB pourra être développé en vue de traitement éventuel des infections bactériennes résistantes au TMP. L'absence d'homologie entre les DfrB et hDfr, qui est de type F_{olA} (figures 1.4 et 1.5), peut simplifier la découverte d'inhibiteurs sélectifs envers les DfrB en raison de leur grande différence structurelle. Ainsi, en évaluant les inhibiteurs d'intérêt envers la hDfr, ceci permet de sélectionner les inhibiteurs spécifiques aux DfrB.

3.6 - Partie expérimentale

3.6.1 - Solutions

Les milieux de culture et les méthodes générales d'expression sont décrites au chapitre 2. La kanamycine a été utilisée à une concentration finale de 50 µg/mL.

Tampon IMAC A – Tris·HCl 50 mM (pH 8), NaCl 600 mM, CaCl₂ 1 mM, imidazole 20 mM

Tampon IMAC B – Tris·HCl 50 mM (pH 8), NaCl 600 mM, CaCl₂ 1 mM, imidazole 500 mM

Milieu de culture TB – Tryptone 12 g/L, extrait de levure 24 g/L, glycérol 0.4% (v/v), KH₂PO₄ 17 mM, K₂HPO₄ 72 mM.

3.6.2 - Matériel

Les composés investigués lors du criblage et les inhibiteurs de type bisbenzimidazole ont été synthétisés au laboratoire de la Dre Anne Marinier, à l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie de l'Université de Montréal (IRIC). Les inhibiteurs de type bissubstrats ont été fournis par le laboratoire du Dr Xinhua Ji au *National Cancer Institute*, États-Unis.

3.6.3 - Expression protéique et purification par la chaleur de la DfrB1

À partir d'une préculture de LB (20 mL) contenant de la kanamycine, des cellules *E. coli* BL21(DE3) contenant le gène encodant la protéine DfrB1 furent inoculées dans une culture de ZYP-5052 (600 mL) à une DO_{600nm} de 0.1. Lorsque la croissance bactérienne a atteint une DO_{600nm} entre 0.7 – 1, la culture a été incubée à 22 °C pendant 16 – 18 h, 230 rpm. La culture fut centrifugée à 2 000 ×g pendant 25 min, puis le culot fut resuspendu dans 30 mL de tampon phosphate de potassium 0.1 M (pH 8), puis lysé par sonication (3 cycles de 30 s avec 30 s de repos). Le lysat fut centrifugé pendant 20 min à 2 000 ×g, puis le surnageant fut chauffé à 75 °C pour 10 min, puis refroidit sur glace pour 10 min. Le lysat fut ensuite centrifugé à 2 000 ×g pour 20 min, puis le surnageant fut concentré jusqu'à un volume final de 1 mL à l'aide d'un tube de centrifugation *Amicon Ultra 15* (MWCO 3 000 kDa, Millipore) et filtré dans un tube *Millipore Centrifugal Filter Units* 0.22 micron en centrifugeant à 21 000 ×g pendant 15 min.

Une colonne chromatographique d'exclusion stérique *Superose 12* (volume de 125 mL) fut équilibrée avec 2 VC de tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7), puis le lysat concentré et

filtré fut injecté à un débit de 0.5 mL/min. Les fractions (1 mL) furent récoltées selon les pics $A_{280\text{nm}}$ et selon leur activité testée par spectrophotométrie à 340 nm. La concentration de la protéine a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $61\,880\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et une masse moléculaire de 33 986 Da correspondant à la forme tétramérique de la DfrB1. À l'aide de ces essais, une activité spécifique d'au moins 0.9 U/mg de l'enzyme et un rendement final de plus de 20 mg furent obtenus. Les fractions démontrant de l'activité dihydrofolate réductase furent concentrées à l'aide d'un tube de centrifugation *Amicon Ultra 15* (MWCO 3000 kDa, Millipore) pour obtenir une concentration finale d'au moins 10 mg/mL.

3.6.4 - Expression protéique et purification de la DfrB-H5

La DfrB-H5 a été surexprimée en cellules *E. coli* BL21(DE3). Une préculture (5 mL) contenant de la kanamycine fut utilisée afin d'inoculer une culture de milieu *Terrific Broth* (TB) (500 mL) contenant de la kanamycine. Lorsque la croissance bactérienne a atteint une $DO_{600\text{nm}}$ de 0.6, l'expression de protéines fut induite avec de l'IPTG (1 mM) (Thermo), puis incubé à 37 °C pendant 16 – 18 h, 230 rpm. La culture a été centrifugée à 3 000 rpm (Sorvall SLA-3000) pendant 30 min à 4 °C, puis le culot fut resuspendu dans du tampon IMAC A et lysé à l'aide d'un *cell disruptor* (Constant Systems). Le lysat a été centrifugé à 14 000 rpm (Sorvall SS-34) pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant fut filtré à l'aide de filtre 0.2 micron, puis injecté dans la colonne chromatographique HisTrap FF Crude (1 mL) (Cytiva). Après l'élution du *flow-through*, la protéine a été éluée par l'ajout du tampon IMAC B sur 5 VC. Les fractions (1 mL) contenant la protéine DfrB-H5 ont été recueillis en fonction du pic $A_{280\text{nm}}$, puis purifiées par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 75, selon les conditions définies dans la section purification DfrB1. Les fractions contenant la protéine DfrB-H5 ont été concentrées par *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units* (MWCO kDa 3000, Millipore).

3.6.5 - Essais d'activité en présence d'inhibiteurs des DfrB et de DfrB-H5

Des solutions d'inhibiteur (10 mM) furent préparées. Les composés inconnus fournis par l'IRIC et l'inhibiteur de type bisbenzimidazole Jj2008 (acide 2,2'-[1,5-pentanediy]bis(4-oxyphénylène)]-bis-1H-benzimidazole-5-carboxylique) (14) furent solubilisés dans du DMSO, tandis que le bissubstrat HP18 (2-amino-7,7-diméthyl-4-oxo-3,4,7,8-tétrahydroptéridine-6-carboxyamide-(2-(4-(5-(6-amino-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytétrahydrofuran-2-ylméthylsulanyl)-piperidin-1-yl)-éthyl) (15) et

son analogue HP18-PO₄ furent solubilisés dans du tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7) (14, 15). Les essais d'inhibition ont été effectués en plaques de 96-puits en acrylique (Corning) comprenant chaque dilution d'inhibiteur (10 µL) afin d'obtenir les concentrations finales spécifiées et la solution d'enzyme purifiée (10 µL): enzyme DfrB-H5-His₆ ([C]_{finale} de 0,12 µM, pour les essais avec Jj2008 et HP18), DfrB1 ([C]_{finale} de 0,87 µM pour les composés IRIC) et DfrB4 ([C]_{finale} de 0,70 µM pour l'essai avec HP18-PO₄). La réaction fut démarrée par l'ajout de la solution de NADPH et DHF solubilisés dans du tampon potassium phosphate 50 mM (pH 7) afin d'obtenir un volume final de 100 µL et des concentrations finales de NADPH et DHF de 50 µM. L'activité enzymatique fut suivie pendant les premiers 20 % de conversion du substrat en produit de manière analogue à celle décrite en section 2.3.3 et les valeurs d'IC₅₀ et K_i déterminées tel que décrit dans la section 3.2. Un contrôle négatif fut utilisé en incubant 10% de DMSO avec l'enzyme respective.

3.6.6 - Criblages des composés IRIC

Le criblage des inhibiteurs fournis par les collaborateurs de l'IRIC fut effectué en plaques de 96-puits tel que décrit ci-dessus, avec les modifications suivantes. Les composés IRIC, initialement concentrés à 10 mg/mL furent dilués dans du DMSO afin d'obtenir une concentration finale de 400 µM (10 % de DMSO) dans le puit. Une concentration finale de 0,72 µM de DfrB1 a été ajoutée afin d'initier la réaction. L'activité relative (%) de la DfrB1 en présence d'inhibiteur fut calculée en rapport à l'activité enzymatique sans ajout d'inhibiteur (seulement 10 % de DMSO).

3.7 - Résultats et discussion

3.7.1 – Détermination des concentrations du co-solvant DMSO

Afin d'assurer la solubilisation de composés dont l'inhibition sera évaluée, l'effet inhibiteur du co-solvant DMSO sur l'activité de la DfrB1 a été investigué (figure 3.3). L'activité de la DfrB1 diminue d'environ 60 % lorsqu'on ajoute 10 % de DMSO dans le milieu réactionnel. Cette concentration de DMSO a été retenue pour les tests d'inhibition car elle assurera la solubilité de nombreux composés organiques tout en conservant une activité enzymatique résiduelle suffisante pour en déterminer l'inhibition éventuelle. Il n'a pas été envisagé d'augmenter la concentration de DMSO dans le cas où certains composés demeurent faiblement solubles puisque l'activité enzymatique résiduelle serait trop faible pour en observer de manière fiable l'inhibition (figure 3.3). Toutefois, il serait possible de diminuer la concentration de DMSO utilisée dans le cas de

composés aisément solubles, afin de limiter l'inhibition des DfrB par ce co-solvant et ainsi améliorer la qualité des données d'inhibition acquises; ce point est discuté ci-bas.

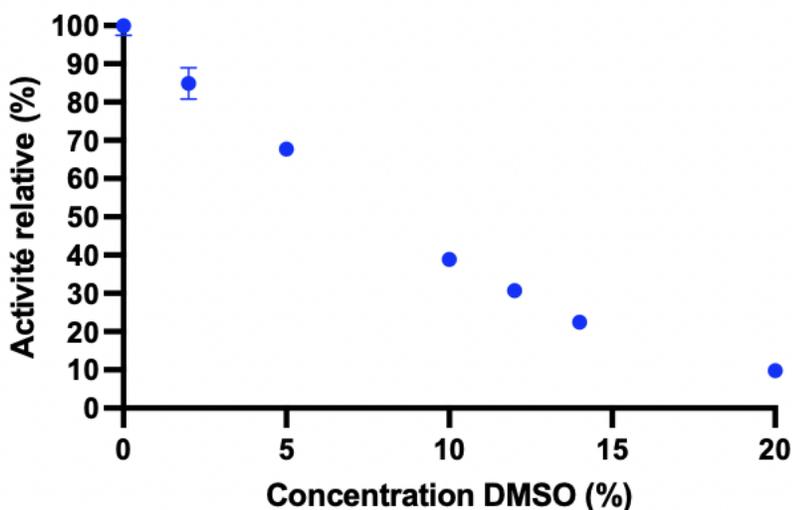


Figure 3.3. Courbe d'activité relative (%) de la DfrB1 en fonction d'une augmentation de concentration de DMSO (%). Les solutions contenant le DMSO comme co-solvant ont été incubées avec 50 μ M de NADPH, 50 μ M de DHF et une concentration finale de 0,72 μ M de DfrB1 dans un volume final de 100 μ L de phosphate de potassium 50 mM (pH 7) pendant 5 min. L'activité relative fut calculée en fonction de l'activité sans ajout de DMSO. Courbe produite à l'aide de GraphPad Prism 9.

3.7.2 - Inhibition d'une famille d'enzymes hautement résistantes au TMP

Dans l'optique de réduire la résistance aux antibiotiques, le développement d'inhibiteurs ciblant spécifiquement ces familles d'enzymes résistantes permettrait de contrer ce fardeau mondial. Au sein du laboratoire Pelletier, il fut possible de cribler des molécules de structures diversifiées afin d'évaluer si certaines inhibent la famille des DfrB. Il est à noter que tous les tests d'inhibition décrits ci-dessous furent entrepris à l'aide d'enzymes de type DfrB purifiées.

3.7.3 – Criblage d'inhibiteurs potentiels

À l'aide d'une collaboration avec le laboratoire de Dre Anne Marinier, il a été possible de cribler approximativement 40 composés envers la DfrB1. En absence d'une entente de confidentialité, les structures de la majorité de ces composés ne seront pas divulguées dans ce mémoire; les structures non confidentielles sont en Annexe (tableau A1). Ces composés furent choisis par Dre Marinier parmi la banque de composés de l'IRIC, pour leur composition ayant des ressemblances avec les

substrats DHF et NADPH et/ou avec les inhibiteurs connus des DfrB, tout en cherchant à diversifier les structures investiguées.

Lors des essais de criblage préliminaire effectués avec 400 μ M de composés en 10 % de DMSO, seuls quelques composés ont inhibé l'activité de la DfrB1 d'au moins 25 % (tableau 3.1). Le DMSO est requis, en raison de la faible solubilité de la majorité des composés dans le tampon phosphate de potassium (pH 7) (tableau 3.1). Toutefois, la DfrB1 est inhibée de 60 % lorsqu'en présence de 10 % de DMSO (figure 3.3). Ainsi, l'augmentation de la concentration de DMSO n'a pas été envisagée. La réduction à 5 % de DMSO fut tentée, au cas où cela permettait la dissolution de plusieurs composés. Toutefois, la majorité des composés présentaient une précipitation visible sous ces conditions, empêchant l'acquisition de données spectrophotométriques fiables et reproductibles. L'activité fut calculée selon la section 3.5.5, où le DMSO fut utilisé comme contrôle négatif de chaque essai. Le nombre d'essai pour chaque composé variait selon le volume et la concentration d'inhibiteur fourni; en pratique ceci a limité le nombre d'essais par composé de sorte qu'il n'a pas été possible de produire des essais en triplicat, ou parfois même en duplicat pour la majorité des composés.

