



**HAL**  
open science

**CARACTERISATION EXHAUSTIVE DES  
SUBSTITUTIONS DE PENICILLIN-BINDING  
PROTEINS INTERVENANT DANS LA RESISTANCE  
AUX  $\beta$ -LACTAMINES CHEZ STREPTOCOCCUS  
PNEUMONIAE**

Raphael Carapito

► **To cite this version:**

Raphael Carapito. CARACTERISATION EXHAUSTIVE DES SUBSTITUTIONS DE PENICILLIN-BINDING PROTEINS INTERVENANT DANS LA RESISTANCE AUX  $\beta$ -LACTAMINES CHEZ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00131811

**HAL Id: tel-00131811**

**<https://theses.hal.science/tel-00131811>**

Submitted on 19 Feb 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## THESE

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université Joseph Fourier**

Discipline: Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

**RAPHAËL CARAPITO**

le 8 juin 2006

## **CARACTERISATION EXHAUSTIVE DES SUBSTITUTIONS DE PENICILLIN-BINDING PROTEINS INTERVENANT DANS LA RESISTANCE AUX $\beta$ -LACTAMINES CHEZ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

**Composition du jury :**

<b>M. Wim Burmeister</b>	<b>Directeur du jury</b>
<b>M. Bernard Joris</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Dominique Mengin-Lecreux</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Didier Busso</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Thierry Vernet</b>	<b>Directeur de thèse</b>

Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de l'Institut de  
Biologie Structurale *Jean-Pierre Ebel*



## Remerciements

J'exprime toute ma gratitude à Thierry Vernet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils, sa motivation et sa confiance en mon travail.

Je remercie André Zapun pour son encadrement, son constant intérêt pour mon travail et ses conseils avisés.

Tous mes remerciements à Messieurs Bernard Joris de l'Université de Liège et Dominique Mengin-Lecreulx de l'Université Paris-Sud pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

J'exprime ma sincère gratitude envers Messieurs Wim Burmeister du Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale de Grenoble et Didier Busso de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie Andréa Dessen, Pauline Macheboeuf, Carlos Contreras-Martel et Otto Dideberg pour leur aide et leurs conseils lors des essais de cristallogénèse.

Merci à Yves Dupont et Vincent Forge du Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire du CEA-Grenoble pour leur soutien concernant l'utilisation de l'appareil de cinétique rapide.

Je tiens aussi à remercier Dominique Champelovier et Jacques Croizé du CHU de Grenoble pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Un grand merci à Anne-Marie Di Guilmi pour m'avoir soutenu et conseillé pendant les périodes difficiles et pour la relecture du manuscrit.

Je suis tout particulièrement reconnaissant à tous les membres du laboratoire : Anne-Marie, Audrey, Cécile, Claire, Danielle, Elodie, Estelle, Evelyne, Marjo, Régina, Soizic, Steph, Véronique, André, Benoît, Clément, Florent, Julien, Tanguy et Thierry. Merci pour leur amitié et pour avoir veillé à ce que l'ambiance soit toujours des plus agréables au laboratoire.

Je tiens aussi à remercier le CEA pour le financement du projet par un contrat de formation par la recherche ainsi que la commission européenne pour le financement LSMH-CT-COBRA 2003-503335 du 6<sup>ème</sup> programme cadre européen.



Merci Agnès pour tout, HDL.

## **Contribution aux travaux**

J'ai réalisé l'ensemble des travaux présentés dans les publications n° I et II. Les gènes R6-*pbp2x* mutés au niveau des positions 338 et 339 m'ont été fournis par Nicolas Mouz et Laurent Chesnel. Ces mutagenèses ont été réalisées lors de leurs travaux de thèse au Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules. Le test de digestion tryptique utilisé pour les travaux présentés dans la publication n° II a été mis au point par Laurent Chesnel. Benoît Gallet du même laboratoire a créé le protocole automatisé de transformation des bactéries.

J'ai réalisé les expériences de quantification de niveau d'expression des protéines PBP2x, PBP1a et PBP2b présentées dans la publication n° III.

Les publications ont été rédigées avec l'aide d'André Zapun et de Thierry Vernet.

## Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ASPRE	« Active-site Serine Penicillin Recognizing Enzymes »
bp	Paires de bases
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
dNTP	Desoxyribonucléotide triphosphate
ESRF	« European Synchrotron Radiation Facility »
FACS	« Fluorescence Activated Cell Sorting »
FIP	« French beamline of Investigations of Proteins »
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GlcNac	N-acétyl-glucosamine
GT	Glycosyltransférase
GST	Glutathion-S-Transférase
kDa	Kilodalton
LIC	« Ligation Independent Cloning »
MBP	Maltose-Binding Protein
MurNac	N-acétyl-muramique
PBP	« Penicillin-Binding Protein »
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
rpm	Rotations par minute
S2d	Acide N-benzoyl-D-alanylmercaptoacétique
SDS	Sodium-Dodécyl-Sulfate
SLIM	« Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis »
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
Tris	Tri(hydroxyméthyl) aminométhane
TP	Transpeptidase
YFP	« Yellow Fluorescent Protein »

# PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE ..... 1

## Les Penicillin-Binding Proteins et la résistance aux $\beta$ -lactamines..... 2

<b>I Les Penicillin-Binding Proteins (PBPs).....</b>	<b>2</b>
<b>I.1 Le peptidoglycane .....</b>	<b>2</b>
I.1.1 La structure du peptidoglycane .....	2
I.1.2 La synthèse du peptidoglycane.....	4
<b>I.2 Structure primaire des PBPs .....</b>	<b>5</b>
<b>I.3 Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à la pénicilline .....</b>	<b>6</b>
<b>I.4 Fonction des PBPs.....</b>	<b>6</b>
I.4.1 L'activité glycosyltransférase.....	7
I.4.2 L'activité transpeptidase.....	8
I.4.3 L'activité carboxypeptidase.....	9
<b>II Les <math>\beta</math>-lactamines .....</b>	<b>10</b>
<b>II.1 Bref historique des <math>\beta</math>-lactamines .....</b>	<b>10</b>
<b>II.2 Classification des <math>\beta</math>-lactamines.....</b>	<b>10</b>
<b>II.3 Mode d'action des <math>\beta</math>-lactamines .....</b>	<b>11</b>
<b>III Les mécanismes de résistance aux <math>\beta</math>-lactamines médiées par les PBPs.....</b>	<b>14</b>
<b>III.1 Mécanismes impliquant des PBPs supplémentaires .....</b>	<b>14</b>
III.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
III.1.2 Entérocoques.....	15
<b>III.2 Mécanismes impliquant le remaniement des gènes de PBPs endogènes.....</b>	<b>16</b>
III.2.1 <i>Neisseria</i> .....	16
III.2.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	16
III.2.2.1 Compétence naturelle de <i>S. pneumoniae</i> .....	17
III.2.2.2 PBPs et gènes mosaïques .....	17
III.2.2.3 Caractérisation cinétique des PBPs du pneumocoque .....	18
III.2.2.4 Les mutations de PBP2x .....	19
III.2.2.5 Les mutations de PBP2b .....	22
III.2.2.6 Les mutations de PBP1a .....	23
<b>IV Conclusion .....</b>	<b>25</b>

## Les méthodes à haut-débit et l'automatisation en biologie moléculaire, biochimie et biologie structurale..... 26

<b>I Pourquoi l'automatisation ? .....</b>	<b>26</b>
<b>II Capacités des automates .....</b>	<b>27</b>
<b>II.1 Manipulation de liquides .....</b>	<b>28</b>
<b>II.2 Bras robotisés, éléments mobiles et stockage.....</b>	<b>29</b>
<b>II.3 Thermocycleurs .....</b>	<b>30</b>
<b>II.4 Stations de lavages, de filtrations et modules magnétiques .....</b>	<b>30</b>
<b>II.5 Incubateurs, agitateurs et portoirs .....</b>	<b>31</b>
<b>II.6 Détecteurs et caméras.....</b>	<b>32</b>
<b>II.7 Microfluidique .....</b>	<b>32</b>
<b>II.8 Logiciels de pilotage .....</b>	<b>33</b>
<b>II.9 Gestions de données.....</b>	<b>33</b>
<b>III Principales applications haut-débit automatisées.....</b>	<b>34</b>
<b>III.1 Biologie moléculaire.....</b>	<b>34</b>
III.1.2 Clonage .....	34
III.1.2 Mutagenèse dirigée .....	36

III.1.3 Séquençage d'ADN .....	38
III.1.4 Technologie des puces .....	38
<b>III.2 Biochimie .....</b>	<b>39</b>
III.2.1 Expression et purification de protéines recombinantes .....	39
III.2.1.1 Les systèmes d'expression .....	39
III.2.1.2 Criblage d'expression et de solubilité .....	40
III.2.1.3 Lyse .....	41
III.2.1.4 Purification .....	41
III.2.1.5 Repliement <i>in vitro</i> .....	42
III.2.2 Tests fonctionnels .....	42
III.2.3 Méthodes analytiques .....	45
<b>III.3 Biologie structurale : cristallogénèse.....</b>	<b>45</b>
 <b>PRESENTATION DU TRAVAIL .....</b>	 <b>47</b>
 <b>RÔLE DES SUBSTITUTIONS DE PBP2<sub>x</sub> DANS LA RESISTANCE DE <i>S. PNEUMONIAE</i> AUX β-LACTAMINES.....</b>	 <b>51</b>
<b>Matériels et Méthodes : publication n° I.....</b>	<b>52</b>
<b>Résultats et Discussion : publication n° II .....</b>	<b>53</b>
 <b>RÔLE DES SUBSTITUTIONS DE PBP1<sub>a</sub> DANS LA RESISTANCE DE <i>S. PNEUMONIAE</i> AUX β-LACTAMINES.....</b>	 <b>56</b>
<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>57</b>
<b>I Plasmides et mutagenèse dirigée .....</b>	<b>57</b>
I.1 Clonage.....	57
I.2 Mutagenèse dirigée .....	59
I.3 Translocation de domaine .....	59
<b>II Expression et purification de protéines.....</b>	<b>61</b>
II.1 Souche et conditions d'expression.....	61
II.2 Purification des protéines .....	61
<b>III Détermination de l'efficacité d'acylation.....</b>	<b>63</b>
III.1 La fluorescence intrinsèque .....	63
III.2 Instrumentation et conditions expérimentales .....	63
III.3 Traitement des données.....	64
<b>IV Caractérisation phénotypique de <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>65</b>
IV.1 Transformation de <i>S. pneumoniae</i> R6.....	65
IV.2 Détermination de concentrations minimales inhibitrices.....	65
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>66</b>
<b>I Les PBP1<sub>a</sub> de souches cliniques résistantes de <i>S. pneumoniae</i> .....</b>	<b>66</b>
I.1 Classification des séquences de PBP1 <sub>a</sub> .....	66
I.2 Comparaison des séquences des différents groupes .....	67
I.3 Caractérisation d'une PBP1 <sub>a</sub> de chaque groupe .....	69
I.3.1 Caractérisation fonctionnelle.....	69



I.3.2 Caractérisation phénotypique .....	70
<b>II Rôle des mutations T371A et T(574)SQF→NTGY .....</b>	<b>70</b>
<b>II.1 Rôle des mutations <i>in vitro</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>II.2 Rôle des mutations <i>in vivo</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>III Rôle des mutations de PBP1a externes au domaine TP .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>77</b>
<b>I Apport de l'automatisation à l'étude du phénomène de résistance .....</b>	<b>78</b>
<b>II Deux types de mécanismes de résistance peuvent être combinés.....</b>	<b>79</b>
<b>III Généralisation des mécanismes moléculaires de résistance.....</b>	<b>80</b>
<b>IV Les autres acteurs de la résistance .....</b>	<b>81</b>
<b>V Applications potentielles des résultats de cette étude.....</b>	<b>82</b>
<b>V.1 Diagnostique moléculaire.....</b>	<b>82</b>
<b>V.2 Le développement de nouveaux antibiotiques .....</b>	<b>82</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>84</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>98</b>
<b>I Publication n°III .....</b>	<b>99</b>
<b>II Séquences des oligonucléotides pour la mutagenèse dirigée de PBP2x et PBP1a ....</b>	<b>100</b>

# PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE

## **Présentation bibliographique**

### **Les Penicillin-Binding Proteins et la résistance aux $\beta$ -lactamines**

#### **I Les Penicillin-Binding Proteins (PBPs)**

##### **I.1 Le peptidoglycane**

C'est en voulant comprendre les interactions entre la pénicilline et les bactéries que Jean-Marie Ghuysen et ses collaborateurs Milton Salton, Jack Strominger et Gerald Shockman ont découvert que la matrice semi-rigide de la paroi bactérienne était constituée d'un polymère complexe jusqu'alors inconnu (Ghuysen, 1968). En 1966, lors d'une table ronde organisée pendant un symposium de l'« American Chemical Society », Jean-Marie Ghuysen propose le nom de peptidoglycane pour désigner cette structure.