Tableau 3.1 - Criblage préliminaire à 400 μ M de composés de l'IRIC envers la DfrB1.

ID composé	MM (g/mol)	Activité relative moyenne (%)	Écart-type ^a (%)	Observation
UM0126408	358,47	N/D	N/D	Quantité insuffisante ^b
UM0127518	268,03	N/D	N/D	Quantité insuffisante
UM0127754*	317,47	84	12	
UM0128404*	332,40	84	N/D	Précipitation
UM0128527	437,57	92	N/D	
UM0128640*	410,59	104	N/D	
UM0129155	375,42	95	N/D	
UM0129534	364,42	N/D	N/D	Quantité insuffisante
UM0129535*	366,41	69	N/D	
UM0129545	356,46	N/D	N/D	Précipitation
UM0130167	270,28	103	N/D	
UM0130359	459,45	N/D	N/D	Précipitation
UM0130461	267,28	91	N/D	
UM0130616*	259,26	42	N/D	
UM0130793	355,45	53	N/D	Précipitation
UM0131086	390,41	96	N/D	Précipitation
UM0131098	341,31	88	N/D	
UM0131187	370,44	205	N/D	Précipitation
UM0131202	352,43	130	N/D	Précipitation
UM0131305*	441,52	108	N/D	
UM0131553	557,44	103	7	
UM0131600	436,48	114	15	
UM0131660	332,39	111	5	
UM0131680	364,48	93	12	
UM0131774	457,35	114	9	
UM0131775	387,37	109	13	
UM0132438	413,47	112	6	
UM0134461	395,52	114	N/D	
UM0134464	429,53	101	9	
UM0134585	387,86	114	5	
UM0134876	505,99	N/D	N/D	Quantité insuffisante
UM0135379	369,26	N/D	N/D	Précipitation
UM0136277	364,35	N/D	N/D	Quantité insuffisante
UM0136374	294,14	129	12	
UM0137010	445,51	125	22	
UM0137707	299,41	112	11	
UM0137986	475,58	127	12	
UM0138286	442,55	109	3	
UM0138569	373,37	108	21	

*Ces composés ont été sélectionnés pour une caractérisation subséquente.

^aNombre d'essais indépendants de l'activité insuffisant pour déterminer l'écart-type dans le cas où une activité relative fut mesurée.

^bQuantité insuffisante de composé pour effectuer un essai d'inhibition.

N/D = non déterminé

Parmi les 40 composés visiblement solubles, les composés UM0129535 (69 % d'activité résiduelle) et UM0130616 (42 % d'activité résiduelle) ont offert une inhibition de plus de 25 % de l'activité initiale sous ces conditions (tableau 3.1) et furent retenus pour une caractérisation approfondie de leur potentiel d'inhibition. L'inhibition potentielle par les composés UM0127754, UM0128404, UM0128640 et UM013005 fut également caractérisée en plus de profondeur, étant donné qu'ils étaient disponibles en plus grande quantité que les autres, et malgré que l'essai préliminaire à 400 μM n'ait pas été concluant (inhibition de moins de 25 % ou observation de précipité). Malgré l'inhibition à environ 50 % de l'activité de la DfrB1, le composé UM0130793 n'a pu être examiné en plus de détail en raison de sa quantité trop faible à la suite du criblage initial. Aucun parmi les six composés étudiés à des concentrations variant entre 0 et 400 μM n'a permis d'obtenir un profil d'inhibition clair envers la DfrB1 (figure 3.4). De plus, les composés UM0128404, UM0130616 et UM0130793 ont donné lieu à de la précipitation visible lors des essais, empêchant l'acquisition de données fiables.

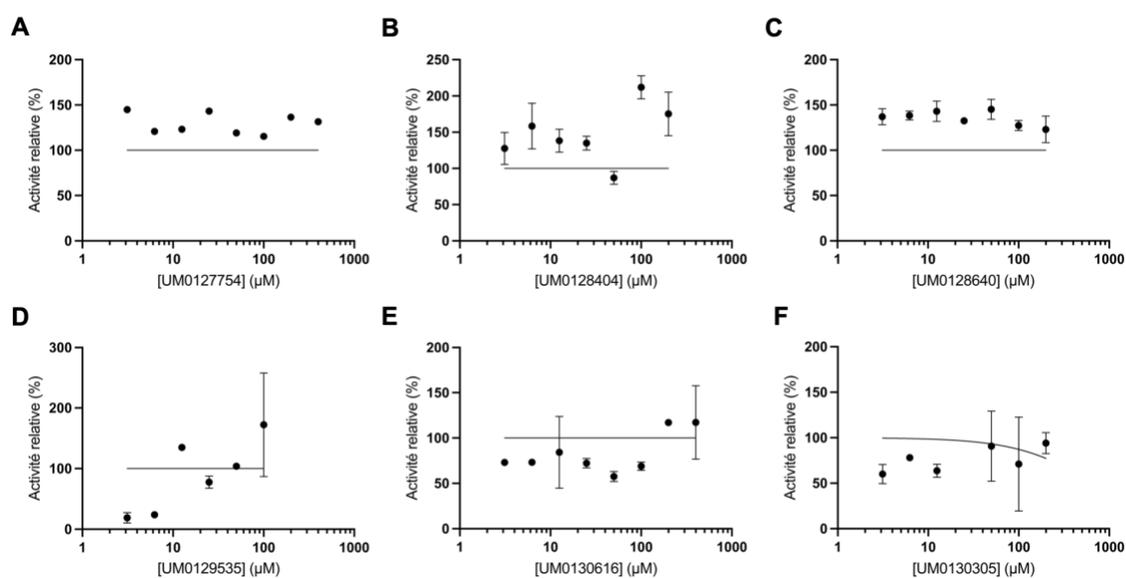


Figure 3.4. Essais d'inhibition détaillés de six composés de l'IRIC. A à F) Les essais ont été effectués pour une gamme de concentrations entre 0 et 400 μM . Courbes obtenues avec GraphPad Prism 9; les barres d'erreur représentent l'écart-type. Aucun composé n'a permis de déterminer une IC_{50} .

L'intérêt de tester des composés diversifiés en tant qu'inhibiteurs potentiels de DfrB est d'élargir nos connaissances SAR, tel que discuté précédemment (section 1.2.5). Ainsi, ces analogues permettront d'observer si la substitution ou l'addition de groupements fonctionnels influencera l'affinité du composé envers la DfrB1. Le criblage d'autres analogues provenant de la même source est toujours en cours.

Étant donné les faibles quantités disponibles pour la majorité des composés, le nombre de mesures prises pour chacun fut limité, parfois allant à une seule lecture. Ceci a eu pour conséquence d'augmenter l'erreur associée aux résultats rapportés. Tel que discuté précédemment, plusieurs de ces composés avaient une faible solubilité aqueuse, malgré l'ajout du co-solvant DMSO. Ainsi, la concentration réelle du composé en solution était sous-estimée et la précipitation n'a pas permis d'évaluer de manière précise l'effet de ces composés sur l'activité des DfrB. Ceci exerce également une influence sur l'interprétation des résultats et augmente la plage d'erreur. Finalement, le faible nombre de composés testés (± 40 composés) offre peu de chances, d'un point de vue statistique, d'identifier un inhibiteur potentiel. Selon les résultats obtenus, il est envisagé de sélectionner de nouveaux composés de structure et composition diversifiés à partir de la banque de composé de l'IRIC, afin de poursuivre ces recherches de nouveaux inhibiteurs.

3.7.4 – Profil d'inhibition des homologues distants des DfrB

L'observation préalable de l'inhibition de la DfrB4 par les inhibiteurs spécifiques à la DfrB1 de type bisbenzimidazole (section 1.2.5; (16)) est importante car cela suggère que les inhibiteurs de la DfrB1 pourraient inhiber plus largement la famille des DfrB. Ainsi, nous avons investigué si ces inhibiteurs inhibaient également les homologues distants DfrB-H prédits par moyens bio-informatiques (section 1.2.3). Les recherches préalables au laboratoire Pelletier ont déterminé que l'homologue DfrB-H5 (figure 1.8) confère de la résistance au TMP (Lemay-St-Denis, en révision). Afin d'établir un parallèle entre la famille DfrB et cet homologue distant, le profil d'inhibition de la DfrB-H5 fut évalué avec les inhibiteurs spécifiques de la DfrB1. Des essais d'inhibition avec un inhibiteur de type bisbenzimidazole (Jj2008) et de type bissubstrat (HP18) (section 1.2.5) ont été effectués.

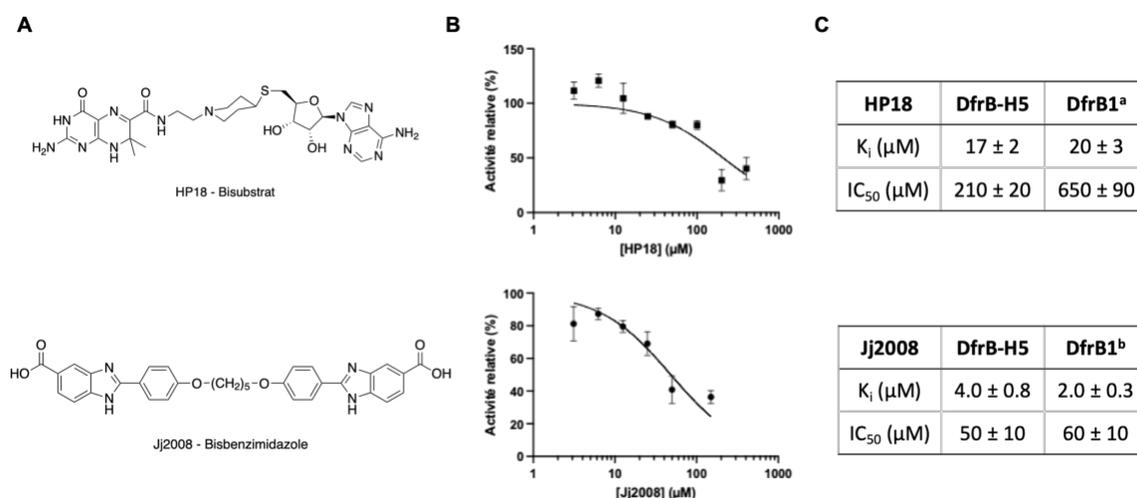


Figure 3.5. Le bisubstrat HP18 et le bisbenzimidazole Jj2008 inhibent l'activité de la DfrB-H5 de manière similaire à la DfrB1. **A)** Structure chimique des molécules HP18 et Jj2008. **B)** Courbe d'inhibition de la DfrB-H5 avec 0 à 400 μM de HP18 et Jj2008. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type ($n = 3$). **C)** Paramètres d'inhibition de HP18 et Jj2008. Les valeurs d' IC_{50} furent déterminées à l'aide de GraphPad Prism 9. Les K_i furent calculées à partir de l'équation de Cheng-Prusoff.

^aToulouse, JL *et al.* ACS Med Chem Lett. **2020**;11(11):2261-7.

^bBastien, D *et al.* J Med Chem. **2012**;55(7) :3182-92.

Ces résultats démontrent que l'homologue distant DfrB-H5 est inhibée par le bisubstrat HP18 ainsi que par l'inhibiteur de type bisbenzimidazole Jj2008 de manière semblable à la DfrB1 (figure 3.5C) (14, 17). Cette inhibition similaire entre ces deux enzymes qui partagent une forte homologie (80 %) du domaine fonctionnel SH3-like suggère que les domaines supplémentaires que comporte l'homologue distant DfrB-H5 n'interfèrent pas avec la liaison des inhibiteurs au site actif.

Rappelons que les résidus du site actif identifiés chez la DfrB1 sont conservés chez l'homologue distant DfrB-H5 (18). Une superposition de la DfrB1 et de l'homologue DfrB-H5 fut effectué où il fut possible d'observer que leur domaine SH3-like se superposait (figure 1.9, domaine SH3-like représenté en bleu). Bien que cette superposition n'ait pas inclus un inhibiteur, nos observations sont conformes avec l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition semblable chez la DfrB1 et la DfrB-H5. Nous proposons l'hypothèse que d'autres homologues distants des DfrB dont l'environnement du site actif est conservé seraient également inhibés par des molécules de la famille d'HP18 et de Jj2008, étant donné la conservation de ces résidus. Dans le cas où ces homologues distants contribuent, comme les homologues proches des DfrB, au résistome en conférant la résistance au

TMP, il est encourageant de constater que les mécanismes d'inhibition développés pour les DfrB pourront vraisemblablement s'appliquer aux homologues distants.