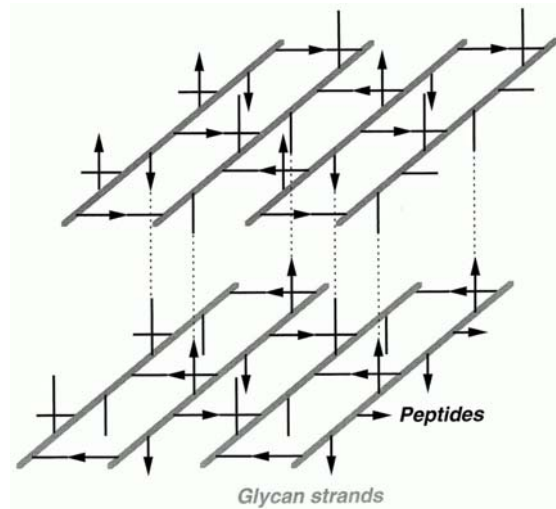
Le peptidoglycane est une molécule géante qui entoure la membrane cytoplasmique des bactéries. Il est le principal constituant de leur paroi. Cette structure contribue au maintien de la forme et de l'intégrité de la cellule en protégeant la membrane cytoplasmique contre les variations de la pression osmotique interne (Holtje, 1998).

##### **I.1.1 La structure du peptidoglycane**

Bien que plus d'une centaine de compositions différentes de peptidoglycane aient été recensées (Ghuysen, 1968; Schleifer et al., 1972), leur structure de base est toujours la même. Elle se compose de chaînes de glycanes reliées entre elles par des chaînons peptidiques (figure 1).

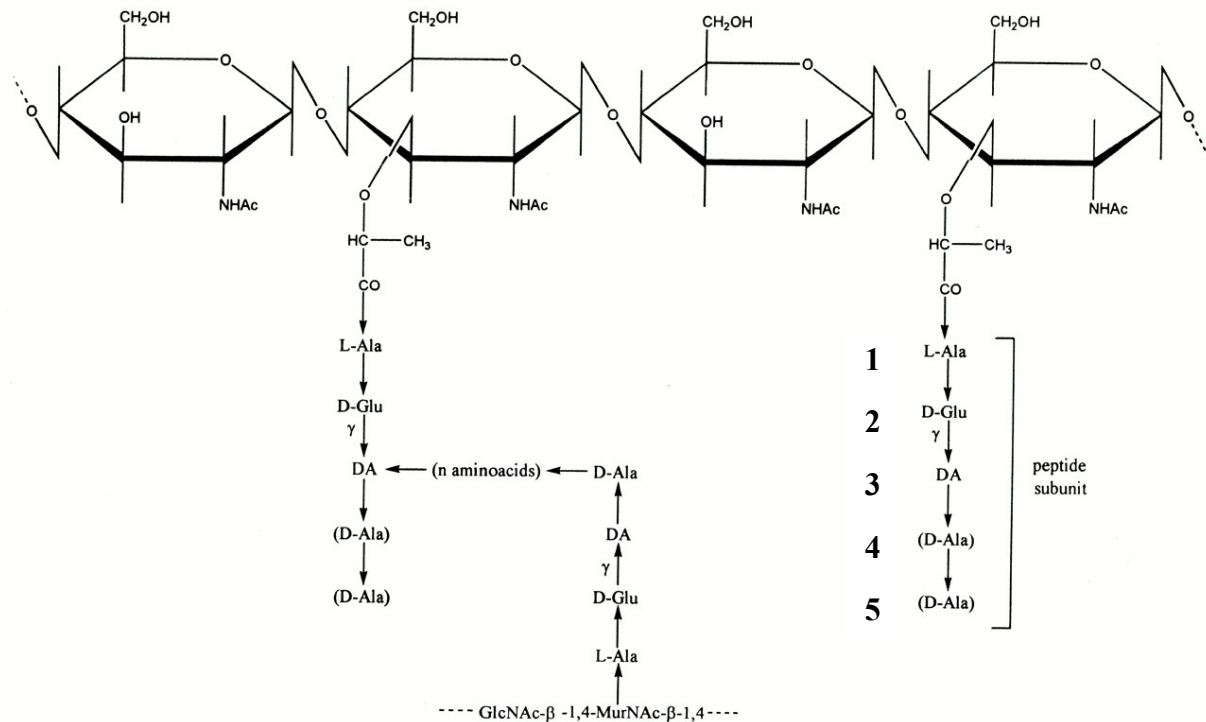
**Figure 1 : Structure d'une multi-couche de peptidoglycane.**

Les chaînes glycanes sont représentées par des barres obliques et les ponts peptidiques par des barres horizontales et verticales (peptides accepteurs) ou des flèches horizontales et verticales (peptides donneurs) (Holtje, 1998).



Les chaînes polysaccharidiques constituent l'ossature de base : elles sont composées de *N*-acétyl-glucosamines et d'acides *N*-acétyl-muramiques, d'où le nom de muréine fréquemment donné au peptidoglycane. Les unités saccharidiques sont reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4 et les acides *N*-acétyl-muramiques sont substitués par des chaînes peptidiques. Ces dernières sont variables d'une espèce à l'autre (figure 2). En règle générale, on trouve des peptides composés d'un enchaînement d'acides aminés des séries L et D : une L-alanine en position 1, un D-isoglutamate en position 2, un acide aminé dibasique en position 3 (généralement L-Lysine ou acide meso-diaminopimélique) et une D-alanine en positions 4. Ces oligopeptides sont reliés entre eux par des ponts interpeptidiques entre l'acide aminé dibasique en position 3 et le D-alanine en position 4. Ce pontage est variable suivant les espèces. Chez *Staphylococcus aureus*, on observe cinq glycines alors que chez *Escherichia coli* le pontage est direct. Dans le cas de *Streptococcus pneumoniae*, les liaisons interpeptidiques sont directes ou indirectes. Dans le deuxième cas, fréquent chez les souches résistantes aux antibiotiques, on dit que les peptides sont « branchés »; les liaisons sont alors composées de dipeptides sérine-alanine ou alanine-alanine (Garcia-Bustos et al., 1987).

Généralement, la partie peptidique du peptidoglycane mature est composée majoritairement de tri- et de tétra-peptides. Notons que dans les souches de pneumocoques résistantes aux  $\beta$ -lactamines, la structure du peptidoglycane peut être fortement modifiée (Severin et al., 1996).



**Figure 2: Structure chimique du peptidoglycane mature.**

GlcNAc: *N*-acétyl-glucosamine; MurNAc: acide *N*-acétyl-muramique; DA: acide aminé di-aminé; n: nombre d'acides aminées du pont interpeptidique (n = 0 à 5 selon les espèces). (van Heijenoort, 2001).

### I.1.2 La synthèse du peptidoglycane

La synthèse du peptidoglycane est un phénomène complexe composé de nombreuses étapes à la fois cytoplasmiques, membranaires et périplasmiques. La voie de synthèse a été entièrement décrite chez *E. coli* (van Heijenoort, 2001). Le précurseur de la réaction est l'uridine di-phospho-*N*-acétyl-glucosamine. Dans le cytoplasme, de nombreuses réactions enzymatiques mettant principalement en jeu les enzymes de la famille Mur mènent à la formation du monomère uridine-di-phospho-acide-*N*-acétyl-muramyl-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide) (figure 3). Lors de la première étape membranaire, MraY catalyse le transfert de ce monomère sur l'undecaprényl-phosphate membranaire, formant ainsi le Lipide I. L'ajout de *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) sur ce dernier est catalysé par MurG et crée le Lipide II. Par un mécanisme de translocation non élucidé à ce jour, ce Lipide II est transféré sur le côté périplasmique de la membrane où ont lieu les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane. Celles-ci incluent la polymérisation des chaînes glycanes par des enzymes à activité glycosyltransférase (GT) (van Heijenoort, 2001) et leur pontage par des enzymes à activité transpeptidase (TP) (Ghuysen, 1994). Les activités TP et GT sont portées par les Penicillin-Binding Proteins (PBPs).

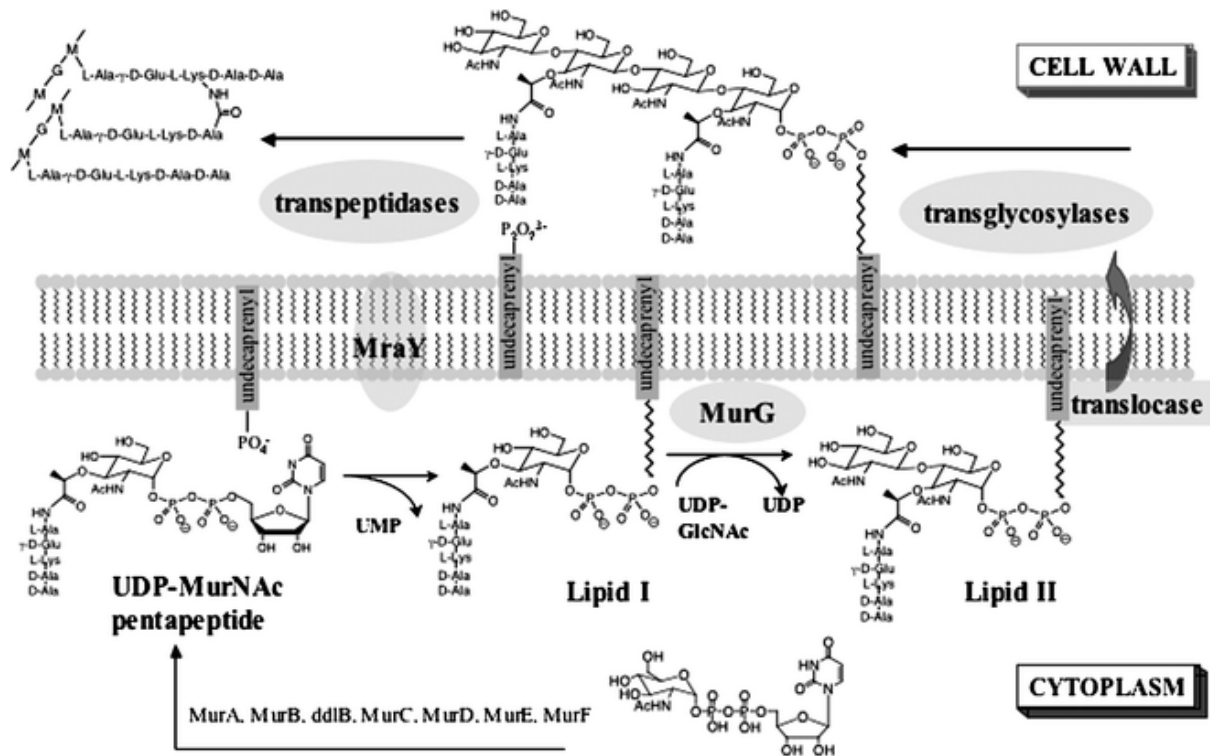


Figure 3: Voie de biosynthèse du peptidoglycane. (Fang, 2006)

## I.2 Structure primaire des PBP

Les PBPs font partie de la superfamille des protéines appelées ASPRE pour « Active-site Serine Penicillin Recognizing Enzymes » (Frère et al., 1988). Cette famille d'enzymes, dont font aussi partie les  $\beta$ -lactamases de classe A et C, possède trois motifs conservés : SXXK, (S/Y)XN et (K/H)(S/T)G. Ces protéines ont comme point commun la capacité de rompre la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines en établissant une liaison ester entre la sérine catalytique de leur site actif et l'antibiotique, ce qui résulte dans la formation d'un complexe penicilloyl-enzyme. Ce dernier est stable dans le cas des PBPs, alors que dans celui des  $\beta$ -lactamases il est hydrolysé très rapidement (Joris et al., 1988; Gordon et al., 1999).