De plus, le fait que les inhibiteurs provenant de deux classes structurellement différentes inhibent la DfrB-H5 porte un éclairage sur la conservation évolutive de la fonction chez cette enzyme. Ainsi, les essais d'inhibition seront appliqués dans le futur comme outil pour caractériser de manière routinière les nouveaux homologues proches et distants des DfrB.

3.7.5 – Optimisation des inhibiteurs bisubstrats

Les bisubstrats spécifiques à la DfrB1 comportent une portion ptérine imitant le DHF et une portion nicotinamide imitant le NAD(P)H (section 1.2.5). Au sein de l'inhibiteur HP18, l'absence d'un phosphate à la position 2'-OH du groupement ribosyle fait en sorte que la portion nicotinamide imite le cofacteur NADH, alors que la réaction DfrB est spécifique au NADPH. Nous supposons que la phosphorylation en 2' permettrait d'augmenter l'affinité du bisubstrat pour le site actif des DfrB et améliorerait son pouvoir d'inhibition. Plus précisément, l'ajout d'une charge négative sur l'inhibiteur stabiliserait davantage l'interaction électrostatique avec les résidus Lys32 à l'entrée du site actif (figure 1.7). Suite à la synthèse du composé HP18-PO₄ par nos collaborateurs Dr Xinhua Ji et Dr Genbin Shi du NCI, un essai d'inhibition de la DfrB4 par HP18-PO₄ fut effectué (figure 3.6).

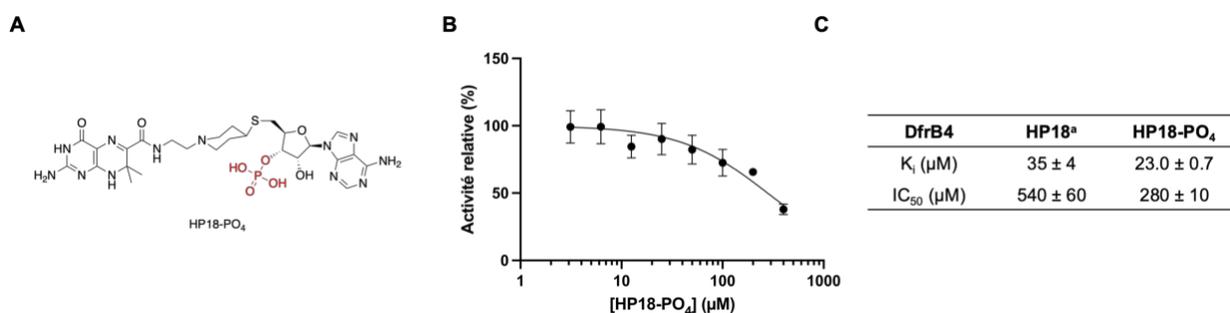


Figure 3.6. Le bisubstrat HP18-PO₄ inhibe l'activité de la DfrB4 de manière similaire au bisubstrat HP18. **A)** Structure chimique de la molécule HP18-PO₄, où le groupement phosphate-2' est représenté en rouge. **B)** Courbe d'inhibition de la DfrB4 avec 0 à 400 μM de HP18-PO₄. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type (n = 3). **C)** Paramètres d'inhibition de HP18 et HP18-PO₄. Les valeurs d'IC₅₀ furent déterminées à l'aide de GraphPad Prism 9. Les K_i furent calculées à partir de l'équation de Cheng-Prusoff.

^aToulouse, JL *et al.* ACS Med Chem Lett. 2020;11(11):2261-7.

Tel qu'observé ci-dessous, le profil d'inhibition obtenu envers la DfrB4 pour le bisubstrat phosphorylé HP18-PO₄ est semblable aux valeurs préalablement obtenues pour son analogue non-phosphorylé HP18 (figure 3.6C) (17). Ainsi, la phosphorylation à la position 2' n'a pas permis d'augmenter l'affinité de l'inhibiteur envers sa cible, allant à l'encontre de notre hypothèse initiale. Notons que nos collaborateurs n'ont pas pu confirmer la position du phosphate : il peut être positionné en 2' ou en 3', ou encore en position pontante 2'-3' sur le groupement ribosyle. Puisque les interactions intermoléculaires entre l'enzyme et l'inhibiteur sont grandement influencées par l'orientation relative des résidus enzymatiques et des groupements d'intérêts, il se peut qu'un groupement phosphate positionné autrement qu'en 2' ne participe pas de manière significative à l'interaction avec l'enzyme. Une méthode envisageable pour caractériser la position du groupement phosphate serait d'utiliser la résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore 31. Ayant une abondance relative naturelle de presque 100 %, aucun marquage n'est requis pour la résolution de structure des composés phosphorés.

Ainsi, malgré le fait qu'aucun composé supplémentaire n'a été identifié en tant qu'inhibiteur des DfrB dans le cadre de ma maîtrise, il demeure important de poursuivre la caractérisation d'inhibiteurs potentiels pour s'adresser à la résistance au TMP. Par exemple, les inhibiteurs de type bisbenzimidazole pourront être optimisés davantage ou d'autres modifications de groupements fonctionnels pourront être investigués. Pour ce qui est des inhibiteurs de types bisubstrats, il sera également possible d'investiguer d'autres composés de cette famille afin d'évaluer si les DfrB peuvent être inhibés par ces derniers.

Références du chapitre 3

1. Strelow J, Dewe W, Iversen PW, Brooks HB, Radding JA, McGee J, et al. Mechanism of Action Assays for Enzymes. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
2. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules*. 2017;22(7).
3. Waldrop GL. A qualitative approach to enzyme inhibition. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2009;37(1):11-5.
4. Yang X, Du Z, Pu J, Zhao H, Chen H, Liu Y, et al. Classification of difference between inhibition constants of an inhibitor to facilitate identifying the inhibition type. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2013;28(1):205-13.
5. Williams MN, Poe M, Greenfield NJ, Hirshfield JM, Hoogsteen K. Methotrexate binding to dihydrofolate reductase from a methotrexate-resistant strain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1973;248(18):6375-9.
6. Si D, Wang Y, Zhou YH, Guo Y, Wang J, Zhou H, et al. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab. Dispos.* 2009;37(3):629-34.
7. Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J. Clin. Biochem.* 2014;29(3):269-78.
8. Burlingham BT, Widlanski TS. An Intuitive Look at the Relationship of K_i and IC_{50} : A More General Use for the Dixon Plot. *J. Chem. Educ.* 2003;80(2):214.
9. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1973;22(23):3099-108.
10. Bastien D. Découverte d'inhibiteurs de la dihydrofolate réductase R67 impliquée dans la résistance au triméthoprim [Mémoire]: Université de Montréal; 2012.
11. Szymański P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(1):427-52.
12. Berdigaliyev N, Aljofan M. An overview of drug discovery and development. *Future Med. Chem.* 2020;12(10):939-47.
13. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2011;7(2):146-57.
14. Bastien D, Ebert MC, Forge D, Toulouse J, Kadnikova N, Perron F, et al. Fragment-based design of symmetrical bis-benzimidazoles as selective inhibitors of the trimethoprim-resistant, type II R67 dihydrofolate reductase. *J. Med. Chem.* 2012;55(7):3182-92.
15. Shi G, Shaw G, Liang YH, Subburaman P, Li Y, Wu Y, et al. Bisubstrate analogue inhibitors of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase: New design with improved properties. *Bioorg. Med. Chem.* 2012;20(1):47-57.
16. Toulouse JL, Yachnin BJ, Ruediger EH, Deon D, Gagnon M, Saint-Jacques K, et al. Structure-Based Design of Dimeric Bisbenzimidazole Inhibitors to an Emergent Trimethoprim-Resistant Type II Dihydrofolate Reductase Guides the Design of Monomeric Analogues. *ACS Omega*. 2019;4(6):10056-69.
17. Toulouse JL, Shi G, Lemay-St-Denis C, Ebert MCCJC, Deon D, Gagnon M, et al. Dual-Target Inhibitors of the Folate Pathway Inhibit Intrinsically Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020;11(11):2261-7.

18. Lemay-St-Denis C, Alejaldre L, Jemouai Z, Lafontaine K, St-Aubin M, Hitache K, et al. A conserved SH3-like fold in diverse putative proteins tetramerizes into an oxidoreductase providing an antimicrobial resistance phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2023;378(1871):20220040.

Chapitre 4 – Caractérisation de la thermostabilité des DfrB

4.1 - Objectifs de ce chapitre

Les objectifs du chapitre 4 est le développement d'un essai de thermostabilité basé sur le suivi de l'activité à l'aide de lysat clarifié, tout en cherchant à réduire le bruit de fond de cet essai. Nous nous pencherons à la fois sur la caractérisation de la thermostabilité des DfrB et de leurs homologues distants, les DfrB-H.

La stabilité protéique est un aspect important pour l'expression, la purification et l'étude structurale des protéines. La stabilité protéique est modulée par la relation entre la structure et la séquence de la protéine pouvant présenter un avantage fonctionnel et évolutif pour l'enzyme. Diverses forces permettent de stabiliser une protéine sous forme repliée, telles que les interactions hydrophobes, électrostatiques, les ponts d'hydrogène et les interactions de van der Waals (1). Ainsi, la modulation des interactions intramoléculaires, soit les interactions entre les résidus au sein d'une même protéine, peut permettre de conserver une stabilité protéique avantageuse (2). En effet, l'évolution de la stabilité d'une enzyme est partie prenante de son adaptation à son environnement (3).

4.2 - Profil de thermostabilité des DfrB

La DfrB1 est uniquement active sous forme d'homotétramère. La détermination de la stabilité thermique de la DfrB1 par calorimétrie à balayage différentiel a été rapportée, démontrant une dénaturation thermique réversible (figure 4.1). La dénaturation thermique cause la séparation du tétramère en forme de dimères; le rétablissement de la température permet de nouveau la formation de l'homotétramère actif (4). De plus, la DfrB1 a retenu 94 % d'activité enzymatique à la suite de deux cycles de chauffage et de refroidissement (4), démontrant la réversibilité de la dénaturation thermique de l'homotétramère actif.

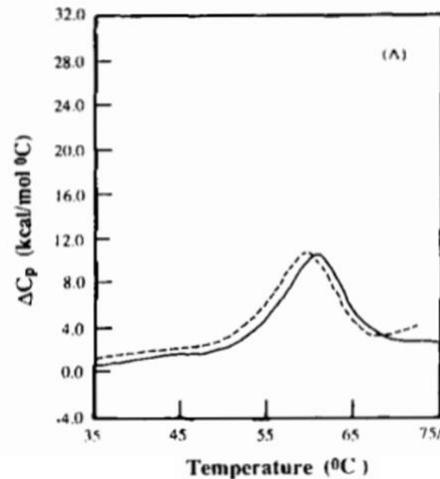


Figure 4.1. Une étude calorimétrique à balayage différentiel pour la DfrB1 sous forme de tétramère et de dimère. Le graphique représente l'analyse thermique de la DfrB1 sous forme de tétramère (296 μM), rapportant l'apport en énergie en fonction de la variation de température. Le balayage de chaleur est représenté par une ligne pleine; à l'inverse, le balayage de refroidissement est démontré par une ligne pointillée. La température de fusion (T_m) est de 60,6 °C pour l'homotétramère; la figure reproduite de (4).

Dans le laboratoire Pelletier, la thermostabilité des DfrB a été étudiée avant tout afin d'élaborer un protocole de purification de protéines. Il a été préalablement déterminé que la DfrB1 est une enzyme thermostable, puisque son activité est maintenue à la suite d'une incubation à 75 °C durant 20 min du lysat obtenu à la suite d'une surexpression dans *E. coli* (5). La protéine DfrB d'intérêt restera soluble à la suite d'un refroidissement, alors que la majorité des autres protéines seront agrégées et pourront être culottées par centrifugation. Ainsi, cette simple manipulation constitue la première étape d'un protocole de purification des DfrB, suivie d'une étape de 'polissage' sur colonne d'exclusion de taille (5).

Le dichroïsme circulaire (DC) a également été appliqué pour caractériser la dénaturation thermique réversible de la DfrB1, selon le suivi du changement dans la structure secondaire en fonction de la température (6, 7). Le DC est pratique en raison d'une faible quantité de protéine requise (8). Cependant, cette technique ne permet pas d'acquérir des données sur un grand nombre d'échantillons simultanément, au contraire du suivi de thermostabilité par essais d'activité qui sera présenté ci-dessous.

4.3 – Détermination de la thermostabilité des DfrB par essai d'activité en lysat brut

Une méthode rapide afin d'évaluer si l'enzyme est thermostable est d'effectuer un essai d'activité enzymatique à la suite d'un chauffage thermique à différentes températures (de 37 °C à 95 °C). Comme mentionné à la section 2.2, les essais d'activité peuvent être exécutés rapidement en plaque de 96 puits. Dans ce mémoire, nous rapportons pour la première fois la caractérisation de la thermostabilité des DfrB par suivi de l'activité enzymatique en lysat brut. Ainsi, diverses DfrB pourraient être exprimées en parallèle dans *E. coli*; à la suite d'une lyse chimique des cellules culottées et à la clarification des lysats par centrifugation, les lysats seront chauffés aux températures d'intérêt, refroidis puis l'activité serait déterminée en format 96 puits.