Les PBPs sont classées en trois catégories en fonction de leur taille et de leurs domaines fonctionnels: deux catégories de PBPs de haute masse moléculaire dites PBPs de classe A et B, et une catégorie de PBPs de basse masse moléculaire.

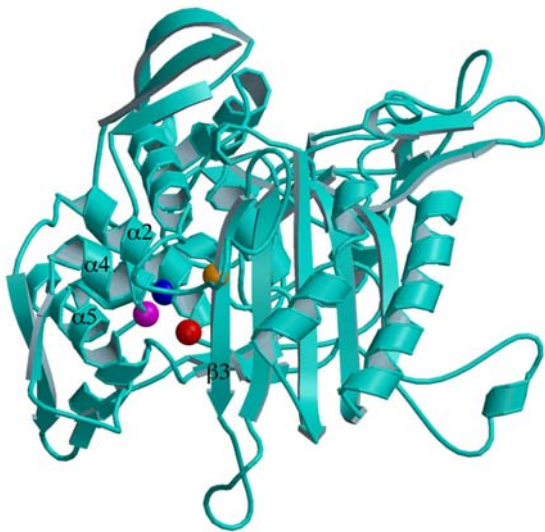
Les PBPs de classe A ont une signature caractéristique d'un domaine à activité glycosyltransférase (GT) composée de cinq motifs (EDXXFXXHXG, GXSTXTQQ, RKXXE, KXXILXXYXN et RRXXVL (Goffin et al., 1998)) et un domaine de liaison à la pénicilline (domaine ASPRE) qui a une fonction transpeptidase (TP). Les PBPs de classe B ont un domaine de liaison à la pénicilline (ASPRE) ainsi qu'un autre domaine de fonction inconnue.

Les PBP de basse masse moléculaire sont des D,D-endopeptidases et des D,D-carboxypeptidases.

### I.3 Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à la pénicilline

Le domaine de liaison à la pénicilline (ASPRE) est caractérisé par un site catalytique qui se situe entre un sous-domaine  $\alpha$ -hélicale et un sous-domaine  $\alpha/\beta$  constitué de 5 brins  $\beta$  recouverts de 2 hélices  $\alpha$  C-terminale (figure 4).

Le premier motif SXXK est localisé sur la partie N-terminale de l'hélice  $\alpha_2$  du sous-domaine  $\alpha$ -hélicale (au bas du sillon du site actif dans la figure 4). Le deuxième motif catalytique SXN se situe à gauche du site actif, sur une boucle entre l'hélice 4 et l'hélice 5 du sous-domaine hélicale. Enfin, le troisième motif KTG est sur le brin  $\beta_3$  du sous-domaine  $\alpha/\beta$  à droite du site actif.



**Figure 4 : Topologie du domaine de liaison à la pénicilline de PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*.**

La sérine active est représentée en rouge, la lysine du motif SXXK en bleu, la sérine du second motif SXN en pourpre et la lysine du troisième motif KTG en jaune. Les éléments de structures secondaires sont nommés avec la nomenclature standard.

### I.4 Fonction des PBPs

Nos connaissances fragmentaires des fonctions physiologiques de PBPs découlent d'analyses de phénotypes de mutants et de cellules traitées avec des  $\beta$ -lactamines spécifiques d'une PBP ou encore d'expériences de localisation cellulaire.

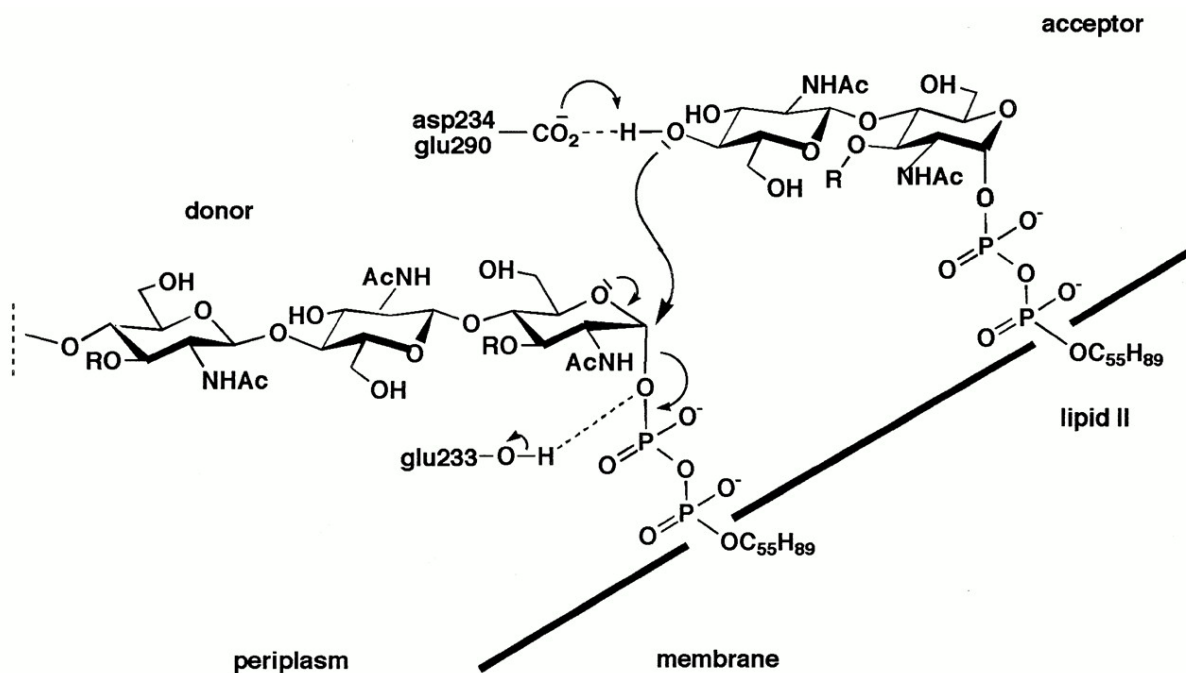
Nous nous restreindrons ici à la présentation de leurs fonctions enzymatiques lors de la synthèse de peptidoglycane sans mentionner leurs rôles dans le mécanisme de la division cellulaire.

### I.4.1 L'activité glycosyltransférase

L'activité GT assure la polymérisation des unités disaccharides dans l'espace périplasmique. Elle a été démontrée pour plusieurs PBPs de classe A recombinantes tels que PBP1b et PBP1c de *E. coli* (Schiffer et al., 1999; Terrak et al., 1999; Schwartz et al., 2001), PBP2a de *S. pneumoniae* (Di Guilmi et al., 2003) et PBP2 de *S. aureus* (Barrett et al., 2005).

Il est admis que dans des cellules en croissance, la polymérisation des monomères disaccharide-pentapeptide se fait par transglycosylation et que celle-ci précède le pontage des parties peptidiques (van Heijenoort, 2001).

L'assemblage linéaire des chaînes glycanes se fait par additions répétitives d'unités disaccharide-pentapeptides sur leur extrémité réductrice (figure 5). Le lipide II est l'accepteur de la réaction. L'extrémité réductrice de l'acide N-acétyl muramique de la chaîne naissante est transférée sur l'extrémité non-réductrice du N-acétyl-glucosamine du lipide II. La chaîne glycosidique reste donc fixée au lipide II jusqu'à la fin de son élongation où elle est décrochée de son ancrage membranaire par la formation d'une liaison 1,6-anhydro (Welzel, 2005; Fraipont et al., 2006).



**Figure 5 : Mécanisme de transglycosylation.**

Les acides aminés dicarboxyliques indiqués sont ceux du domaine glycosyltransférase de PBP1b de *E. coli*. R = D-lactoyl-pentapeptide. (van Heijenoort, 2001)

Le domaine GT ne fixe pas les pénicillines, mais son activité est inhibée par la moénomycine, un antibiotique qui n'est pas utilisé en thérapie humaine (Van Heijenoort et al., 1978; Di Guilmi et al., 1998).

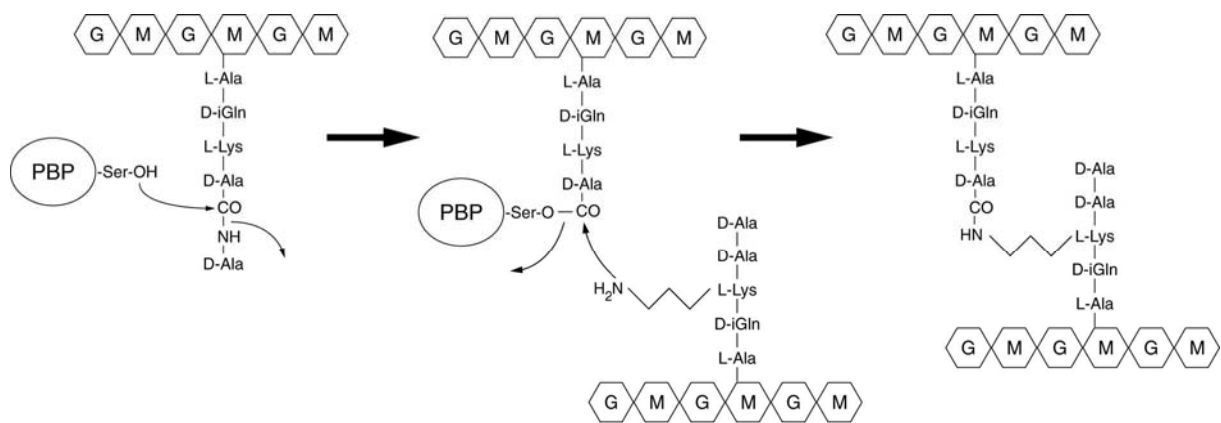


### I.4.2 L'activité transpeptidase

Cette activité est commune aux PBP3 de classe A et B. Elle permet de réticuler le peptidoglycane en établissant une liaison covalente entre deux chaînes peptidiques voisines.

La transpeptidation a uniquement été démontrée *in vitro* sur la PBP1b (classe A) de *E. coli* (Terrak et al., 1999; Schwartz et al., 2001; Bertsche et al., 2005, Fraipont et al., 2006). Mais des études de composition du peptidoglycane de *E. coli* après un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de PBP3 et la surexpression ou la délétion de certaines PBP3 indiquent que dans les PBP3 de classe B l'activité TP est aussi fonctionnelle (Ishino et al., 1986; Pisabarro et al., 1986).

La réaction de transpeptidation est présentée dans la figure 6.



**Figure 6 : Réaction de transpeptidation.**

Les chaînes de glycanes sont représentées par des hexagones. Les pentapeptides donneurs et accepteurs se situent respectivement sur les chaînes de glycanes supérieures et inférieures. Les peptides correspondent à ceux trouvés chez *S. pneumoniae*. G : *N*-acétyl-glucosamines ; M : acide *N*-acétyl-muramique.

La sérine active du domaine TP exerce une attaque nucléophile sur le carbonyle de l'avant dernière D-alanine du pentapeptide. Ceci provoque la formation d'un complexe covalent acyl-enzyme entre le peptide donneur et la protéine avec le départ de D-alanine. Ce complexe subit ensuite une aminolyse par l'amine primaire portée par une chaîne peptidique voisine, le substrat accepteur, menant à la formation d'une liaison peptidique entre les deux peptides et à la libération de la sérine active de l'enzyme.

L'activité TP des PBP3 de classe A est indépendante de l'activité GT car chacune de ces activités peut être inhibée spécifiquement sans conséquences sur la seconde (Schwartz et al., 2001).

### **I.4.3 L'activité carboxypeptidase**

Cette activité est médiée par les PBPs de faible masse moléculaire. Ces dernières ne sont pas essentielles à la survie de la bactérie, mais leur inactivation provoque de sévères aberrations morphologiques (Schuster et al., 1990; Nelson et al., 2000; Nelson et al., 2001). Il est admis que leur rôle principal est la régulation du degré de réticulation du peptidoglycane (Schuster et al., 1990; Holtje, 1998; Nelson et al., 2001). En effet, l'activité D, D-carboxypeptidase élimine le dernier D-alanine du pentapeptide donneur et empêche donc les tétrapeptides ainsi générés de servir de peptides donneurs pour former des ponts peptidiques entre les chaînes de glycanes.