Les avantages attendus de cette approche sont la facilité de l'adapter à de nouveaux échantillons sans étapes de purification, facilitant l'analyse d'échantillons en parallèle. Les défis incluent l'obtention de relargage efficace de l'enzyme lors de la lyse chimique, l'obtention d'un signal d'activité suffisamment élevé et l'interférence potentielle de d'autres composantes cellulaires du lysat.

4.4 - Partie expérimentale

4.4.1 - Essais de thermostabilité par le suivi de l'activité en lysat

À partir d'une préculture de LB (5 mL), les DfrB ont été surexprimées en cellules *E. coli* BL21(DE3) afin de préparer des cultures de ZYP-5052 (10 mL) pendant 2 h à 37 °C, puis induits à 22 °C pour 16 – 18 h, 230 rpm. Pour les DfrB-H et les DfrBH-Seg, une préculture de LB (5 mL) fut utilisée afin de préparer des cultures de LB (10 mL) qui furent incubées à 37 °C pendant 3h30 avec agitation à 230 rpm. L'expression de DfrB-H fut induite avec l'ajout de l'IPTG (1 mM), puis remises sous agitation pendant 16 – 18 h à 30 °C, 230 rpm. Les DfrBH-Seg ont été induites avec de l'IPTG (1 mM) pour seulement 3 h à 37 °C, 230 rpm. Toutes les cultures furent centrifugées à 2000 ×g pendant 30 min à 4 °C et les culots ont été incubés à -72 °C jusqu'à utilisation. Les culots furent décongelés à température ambiante (TA) et resuspendus dans 300 µL de tampon de lyse pour 2 h sous agitation vigoureuse. Les lysats furent centrifugés à 2000 ×g pendant 30 min à 4 °C. Les lysats clarifiés furent chauffés aux températures spécifiées pour 10 min, puis refroidis sur glace pendant 10 min et ensuite mis à TA. Les lysats chauffés ont été centrifugés à 2000 ×g pour 15 min, puis ces derniers furent utilisés (10 µL) pour déterminer leur activité dans un volume total de 100 µL de tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7) contenant 100 µM de NADPH et de DHF. L'activité relative (%) des protéines a été déterminée en comparant l'activité du lysat chauffé à celle du lysat à température ambiante (22 °C):

$$\text{Activité relative, } T^{\circ}\text{Chauffage } (\%) = \frac{\text{activité enzymatique à } T^{\circ}\text{C}}{\text{activité enzymatique à } 22^{\circ}\text{C}}$$

4.5 – Résultats et discussion

4.5.1 - Caractérisation de la thermostabilité des DfrB

La thermostabilité des DfrB1 à DfrB5 et DfrB7 fut préalablement investiguée au laboratoire Pelletier dans l'objectif d'établir un protocole de purification (5). Ces six DfrB avaient été choisies comme étant représentatives des huit DfrB qui étaient connues au moment de cette étude. Cette étude n'avait pas systématiquement rapporté l'effet de la température sur l'activité, mais a plutôt investigué quelques conditions afin d'en identifier qui permettent la dénaturation des autres protéines en récupérant efficacement les DfrB solubles. La température maximale rapportée dans cette étude était de 75 °C pour la DfrB1 et DfrB4, tandis que les DfrB2, DfrB3 et DfrB5 furent chauffées à 65 °C (5).

Dans le but de rendre plus robuste la méthodologie de purification, nous avons premièrement entrepris une étude systématique de la thermostabilité de plusieurs DfrB sur une plus grande étendue de températures. À la suite du chauffage des échantillons de lysat de *E. coli* exprimant respectivement la DfrB1, DfrB3, DfrB4, DfrB5 et DfrB7 aux températures sélectionnées (figure 4.2 A), le surnageant fut récolté et l'activité dihydrofolate réductase (Dfr) a été mesurée à 22 °C. L'activité relative de chaque DfrB à chacune des températures testées fut déterminée en les comparant à l'activité sans chauffage (lysat à 22 °C).

Il est à noter que les essais d'activité dihydrofolate réductase ne peuvent pas être directement entrepris à température élevée, étant donné la labilité du DHF et du NADPH. Ainsi, il est requis de refroidir tous les échantillons à une température modérée (30 °C ou moins) pour l'essai d'activité. Nous notons que cette procédure élimine une variable complexe, soit celle de comparer des essais enzymatiques à température variable, où tant l'enzyme, les réactifs et les produits peuvent être affectés par la température.

Toutes les DfrB testées ont conservé entièrement ou partiellement leur activité lorsque chauffées jusqu'à 95 °C. Cette thermostabilité corrèle avec ce qui avait été rapporté précédemment (5).

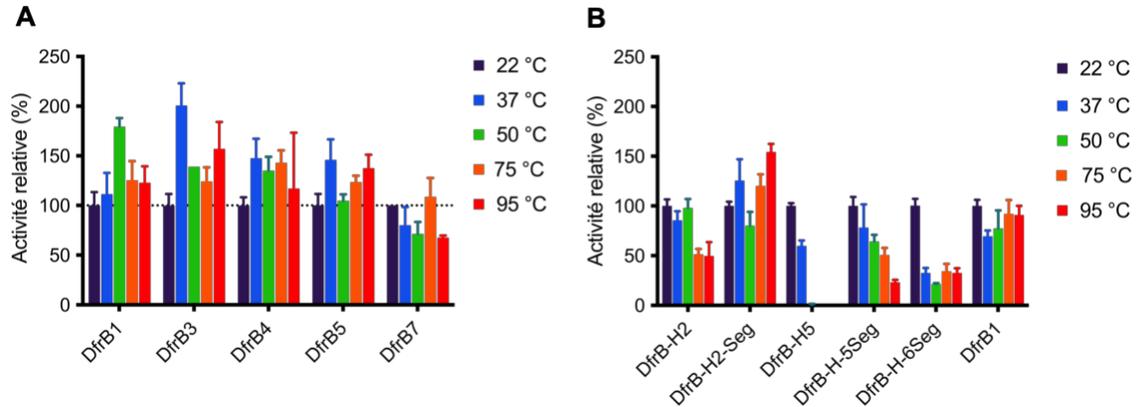


Figure 4.2. Thermostabilité des DfrB, DfrB-H et DfrB-H-Seg. Les lysats de *E. coli* furent chauffés pendant 10 min aux températures indiquées. **A)** Thermostabilité des DfrB. **B)** Thermostabilité des homologues distants DfrB-H2, DfrB-H5 et des segments DfrB-H2-Seg, DfrB-H5-Seg, DfrB-H6-Seg ; DfrB1 sert de contrôle positif. L'activité relative est le ratio de l'activité des espèces chauffées par rapport à l'activité à 22 °C. L'histogramme a été produit par GraphPad Prism 9; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 3).

4.5.2 - Caractérisation de la thermostabilité des homologues distants

DfrB-H

Dans la même optique et sous les mêmes conditions, nous avons déterminé si les homologues distants des DfrB, soit les DfrB-H2 à DfrB-H6, présentés en section 1.2.3 (figure 1.9), montraient un profil de thermostabilité similaire aux membres de la famille DfrB. Avant d'entreprendre ces essais, un test d'expression a été effectué afin de valider la présence d'une protéine DfrB lors des essais de thermostabilité (annexe, figure A3, A4). Ce test a montré des bandes correspondant à chaque homologue, tel qu'attendu (figure 4.3). Toutefois, les homologues DfrB-H3, DfrB-H4 et DfrB-H6 n'ont montré aucune activité Dfr à 22 °C (annexe, figure A2) ; ils ont donc été exclus de l'analyse de thermostabilité.

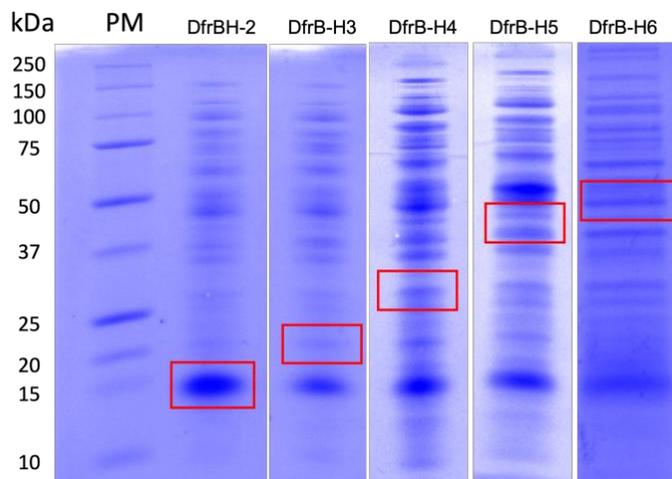


Figure 4.3. Gel dénaturant Glycine-PAGE des lysats protéiques à la suite d’une surexpression des DfrB-H. Lysats avant traitement thermique, maintenus à 22 °C. La bande correspondant au poids moléculaire de chaque homologue est identifiée par un encadré rouge. Poids moléculaires attendus : DfrB-H2 : 12,8 kDa, DfrB-H3 : 20,9 kDa, DfrB-H4 : 27,3 kDa, DfrB-H5 : 41,7 kDa, DfrB-H6 : 51,7 kDa. PM représente les standards de poids moléculaire, en kDa à gauche du gel.

La DfrB-H2 est la plus similaire à la DfrB1. Elle est identique à la DfrB1 dans son domaine SH3-*like* (9). Son extrémité N-terminale non structurée est de 39 résidus, alors que celle de la DfrB1 est de 20 résidus. Il n’était donc pas inattendu que la DfrB-H2 conserve partiellement son activité (50 %) à la suite d’un chauffage à 95 °C. Toutefois, la DfrB-H5, qui comporte un domaine additionnel de deux fois la masse de son domaine SH3-*like* conservé, perd totalement son activité lorsque chauffé à plus de 37 °C (figure 4.2 B). Il est possible que le domaine additionnel se dénature lorsque chauffé, empêchant le repliement des structures secondaires et tertiaires essentielles à la catalyse, lors du refroidissement.

Afin de vérifier si les domaines additionnels au domaine SH3-*like* conservé diminuent la stabilité des homologues, ou interfèrent avec la formation de l’homotétramère actif, la stabilité du domaine SH3-*like* des DfrB-H fut testée en absence de leurs domaines additionnels. Pour ce faire, les ‘segment’ SH3-*like* des DfrB-H2, DfrB-H5 et DfrB-H6 ont été exprimés, et nommés DfrB-H-Seg.

A

	DfrB1	DfrB-H2	DfrB-H3	DfrB-H4	DfrB-H5	DfrB-H6
DfrB1		100	63,5	71,4	62,7	74,0
DfrB-H2	79,6		61,4	50,5	57,4	74,5
DfrB-H3	30,5	35,7		44,4	66,0	56,4
DfrB-H4	20,6	23,0	30,3		49,6	47,0
DfrB-H5	14,0	15,9	20,4	28,6		37,8
DfrB-H6	10,0	11,9	13,5	16,6	18,8	

B

	DfrB1	DfrB-H2-Seg	DfrB-H3-Seg	DfrB-H4-Seg	DfrB-H5-Seg	DfrB-H6-Seg
DfrB1		98,3	55,2	55,2	56,9	55,9
DfrB-H2-Seg	100		55,2	55,2	56,9	55,9
DfrB-H3-Seg	67,2	67,2		46,8	44,8	60,3
DfrB-H4-Seg	69,0	69,0	56,5		60,3	62,1
DfrB-H5-Seg	69,0	69,0	56,9	67,2		52,5
DfrB-H6-Seg	69,5	69,5	70,7	65,5	59,3	

Figure 4.4. Similarité de séquence (%) des DfrB-H et de leur domaine SH3-like. A) Similarité de séquence entre les DfrB-H et la DfrB1. La section du haut représente l'alignement local des séquences à l'aide du logiciel EMBOSS water qui utilise l'algorithme Smith-Waterman. La section du bas représente l'alignement global à l'aide du logiciel EMBOSS needle qui utilise l'algorithme Needleman-Wunsch. **B)** Similarité (%) et identité de séquence (%) entre les DfrB-H-Seg et la DfrB1. La section du haut représente l'identité de séquence (%) et la section du bas représente la similarité de séquence (%) déterminé par l'alignement global des séquences à l'aide du logiciel EMBOSS needle qui utilise l'algorithme Needleman-Wunsch.