L'activité carboxypeptidase de PBP3 de *S. pneumoniae* a été démontrée biochimiquement en utilisant un substrat pentapeptidique (Hakenbeck et al., 1982; Morlot et al., 2003).

## II Les $\beta$ -lactamines

### II.1 Bref historique des $\beta$ -lactamines

En 1897, Ernest Duchesne démontre qu'une moisissure appelée *Penicillium glaucum* est capable d'inhiber la croissance des bactéries. Bien qu'il ne retire aucune application pratique de ses observations, il est le précurseur de l'ère des antibiotiques. En 1928, Alexander Fleming publie des travaux dans lesquels il décrit qu'un bouillon filtré obtenu à partir de *Penicillium notatum* présente une activité antibactérienne et n'est pas toxique pour l'homme. Il appelle ce produit pénicilline (Fleming, 1980). En raison du manque d'enthousiasme de la communauté scientifique, il faudra attendre jusqu'en 1939 pour voir les premières productions en masse de pénicillines par Florey et Chain (Chain E et al., 1940). Ces productions sont testées sur l'homme pour la première fois en 1941 et utilisées en thérapie à grande échelle dans les années qui suivent.

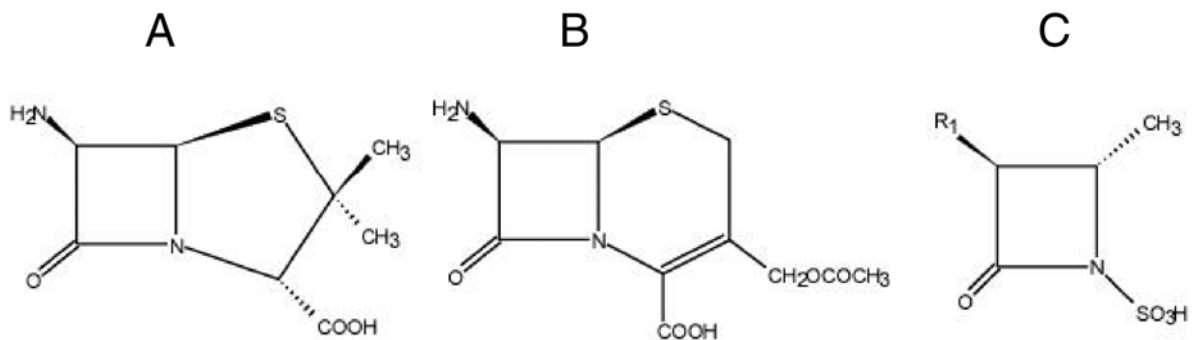
Alexander Fleming, Ernest Boris Chain et Howard Walter Florey ont reçu le prix Nobel de médecine en 1945.

### II.2 Classification des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines peuvent être classées selon plusieurs critères. La classification microbiologique se basant sur le spectre anti-bactérien et la classification pharmacocinétique qui repose sur la demi-vie apparente d'élimination de l'antibiotique par le patient sont deux méthodes fréquemment utilisées en médecine. Ici, nous utiliserons la classification selon leur structure chimique. Il y a trois principaux groupes de  $\beta$ -lactamines ayant comme point commun le cycle  $\beta$ -lactame (amide cyclisée en  $\beta$ ) dont l'intégrité est indispensable à l'activité antibactérienne. C'est la nature des substituants de ce cycle qui définit les groupes (figure 7).

Les  $\beta$ -lactamines du premier groupe (classe A) comportent le cycle  $\beta$ -lactame et un cycle thiazoline formant un noyau principal 6-amino-penicillanique dont les dérivés sont les pénames, les pénèmes, les oxopénames et les carbapénèmes (figure 7A). Le deuxième groupe (classe B) correspond aux  $\beta$ -lactamines qui ont un cycle  $\beta$ -lactame et un cycle dihydrothiazine formant un noyau principal 7-amino-céphalosporinique dont les céphèmes, les céphamycines et les oxacéphèmes sont dérivés (figure 7B). Enfin, ceux du troisième groupe (classe C) sont les monobactames et les nocardicines ; ils comportent un noyau limité au cycle  $\beta$ -lactame

(figure 7C). La pénicilline G est un exemple de  $\beta$ -lactamine de classe A, le céfotaxime de classe B et l'aztréoname de classe C.

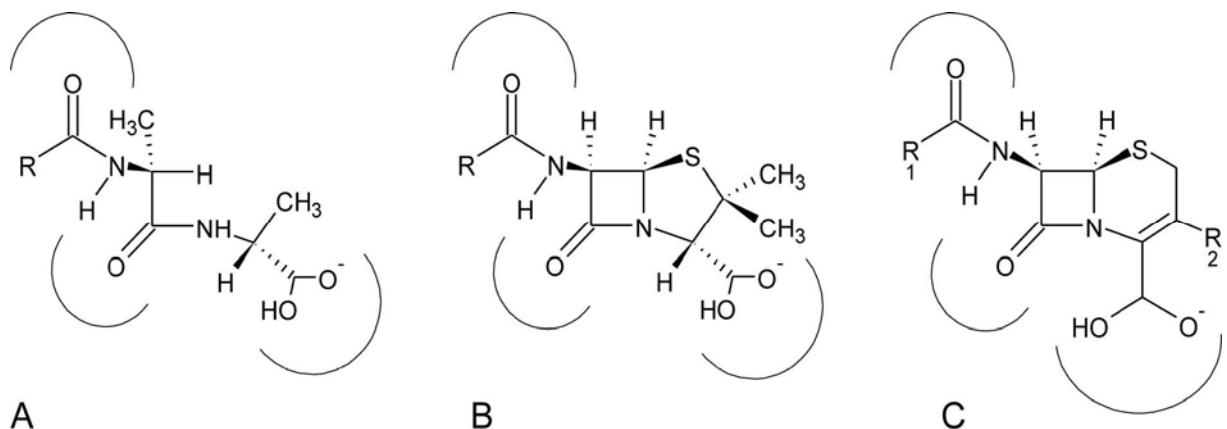


**Figure 7 : Structure chimique des 3 principaux noyaux à la base des  $\beta$ -lactamines.**

Le noyau 6-amino-penicillanique (A), le noyau principal 7-amino-céphalosporinique (B) et le noyau monobactame (C).