La DfrB-H2-Seg, conserve son activité à la suite du chauffage jusqu'à 95 °C, comme les DfrB (figure 4.2 B). C'était attendu, puisque la protéine DfrB-H2 entière conserve 50 % de son activité suite au chauffage et que DfrB-H2-Seg ne diffère que d'un seul résidu de la DfrB1, qui conserve pleinement son activité (Figure 4.2 A). Le segment DfrB-H5-Seg conserve 23% de son activité après chauffage à 95 °C et 64% de son activité après chauffage à 50 °C alors que la DfrB-H5 était entièrement inactivée au-dessus de 37 °C (figure 4.2B). Ceci suggère que la masse additionnelle de la DfrB-H5 est thermolabile. Il est intéressant de remarquer que le segment DfrB-H6-Seg est pleinement actif à 22 °C et conserve entre 32 % d'activité après chauffage jusqu'à 95 °C, alors que

la protéine DfrB-H6 entière ne présente aucune activité, peu importe les conditions. Ceci suggère que la masse additionnelle de la DfrB-H6 interfère avec la formation d'un tétramère fonctionnel du domaine SH3-*like*, requis pour l'activité enzymatique.

Ainsi, l'expression du motif SH3-*like* des DfrB-H5 et DfrB-H6, sans leurs domaines supplémentaires respectifs, donne lieu à des segments SH3-*like* actifs et thermostables. Ceci appuie l'hypothèse que la présence d'un domaine supplémentaire causerait la perte de thermostabilité. Ainsi, les DfrB comportant une similarité de séquence élevée approximativement entre 77 – 95 % (annexe A5) montrent toutes une thermostabilité jusqu'à 95 °C. Cependant, lorsque l'homologie de séquence est plus éloignée (figure 4.4), la thermostabilité est plus variable. Ainsi, le phénotype de thermostabilité est dépendant de la séquence, et pas exclusivement du maintien de la structure.

4.5.3 – Défis relevés lors de l'établissement des essais

Lors des essais initiaux pour les diverses protéines testées, une grande variabilité d'activité résiduelle après chauffage fut observée nécessitant la modification de certaines conditions expérimentales. D'abord, des cultures de 1 mL étaient propagées en plaques profondes de 96 puits, où le lysat d'un puits unique était utilisé pour les essais à une température. Ainsi, cinq cultures bactériennes distinctes étaient produites afin d'effectuer une série d'essais à cinq températures. L'inconvénient de cette approche est que la densité cellulaire peut varier entre chaque puit, engendrant une variabilité de l'expression protéique, affectant la répétabilité des essais et augmentant l'erreur sur les mesures. L'expression protéique en plaque de 96 puits peut également être affectée par une faible oxygénation, comparativement à des cultures en tubes, donnant lieu à une expression protéique faible. Afin de contrer ces problèmes, nous avons préparé des cultures de 10 mL en tubes; le volume de culture était suffisant pour que tous les échantillons d'une série de températures furent pris de la même expression. Ceci s'est traduit par une plus grande reproductibilité des résultats et une meilleure répétabilité des essais. Ainsi, les résultats d'activité présentés dans ce mémoire correspondent aux essais en tubes.

Références du chapitre 4

1. Kumar A, Ghosh D, Radhakrishna M. Surface Patterning for Enhanced Protein Stability: Insights from Molecular Simulations. *J. Phys. Chem. B.* 2019;123(40):8363-9.
2. Modi T, Campitelli P, Kazan IC, Ozkan SB. Protein folding stability and binding interactions through the lens of evolution: a dynamical perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2021;66:207-15.
3. Miotto M, Olimpieri PP, Di Rienzo L, Ambrosetti F, Corsi P, Lepore R, et al. Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecular interactions. *Bioinformatics.* 2019;35(15):2569-77.
4. Zhuang P, Yin M, Holland JC, Peterson CB, Howell EE. Artificial duplication of the R67 dihydrofolate reductase gene to create protein asymmetry. Effects on protein activity and folding. *J. Biol. Chem.* 1993;268(30):22672-9.
5. Toulouse JL, Shi G, Lemay-St-Denis C, Ebert MCCJC, Deon D, Gagnon M, et al. Dual-Target Inhibitors of the Folate Pathway Inhibit Intrinsically Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020;11(11):2261-7.
6. Ebert MC, Morley KL, Volpato JP, Schmitzer AR, Pelletier JN. Asymmetric mutations in the tetrameric R67 dihydrofolate reductase reveal high tolerance to active-site substitutions. *Protein Sci.* 2015;24(4):495-507.
7. Bradrick TD, Shattuck C, Strader MB, Wicker C, Eisenstein E, Howell EE. Redesigning the quaternary structure of R67 dihydrofolate reductase. Creation of an active monomer from a tetrameric protein by quadruplication of the gene. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28031-7.
8. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015;112(24):E3095-E103.
9. Lemay-St-Denis C, Alejaldre L, Jemouai Z, Lafontaine K, St-Aubin M, Hitache K, et al. A conserved SH3-like fold in diverse putative proteins tetramerizes into an oxidoreductase providing an antimicrobial resistance phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2023;378(1871):20220040.

Chapitre 5 – Essais de l’activité de variants mutés de DfrB

5.1 – Objectif de ce chapitre

L’évolution d’une protéine peut être influencée par des mutations génétiques, où ces dernières peuvent altérer l’expression de gènes, la stabilité ou le fonctionnement d’une protéine, conséquemment impactant la performance globale de l’enzyme, dite « fitness ». Ainsi, toute condition modifiant le « fitness » d’une enzyme pourra résulter en une diminution ou une amélioration de son activité. Évaluer les variations de « fitness » d’une enzyme qui subit des mutations génétiques est important afin de mieux comprendre l’évolution naturelle, ou simulée, d’une enzyme.

Le chapitre 5 mettra en place un essai d’activité plus sensible permettant de caractériser l’activité de variants DfrB qui sont faiblement exprimés. Ce chapitre décrit un projet collaboratif entrepris avec le laboratoire du Pr Christian Landry (U. Laval). Le projet consistait à entreprendre la mutagenèse exhaustive de l’enzyme DfrB1, comme système modèle par lequel l’équipe du Pr Landry propose d’étudier, pour une protéine donnée, les effets sur le « fitness » de chaque mutation possible (1).

5.2 – Présentation des variants de DfrB1 sous étude

La DfrB1 fut choisie comme système modèle étant donné qu’elle ne comporte que 78 acides aminés, qu’elle est thermostable (2) et qu’il est possible d’en déterminer l’activité catalytique. Ces facteurs en ont facilité la mutagenèse de chaque position et permettra, en principe, le suivi de l’effet des mutations sur l’activité. Ainsi, les collaborateurs ont préparé une librairie comprenant toutes les possibilités de substitutions pour les résidus 2 à 78 de la séquence de DfrB1, par les 19 autres acides aminés naturels (figure 5.1); la Met à la 1^{ère} position n’est pas modifiée car elle est essentielle à la traduction.

Afin de déterminer rapidement une activité enzymatique, il est avantageux de ne pas devoir purifier l'enzyme. Ceci est particulièrement important lorsqu'on veut travailler avec de nombreux variants. Au chapitre 4, nous avons présenté une méthode pour assurer le suivi de l'activité DfrB directement dans le lysat clarifié de *E. coli*, sans étapes de purification (figure 4.2). Nous avons envisagé d'appliquer cette approche ici.

Étant donné que la DfrB1 est exprimée dans la bactérie *E. coli*, il est nécessaire d'inhiber la Fola de *E. coli* qui sera présente dans le lysat clarifié. L'ajout de TMP servira à assurer que le signal étudié ne provienne que des variants de la DfrB1 étudiés. Les conditions optimales pour inhiber Fola à l'aide de TMP lors d'un essai enzymatique furent donc déterminées.

Enfin, une considération essentielle est le niveau d'expression des variants de la DfrB1 dans le système d'expression choisi par nos collaborateurs. Si le niveau d'expression est faible, alors la concentration de DfrB retrouvée dans un lysat clarifié sera plus faible. Afin de se pencher sur cette question, une brève introduction des systèmes d'expression pertinents à ce projet sera faite.

5.3 – L'expression protéique chez les procaryotes

Chez les procaryotes, les gènes relatifs pour une fonction spécifique ou appartenant à une même voie métabolique sont regroupés ensemble en unités d'ADN fonctionnelles dites opérons (figure 5.2). Afin de déclencher la transcription de ces gènes, chaque opéron possède une séquence d'ADN en amont de celui-ci, appelé promoteur (4).

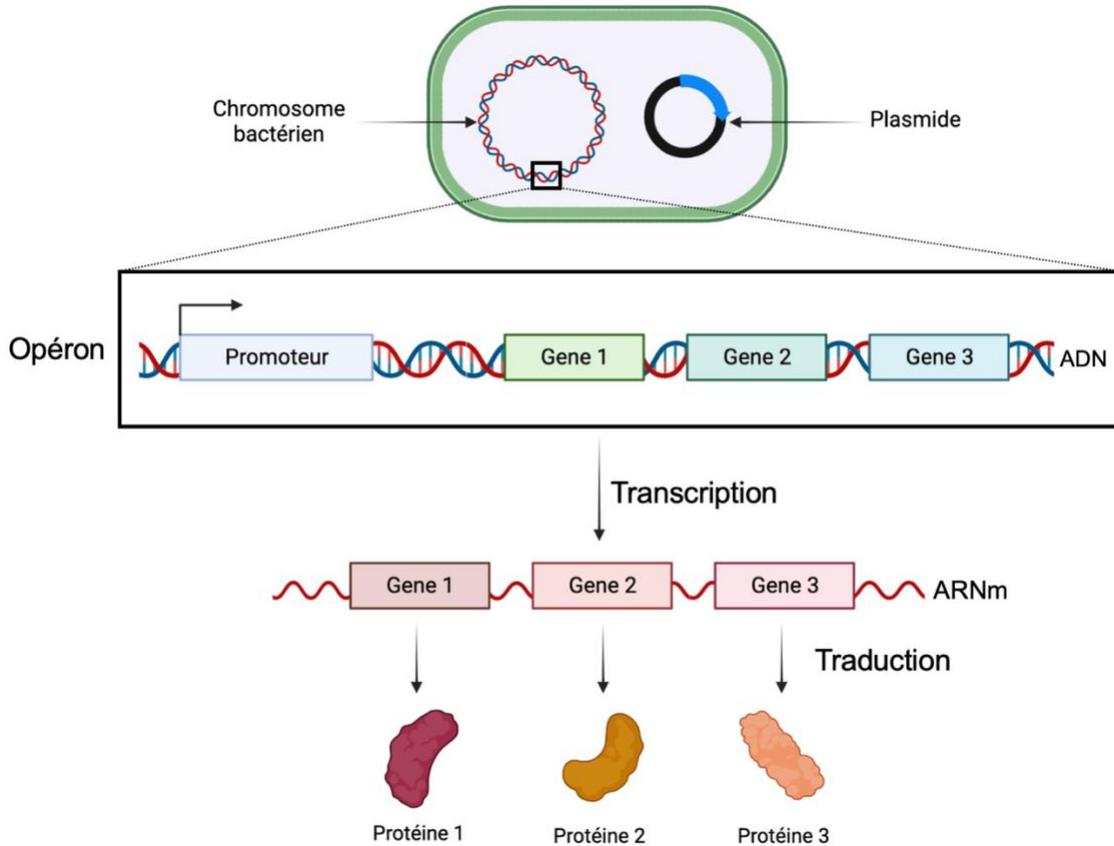


Fig. 5.2. Représentation mécanistique des étapes nécessaires pour la régulation d'un gène en protéine. L'organisation génomique bactérienne est présente sous deux formes, un grand chromosome circulaire et des éléments mobiles sous forme de plasmide. Un opéron est observé lorsque plusieurs gènes sont sous le contrôle du même promoteur. La transcription de ces gènes résultera en un seul ARNm, permettant la traduction de diverses protéines. Figure produite par BioRender.

Les opérons peuvent être inductibles, par exemple, le répresseur peut être activé de manière ubiquitaire empêchant la transcription de l'opéron (5). Lorsque le répresseur est lié à une molécule inductrice, un changement conformationnel de ce premier permet le détachement de l'opérateur, et donc la transcription de l'opéron (5). Dans ce projet, l'opéron inductible lactose (*lac*) fut utilisé (système A) (6). Le gène *lacZ* permet d'exprimer la β -galactosidase, une enzyme qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. L'opéron contient un gène régulateur, *lacI*, codant pour un répresseur. Lorsque le lactose est disponible, le répresseur est inhibé par le lactose, empêchant la liaison du répresseur à l'opérateur. Ainsi, le lactose

induit la traduction d'une protéine placée sous contrôle de cet opérateur (6), soit la DfrB1 servant de contrôle positif d'expression dans le cadre de ce projet.

Un second opéron inductible utilisé dans le contexte de ce projet est l'opéron arabinose (*ara*) (système B). Cet opéron contient deux séquences promotrices, pBAD et pC, et un gène régulateur *araC* dont la transcription est modulée par le promoteur pC (7). Le gène *araC* code pour une protéine régulatrice AraC, qui module négativement ou positivement l'expression de l'opéron (7). En absence d'arabinose, la protéine AraC agit en tant que protéine répressive afin de bloquer la transcription des gènes sous son contrôle en empêchant la liaison au promoteur pBAD (7). À l'inverse, en présence d'arabinose, la protéine AraC agit comme activateur et se lie à l'arabinose. Ce complexe arabinose-AraC induit la transcription des gènes sous son contrôle, soit la DfrB1 ou ses variants mutés. L'avantage principal de l'opéron arabinose est qu'il est modulable : on peut faire varier le niveau de transcription en faisant varier la concentration d'arabinose. Ceci n'est pas le cas du système inductible au lactose, où l'introduction de l'analogue synthétique non-hydrolysable du lactose, l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), donne lieu à une induction maximale.

5.4 – Partie expérimentale

Toutes les précultures et cultures du système A (*lac*) contiennent 50 µg/mL de kanamycine.

Toutes les précultures et cultures du système B (*ara*) contiennent 100 µg/mL d'ampicilline.

5.4.1 – Caractérisation de l'activité enzymatique des mutants et du WT DfrB1 sous le promoteur pBAD.

L'activité enzymatique de la DfrB1 et du contrôle négatif (cTEM19m) du système A (*lac*) fut étudiée *in vitro* à l'aide de lysat de *E. coli* BL21(DE3). Les précultures et cultures des protéines provenant du système A (*lac*) ont été produites selon le protocole (section 4.3.1) avec les modifications suivantes : milieu de culture TB, induction à l'IPTG (1 mM).

L'activité enzymatique de la DfrB1 et des mutants du système B (*ara*) fut étudiée *in vitro* à l'aide de lysat de *E. coli* BL21(DE3). À partir d'une préculture de LB (5 mL) contenant de l'ampicilline, des cultures de TB (10 mL) contenant de l'ampicilline furent préparées à une DO_{600nm} de 0.1, puis mises sous incubation à 37 °C pendant 3 h, 230 rpm. Lorsque la croissance bactérienne a atteint une DO_{600nm} d'environ 0,7 – 1, les cultures furent induites avec 1 % d'arabinose, puis incubé 16 – 18 h à 22 °C, 230 rpm. Les cultures furent centrifugées à 3000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) pendant 30 min à 21 °C, puis resuspendus dans 300 µL de tampon de lyse à l'aide d'agitation vigoureuse pour 2 h. Les lysats furent centrifugés à 3000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R) pendant 30 min à 21 °C. Dans des plaques de 96-puits, les lysats des mutants respectifs furent incubés (20 µL) avec 50 µg/mL de TMP, 100 µM de NADPH et de DHF dans un volume final de 100 µL de phosphate de potassium 50 mM (pH 7). Les réactions furent mesurées à l'aide de la déplétion des substrats à 340 nm pendant 5 min selon une lectrice à plaques (Beckman Coulter DTX880). L'activité enzymatique des mutants respectifs fut mesurée en calculant la vitesse initiale (premier 20 % de la conversion des substrats en produits).

5.5 – Résultats et discussion

5.5.1 - L'expression bactérienne de mutants DfrB1 sous système *ara*

La première étape de cette collaboration fut de vérifier si l'activité des mutants DfrB1 était observable sous le système *ara* (système B : DfrB1 (*ara*)). Ainsi, les conditions expérimentales utilisées pour exprimer les DfrB sous l'opéron *lac* (système A : DfrB1 (*lac*)) furent reproduites à l'exception de l'inducteur utilisé. Pour ce faire, la DfrB1 (*ara*) fut exprimée en plaques de 96 puits avec un volume de culture de 1 mL (section 2.3.2) et induite à l'aide de 1 % arabinose. Une fois les cellules culottées et lysées, nous avons constaté que ce volume de culture était insuffisant pour permettre la détection d'activité à partir de la DfrB1 (*ara*) (tableau 5.1) comparativement au contrôle positif (DfrB1 (*lac*)) qui donne un signal d'absorbance élevée dans les mêmes conditions d'expression et de détection par lysat (10 μ L) (vitesse = 0,12 abs \cdot min⁻¹).

Pour contrer ceci, la DfrB1 sous système *ara* fut exprimé dans divers volumes de cultures allant de 10 mL à 250 mL de TB. Conjointement, le volume de tampon de lyse et la quantité de lysat clarifié ajoutée au puits lors de l'essai d'activité furent investigués. Ceci avait pour but de vérifier si une activité enzymatique pouvait être détectée lorsque la densité bactérienne exprimant les protéines d'intérêt fut largement augmentée, puisque la quantité de protéine produite serait supérieure. À titre de rappel, dans le système A (opéron *lac*), l'activité des DfrB fut détectée avec seulement 10 μ L de lysat produit à partir de 10 mL de culture et resuspendu en 400 μ L de tampon de lyse. Ainsi, il a été possible d'évaluer si l'activité des mutants respectifs pourraient être détectable en concentrant et augmentant la quantité d'enzyme ajoutée dans l'essai.

À l'aide de ces modifications expérimentales, il fut possible de détecter de l'activité Dfr exprimée dans *E. coli* pour la DfrB1 sous le système *ara* (tableau 5.1). En effet, il fut possible d'observer de l'activité enzymatique en utilisant au moins 20 μ L de lysat clarifié obtenu à partir d'un volume de culture de 10 mL resuspendu en 300 μ L de tampon de lyse (tableau 5.1). Il fut important de choisir des conditions permettant d'obtenir un signal de détection assez élevé, puisque certains mutants DfrB1 pouvaient posséder une activité

moindre que celle de la DfrB1. Ainsi, si l'activité DfrB1 était faible, il n'aurait pas été possible de faire une distinction de « fitness » entre les divers mutants DfrB1.

À l'aide de ces résultats (tableau 5.1), il fut possible d'exprimer les mutants DfrB1 sous système *ara* dans un volume de culture de 10 mL resuspendu dans 300 µL de tampon de lyse pour les essais subséquents, où une meilleure oxygénation et expression protéique furent observées dans des tubes comparativement aux plaques de 96 puits de 1 mL par puits. Les cultures de 50 mL et 250 mL ont permis d'obtenir des signaux d'absorbance plus élevées, mais demandaient une quantité de matériel plus grande qu'une culture à 10 mL dans des tubes de culture, expliquant les conditions choisies. Toutefois, l'inconvénient de ces conditions est qu'il n'a pas été possible d'évaluer le « fitness » de 96 mutants simultanément, de sorte qu'un nombre restreint de mutants DfrB1 ont été choisis par le Pr Christian Landry afin d'être caractérisés.

Tableau 5.1 - Activité enzymatique de la DfrB1 sous système *ara*.

Volume de culture (mL)	Volume de lysat / essai (µL)	Vitesse (abs • min ⁻¹)*
1	10	0,002
	10	0,009
10	20	0,034
	50	0,069
50	10	0,018
	20	0,050
	50	0,058
250	10	0,018
	20	0,058
	50	0,102

*Les vitesses de réaction (abs • min⁻¹) furent calculées à l'aide de la régression linéaire de la vitesse initiale (premier 20 % de conversion du substrat) (n = 3, moyenne ± écart-type).

Le deuxième défi fut d'éliminer le signal d'interférence causé par la Fola de *E. coli*. Cette interférence fut observée puisque le contrôle négatif, cTEM19m (*lac*), démontrait un signal d'absorbance plus élevé qu'attendu, lorsque exprimé dans une culture de 10 mL. Pour contrer ceci, une quantité de TMP fut ajoutée à l'essai d'activité, puisque cet antibiotique inhibe sélectivement la Fola de *E. coli* (section 1.1.4). Il fut possible d'évaluer deux

concentrations de TMP, soit 10 µg/mL et 50 µg/mL. La concentration de 10 µg/mL correspond à celle utilisée précédemment comme condition sélective dans *E. coli* pour des variants mutés de DfrB (Schmitzer) et 50 µg/mL fut considérée comme une concentration de TMP en excès.

Tableau 5.2 - Activité enzymatique de la DfrB1 sous système ara, des mutants E2R et E2V et du contrôle négatif cTEM19m sous système lac.

	Vitesse (abs • min ⁻¹)*	
	10 µg/ml TMP	50 µg/ml TMP
DfrB1 <i>ara</i>	0,024 ± 0,007	0,025 ± 0,002
E2R	0,077 ± 0,003	0,062 ± 0,006
E2V	0,06 ± 0,01	0,047 ± 0,009
cTEM19m <i>lac</i>	0,015 ± 0,003	0,002 ± 0,002

*Les vitesses de réaction (abs • min⁻¹) furent calculées à l'aide de la régression linéaire de la vitesse initiale (premier 20 % de conversion du substrat) (n = 3, moyenne ± écart-type).

L'activité enzymatique du contrôle négatif cTEM19m était clairement détectable lorsqu'exprimé dans 10 mL de culture (tableau 5.2). Cette activité est dû à l'enzyme Fola de *E. coli*. En effet, avec une concentration de TMP de 10 µg/mL, le signal d'interférence par Fola était trop élevé pour évaluer fidèlement l'activité de la DfrB1 (*ara*) et de ses mutants respectifs. Ainsi, avec 50 µg/mL de TMP, il fut possible de minimiser le signal d'interférence en lysat concentré, puisque l'activité du contrôle négatif fut négligeable.

5.5.2 – Mutants DfrB1 choisis

Les mutants de la DfrB1 ont été choisis par l'équipe du Pr Landry en fonction du niveau de « fitness » obtenu lors de leurs essais préliminaires. Ils ont observé que les mutants E2V et E2R ont un « fitness » plus élevé en comparaison à la DfrB1 native. Pour les mutants N10A, P19S, S34I, A37F, P52I et E75K, leur « fitness » dépend de l'expression protéique. Finalement, le mutant Q67C inactive le site catalytique, ce qui diminue le « fitness » (8). Le contrôle négatif avec le promoteur pBAD fut fourni par les collaborateurs, soit la protéine ChuA. Cependant, les protéines cTEM19m et DfrB1 du système A (opéron *lac*) furent utilisés afin d'assurer que l'expression et la lyse des cultures soient adéquates lors

des essais. Tel que mentionné, la DfrB1 fut utilisé comme contrôle positif et le cTEM19m fut utilisé comme contrôle négatif puisqu'elle exprime une β -lactamase.

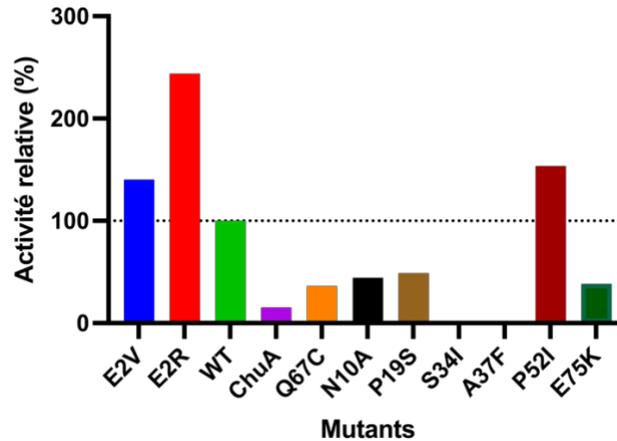


Figure 5.3. Activité relative (%) des mutants et du type-sauvage de la DfrB1 sous le promoteur pBAD. Les cellules furent exprimées en bactéries *E. coli* BL21 sous le promoteur pBAD. L'activité Dfr des mutants fut déterminée par lysat à la suite de leur surexpression. La consommation des substrats fut détectée à 340 nm pendant 5 min. La vitesse de réaction ($\text{abs} \cdot \text{min}^{-1}$) des homologues fut calculée à l'aide de la régression linéaire de la vitesse initiale (premier 20 % de conversion du substrat) ($n = 3$, moyenne \pm écart-type). Le contrôle négatif correspond à ChuA. La DfrB1 sous système *ara* correspond à WT.

Parmi les 9 mutants de DfrB1 obtenus, seulement les mutants E2V, E2R et P52I ont démontré une activité enzymatique supérieure à la DfrB1 native (WT, pour *wild type*), exprimée sous le système arabinose. Il est connu que la substitution des premiers codons d'une séquence protéique a le potentiel d'augmenter l'expression de cette dernière, et donc d'augmenter son « fitness » (9). Il est possible d'observer (figure 5.3) que les mutants Q67C, N10A, P19S, S34I, A37F et E75K ont une activité enzymatique inférieure au WT, ceci pouvant être dû à une plus faible expression de ces protéines.

Dans ce chapitre, nous avons démontré l'importance de l'oxygénation et la densité des cultures bactériennes où les bactéries ont été incubées dans un volume supérieur à 1 mL dans des tubes au lieu d'une plaque 96 puits. De plus, l'ajout de TMP dans les essais d'activité a permis de minimiser l'interférence causée par Fola de *E. coli*. À l'aide de ces

optimisations, il fut possible de caractériser l'activité de divers mutants de la DfrB1, où l'expression de ces mutants à influencer leur « fitness ». Ces essais seront d'une grande utilité afin d'évaluer quelles mutations seraient bénéfiques pour le « fitness » de la DfrB1, lors d'une pression sélective par exemple.

Références du chapitre 5

1. Cisneros AF, Gagnon-Arsenault I, Dubé AK, Després PC, Kumar P, Lafontaine K, et al. Epistasis between promoter activity and coding mutations shapes gene evolvability. *bioRxiv*. 2022:2022.06.07.495002.
2. Zhuang P, Yin M, Holland JC, Peterson CB, Howell EE. Artificial duplication of the R67 dihydrofolate reductase gene to create protein asymmetry. Effects on protein activity and folding. *J. Biol. Chem.* 1993;268(30):22672-9.
3. Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat. Biotechnol.* 2003;21(11):1267-.
4. Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: a revolutionary paradigm. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2012;88(9):485-508.
5. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 2014;5:172.
6. Wanner BL, Kodaira R, Neidhardt FC. Regulation of lac operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J. Bacteriol.* 1978;136(3):947-54.
7. Schleif R. AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010;34(5):779-96.
8. Strader MB, Smiley RD, Stinnett LG, VerBerkmoes NC, Howell EE. Role of S65, Q67, I68, and Y69 residues in homotetrameric R67 dihydrofolate reductase. *Biochemistry.* 2001;40(38):11344-52.
9. Verma M, Choi J, Cottrell KA, Lavagnino Z, Thomas EN, Pavlovic-Djuranovic S, et al. A short translational ramp determines the efficiency of protein synthesis. *Nat. Commun.* 2019;10(1):5774.

Chapitre 6 - Conclusion et perspectives

Au cours de ce projet de maîtrise, il a été possible de développer une gamme d'essais s'adressant à diverses applications spécifiques des enzymes de type DfrB ou de leurs homologues. Les projets en cours au laboratoire Pelletier et chez certains collaborateurs exigent d'évaluer les propriétés telles que l'activité enzymatique de variants de DfrB, leur inhibition par de nouveaux inhibiteurs potentiels ou encore leur thermostabilité.

Dans plusieurs cas, il sera avantageux d'exécuter en parallèle des dizaines d'essais, que ce soit pour caractériser des nouveaux homologues proches des DfrB (Chapitre 2). Dans ce contexte, l'application des essais enzymatique semi-automatisés développés ici permet de caractériser leur activité enzymatique ainsi que leur résistance au TMP. Il fut possible d'investiguer l'activité Dfr en lysat cellulaire de séquences nouvellement identifiées par recherche métagénomique. Il fut ainsi possible d'identifier 10 nouveaux membres DfrB, soit DfrB12 à DfrB21 (manuscrit en préparation – Stella Cellier-Goetghebeur, Kiana Lafontaine, Claudèle Lemay-St-Denis, Alexis Bonneau-Burke, Janine N. Copp et Joelle N. Pelletier. « *Discovery of highly trimethoprim resistant DfrB dihydrofolate reductases in various genomic contexts and environmental settings suggests potential evolutionary advantage* »).

Ces nouvelles DfrB confèrent une résistance élevée au TMP (CMI >600 µg/mL) et possèdent de l'activité Dfr détectable par spectrophotométrie. La DfrB12 fait exception : bien qu'elle permette la croissance bactérienne jusqu'à 150 µg/mL de TMP, aucune activité Dfr ne fut détectée en lysat cellulaire. L'absence d'activité détectable en lysat pourrait être expliquée par la substitution Q67H dans la tétrade catalytique Val66-Gln67-Ile68-Tyr69. Une purification permettrait d'obtenir une concentration plus élevée de la protéine DfrB12, offrant la possibilité de détecter une activité plus faible. De plus, il serait intéressant d'évaluer le profil d'inhibition (K_i , IC_{50}) du TMP sur la DfrB12 afin d'expliquer les résultats obtenus par CMI pour cette protéine.

La caractérisation de la thermostabilité de divers membres DfrB et d'homologues DfrB-H à l'aide de lysats cellulaires a permis de conclure que l'entièreté des DfrB maintiennent leur activité à la suite d'un chauffage à 95 °C (Chapitre 4). Cependant, chez les homologues distants, seule la DfrB-H2 a montré un profil de thermostabilité similaire à la DfrB1. L'identité de séquence étant très

élevée entre la DfrB1 et DfrB-H2 (100 %) et que seules les extrémités N-terminale sont différentes, ce résultat était attendu. En effet, l'extrémité N-terminale n'influence pas l'activité Dfr et est seulement requise pour l'expression protéique. Aussi, la DfrB-H5 maintient son activité lorsque chauffé jusqu'à 50 °C. Cette observation pourrait être expliquée par la présence de domaines protéiques supplémentaires chez chaque autre homologue distant, déstabilisant la structure significativement. En raison d'une absence d'activité détectée en lysat pour les homologues DfrB-H3, DfrB-H4 et DfrB-H6, leur profil de thermostabilité n'a pu être déterminée.

Afin d'évaluer l'importance du domaine SH3-*like* qui forme le site actif des DfrB, des segments protéiques (DfrB-H-Seg), contenant seulement les séquences représentant le domaine SH3-*like*, ont été produits à partir des homologues DfrB-H2 à DfrB-H6, et leur profil de thermostabilité fut déterminée. Ainsi, les segments DfrB-H2-Seg, DfrB-H5-Seg et DfrB-H6-Seg maintiennent leur activité à la suite d'un chauffage à 95 °C. Ceci appuie l'hypothèse que les domaines protéiques supplémentaires présent sur les homologues distants DfrB-H5 et DfrB-H6 déstabilisent la structure protéique lorsque chauffés.

La détermination de l'activité enzymatique en lysat permet de réduire considérablement les manipulations associées aux processus de purification de protéines et permet d'être appliquée sur un grand nombre d'échantillons simultanément. Ainsi, ces essais pourront être appliqués dans le criblage à haut-débit d'activité Dfr chez de nouvelles protéines. Au cours des derniers mois, plusieurs dizaines de nouveaux homologues proches et plusieurs dizaines d'homologues distants des DfrB ont été identifiés informatiquement au laboratoire Pelletier, qui seront caractérisés selon les méthodes développées ici.

Les essais à haut-débit en lysat bactérien rapportés ici pourront potentiellement permettre également la caractérisation des paramètres K_M et k_{cat} . Ces essais exigent de tester chaque variant avec une gamme de concentrations de substrat, de sorte qu'un essai parallélisé serait avantageux. Le défi consiste à obtenir des données robustes à partir de lysat bactérien – pour éviter les longues purifications de chaque variant – alors que les valeurs d'absorbance seront faibles aux plus faibles concentrations de substrat utilisées. Une alternative consiste à utiliser l'approche « *single progress curve* » qui permet de caractériser les paramètres cinétiques d'une enzyme (K_M , k_{cat} , V_{max}) en une seule réaction enzymatique. La réaction enzymatique mesure la concentration de substrat ou de produit sur un laps de temps étendu (complétion de la réaction), permettant d'obtenir un nombre

élevé de données simultanément (1). À l'aide de ces données, les paramètres cinétiques sont déterminés *in silico* par calculs différentiels qui tiennent compte de la concentration de substrat ou de produit à tout moment au cours de la réaction (1). Ainsi, plutôt que de tester une gamme de concentrations de substrat, les différentes concentrations sont dérivées à même la courbe réactionnelle. Cette méthode peut être utilisée afin d'étudier de l'inhibition compétitive. Toutefois, il est important d'avoir une concentration d'enzyme [E] largement inférieure à la somme de la concentration de substrat [S] et du K_M (2) ; de plus, il est essentiel que l'enzyme ne soit pas inhibée par son produit afin que la réaction progresse jusqu'à la complétion.

Dans l'optique de développer un inhibiteur spécifique envers la famille des DfrB afin de limiter leur résistance au TMP, des essais furent appliqués pour cribler des composés en tant qu'inhibiteurs potentiels de la DfrB1 purifiés (Chapitre 3). Aucun composé prometteur n'a été identifié parmi les 40 qui furent testés; la faible solubilité aqueuse d'une proportion importante des composés constitue un grand défi.

Ces essais d'inhibition ont permis d'investiguer l'inhibition de l'homologue distant DfrB-H5 avec deux familles d'inhibiteurs spécifiques à la DfrB1 découverts par le groupe Pelletier, soit les inhibiteurs de type bisbenzimidazole et les bissubstrats. À l'aide d'essais d'activité en présence de ces inhibiteurs, nous avons démontré que les profils d'inhibition (K_i , IC_{50}) pour la DfrB-H5 obtenus sont similaires à la DfrB1, soit dans le faible micromolaire (μM). Cette similarité est intéressante puisqu'un inhibiteur spécifique aux DfrB pourrait servir d'inhibiteur à leurs homologues présents dans le même résistosome. Il est également important de continuer le développement et l'optimisation des inhibiteurs spécifiques aux DfrB afin de contrôler la résistance au TMP.

Enfin, nous avons appliqué les essais d'activité en lysat bactérien pour caractériser l'activité de variants mutés de la DfrB1 (Chapitre 5). Étant donné leur faible expression dans le contexte du système inductible par l'arabinose, les essais à haut-débit en plaques de 96 puits n'ont pas pu être envisagés. Au lieu, l'application de plusieurs stratégies en simultanément, telle l'augmentation du volume de culture bactérienne suivie de la lyse en volume réduit pour concentrer l'enzyme, et l'inhibition du bruit de fond causé par la Dfr Fola de *E. coli* à l'aide de TMP, ont permis l'acquisition de données d'activité d'excellente qualité (manuscrit soumis : A. Cisneros, I. Gagnon-Arsenault, A. Dubé, P. Després, P. Kumar, K. Lafontaine, J. Pelletier, C. Landry. « *Epistasis between promoter activity and coding mutations shapes gene evolvability* »)

Ainsi, ce projet a permis d'acquérir davantage de connaissances sur la famille d'enzymes DfrB et leurs homologues distants. Plusieurs aspects tels que l'activité, la thermostabilité et l'inhibition enzymatique ont pu être investigués à l'aide d'essais enzymatiques diversifiés. Ces données serviront afin de poursuivre l'étude de protéines DfrB homologues, importantes dans le développement d'un inhibiteur visant à limiter la résistance au TMP conférée par cette famille d'enzymes.

Références du chapitre 6

1. Zavrel M, Kochanowski K, Spiess AC. Comparison of different approaches and computer programs for progress curve analysis of enzyme kinetics. *Eng. Life Sci.* 2010;10(3):191-200.
2. Choi B, Rempala GA, Kim JK. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Sci. Rep.* 2017;7(1):17018.

Annexes

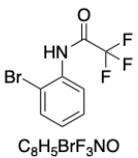
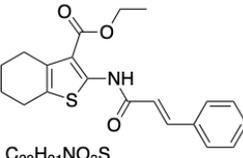
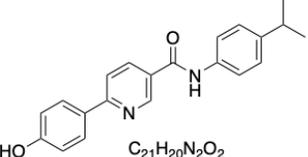
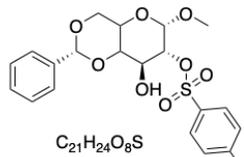
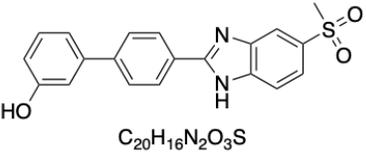
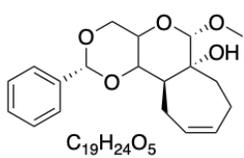
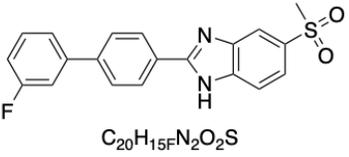
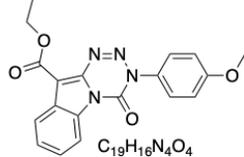
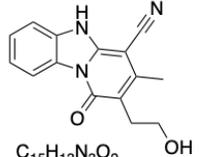
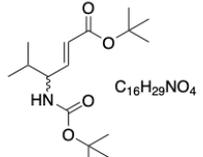
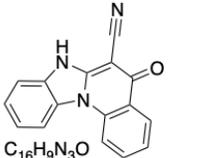
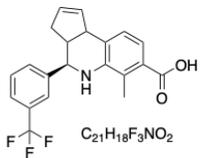
Chapitre 2

[TMP] µg/mL	DfrB1	DfrB12	DfrB13	DfrB14	DfrB15	DfrB16	DfrB17	DfrB18	DfrB19	DfrB20	DfrB21	cTEM19m
0,0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4,7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
9,4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
18,4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
37,5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
75	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
150	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
300	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X
600	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X

Figure A1. CMI des homologues proches, de la DfrB1 et de cTEM19m. Les bactéries encodant les homologues, DfrB1 et cTEM19m respectives furent inoculées sur un milieu solide de LB-agar contenant une variation de concentration de TMP (0 à 600 µg/mL), puis mises à 37 °C pendant 16 – 18 h. La croissance bactérienne visible est représentée par un crochet et l'absence de croissance bactérienne est représentée par un X. DfrB1 a servi de contrôle positif et cTEM19m a servi de contrôle négatif. Les essais CMI ont été effectués en triplicata (n = 3).

Chapitre 3

Tableau A1. Structure non-confidentiel des composés de l'IRIC du criblage préliminaire*.

ID Composé	Structure	ID Composé	Structure
UM0127518	 C ₈ H ₅ BrF ₃ NO	UM0130793	 C ₂₀ H ₂₁ NO ₃ S
UM0128404	 C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	UM0131600	 C ₂₁ H ₂₄ O ₈ S
UM0129534	 C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	UM0131660	 C ₁₉ H ₂₄ O ₅
UM0129535	 C ₂₀ H ₁₅ FN ₂ O ₂ S	UM0136277	 C ₁₉ H ₁₆ N ₄ O ₄
UM0130461	 C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂	UM0137707	 C ₁₆ H ₂₉ NO ₄
UM0130616	 C ₁₆ H ₉ N ₃ O	UM0138569	 C ₂₁ H ₁₈ F ₃ NO ₂

* La structure des composés testés suivants sont confidentielles : UM0126408, UM0127754, UM0128527, UM0128640, UM0129155, UM0129545, UM0130167, UM0130359, UM0131098, UM0131187, UM0131202, UM0131305, UM0131553, UM0131680, UM0131774, UM0131775, UM0132438, UM0134461, UM0134464, UM0134585, UM0134876, UM0135379, UM0136374, UM0137010, UM0137986 et UM0138286.

Chapitre 4

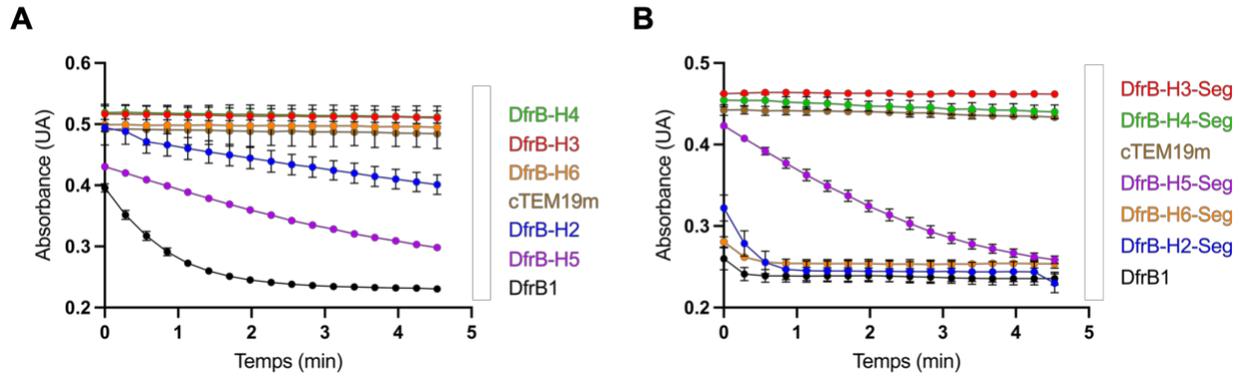


Figure A2. Activité enzymatique DfrB-H et DfrB-H-Seg. **A)** L'activité des homologues DfrB-H2 à DfrB-H6, du contrôle positif DfrB1 et du contrôle négatif cTEM19m. **B)** L'activité des segments DfrB-H2-Seg à DfrB-H6-Seg, du contrôle positif DfrB1 et du contrôle négatif cTEM19m. L'activité des homologues et segments fut mesurée à l'aide de la déplétion du signal d'absorbance (conversion des substrats en produits) pendant 5 min en utilisant les lysats *E. coli* respectifs. Les pentes furent produites par GraphPad Prism 9; les barres d'erreur représentent l'écart-type.

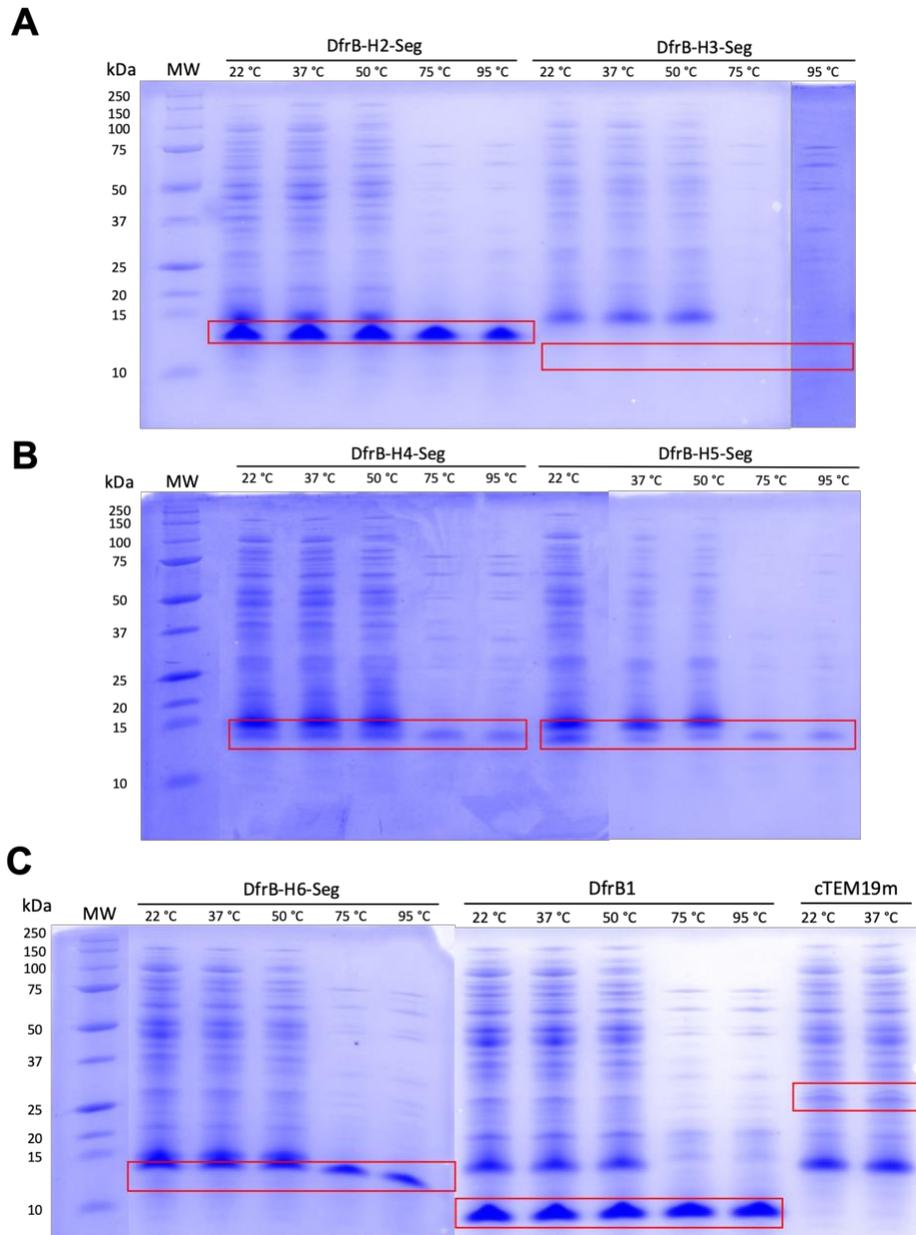


Figure A3. Gel Glycine-PAGE des lysats protéiques surexprimés encodant les segments DfrB-H-Seg où l'activité Dfr fut investiguée. Lysats des cellules à 22 °C et ceux chauffés à 30 °C, 50 °C, 75 °C et 95 °C pendant 10 min. **A)** Expression protéique des segments DfrB-H2-Seg et DfrB-H3-Seg. **B)** Expression protéique des segments DfrB-H4-Seg et DfrB-H5-Seg. **C)** Expression protéique des segments DfrB-H6-Seg, du contrôle positif DfrB1 et du contrôle négatif cTEM19m. La bande correspondant aux segments respectifs est représenté en encadrés rouge. Le poids moléculaire des segments est DfrB-H2-Seg : 11,0 kDa, DfrB-H3-Seg : 11,4 kDa, DfrB-H4-Seg : 10,9 kDa, DfrB-H5-Seg : 10,9 kDa, DfrB-H6-Seg : 11,0 kDa, DfrB1 : 11,0 kDa et cTEM19m : 30,8 kDa. PM représente le poids moléculaire, en kDa.

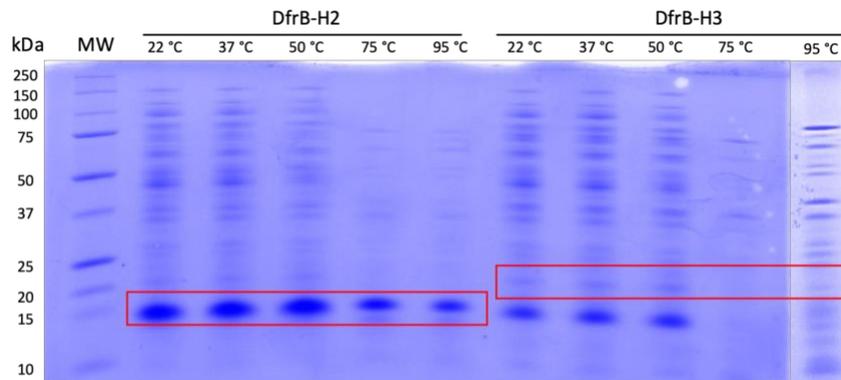
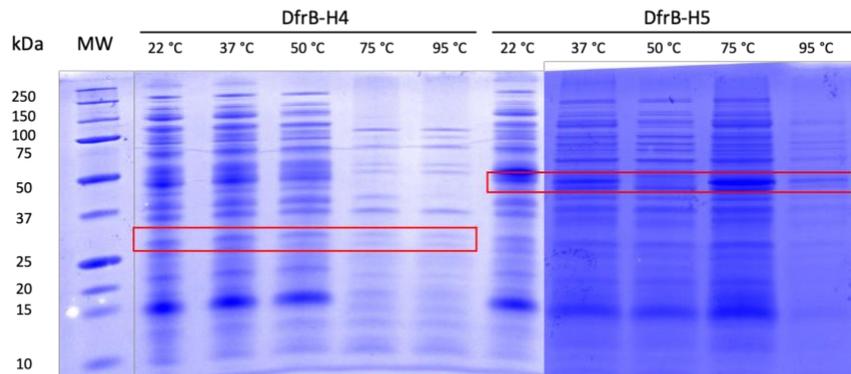
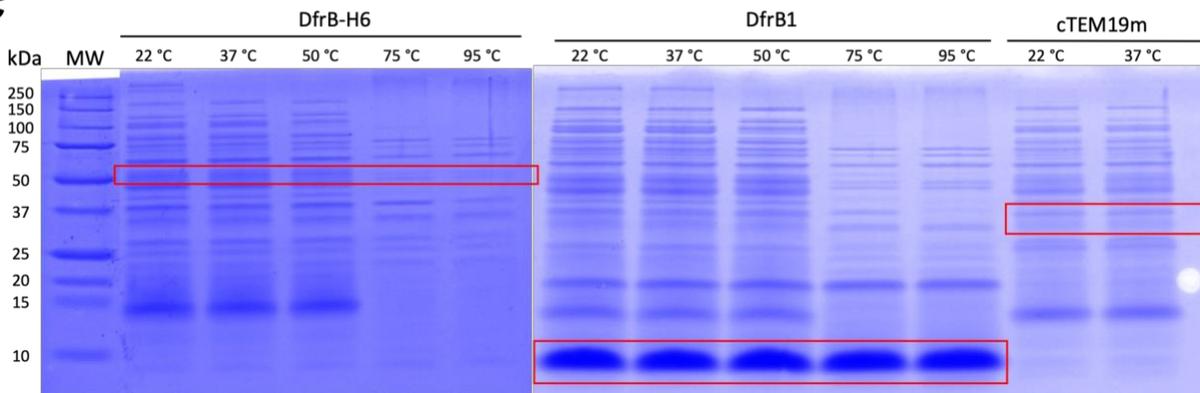
A**B****C**

Figure A4. Gel Glycine-PAGE des lysats protéiques surexprimés encodant les homologues DfrB-H où l'activité Dfr fut investiguée. Lysats des cellules à 22 °C et ceux chauffés à 30 °C, 50 °C, 75 °C et 95 °C pendant 10 min. **A)** Expression protéique des homologues DfrB-H2 et DfrB-H3 **B)** Expression protéique des homologues DfrB-H4 et DfrB-H5. **C)** Expression protéique des homologues DfrB-H6, du contrôle positif DfrB1 et du contrôle négatif cTEM19m. La bande correspondant aux homologues respectifs est représenté en encadrés rouge. Le poids moléculaire des segments est DfrB-H2: 12,8 kDa, DfrB-H3 : 20,9 kDa, DfrB-H4 : 27,3 kDa, DfrB-H5 : 41,5 kDa, DfrB-H6 : 51,7 kDa, DfrB1 : 11,0 kDa et cTEM19m :30,8 kDa. PM représente le poids moléculaire, en kDa.