### II.3 Mode d'action des $\beta$ -lactamines

Le mode d'action se base sur une similitude de structure des  $\beta$ -lactamines et du dipeptide D-ala-D-ala précurseur pentapeptide-disaccharide du peptidoglycane (figure 8).

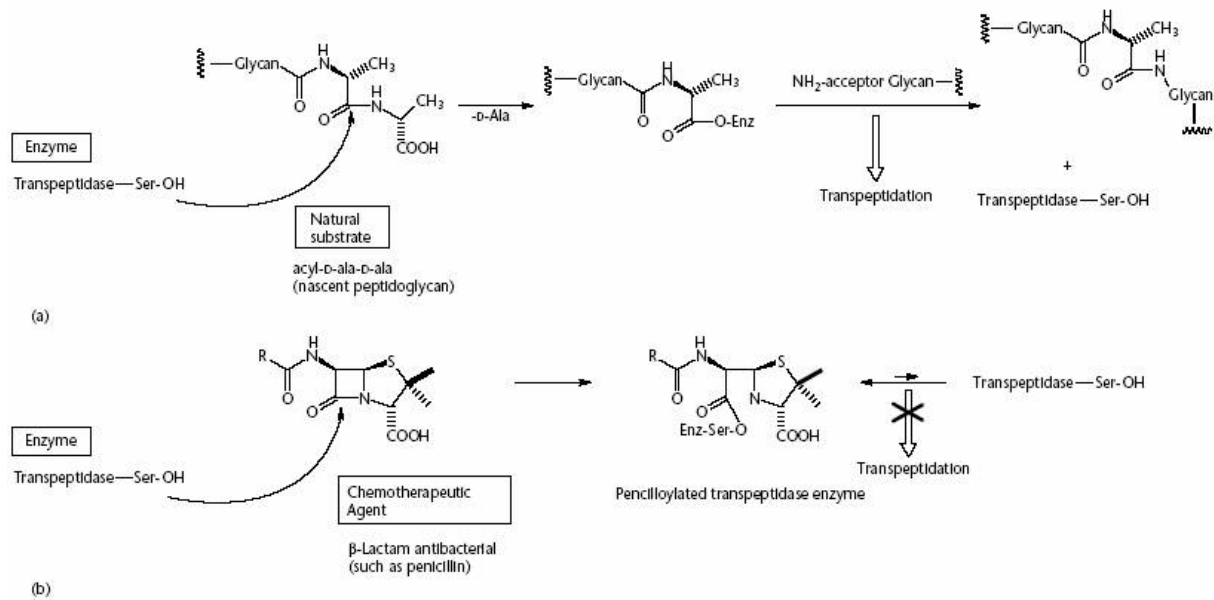


**Figure 8 : Similarité structurale entre les  $\beta$ -lactamines et les substrats naturels des PBPs.**

A : peptide N-acyl-D-alanyl-D-alanine ; B : structure de base des pénicillines ; C : structure de base des céphalosporines. Les arcs de cercle représentent les zones à potentiel électrostatique négatif.

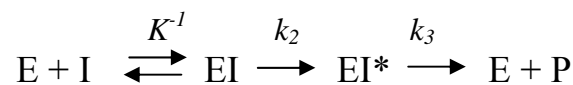
Ce sont surtout les trois zones de potentiel électrostatique négatif qui sont très similaires. Les  $\beta$ -lactamines agissent comme des inhibiteurs suicides, c'est à dire qu'après la réaction avec le substrat, elles sont relargués sous forme inactive. La sérine active attaque le carbonyle

du cycle  $\beta$ -lactame qui est très réactif. Il se forme un complexe acyl-enzyme covalent qui est hydrolysé à une vitesse lente, négligeable par rapport à la durée d'une génération bactérienne (figure 9b). Contrairement à ce qui se passe avec le substrat naturel (figure 9a), l'enzyme active n'est pas régénérée rapidement et n'est donc plus disponible pour réagir avec le peptidoglycane naissant si la réaction de transglycosylation a lieu avant.



**Figure 9 : Mécanisme de la réaction des PBP avec les substrats naturels, c'est-à-dire l'acyl-D-ala-D-ala du pentapeptide du peptidoglycane naissant (a) et avec une  $\beta$ -lactamine (b).** (Dax, 1997)

La réaction cinétique des  $\beta$ -lactamines avec les PBP peut être décrite par le schéma cinétique à trois étapes représentée dans la figure 10.



**Figure 10 : Réaction cinétique entre une PBP (E) et une  $\beta$ -lactamine (I).**

EI est le complexe non-covalent. EI\* est le complexe acyl-enzyme covalent. P est le produit ouvert inactivé. (Frere et al., 1975; Fuad et al., 1976)

D'abord un complexe non-covalent entre l'enzyme et la  $\beta$ -lactamine est formé avec une constante de dissociation  $K$  ( $k^{-1}/k^{+1}$ ). Cette réaction est suivie par l'acylation de la sérine active par la  $\beta$ -lactamine avec une constante de vitesse  $k_2$ . Enfin, l'enzyme est désacylée avec la constante de vitesse  $k_3$ . La constante de vitesse  $k_2/K$  correspond à l'efficacité d'acylation, elle s'exprime en  $M^{-1}.s^{-1}$ . La concentration d'antibiotique à laquelle la moitié de l'enzyme est

inhibée au « steady state » ( $c_{50} = Kk_3 / k_2$ ) peut être qualifiée d'affinité. Elle est déterminée en mesurant la quantité de  $\beta$ -lactamine nécessaire pour inhiber 50% de la fixation d'une  $\beta$ -lactamine marquée. Dans ce manuscrit, la notion d'affinité abaissée pour les  $\beta$ -lactamines est synonyme d'une  $c_{50}$  augmentée. Cette affinité ne doit pas être confondue avec l'équilibre décrit par la constante de dissociation  $K$ .

En plus des mécanismes de résistance tels que la production de  $\beta$ -lactamases, la modification de la perméabilité de la membrane plasmique et l'efflux actif d'antibiotique par des pompes, la résistance des souches bactériennes aux  $\beta$ -lactamines peut aussi s'expliquer par une diminution de l'efficacité d'acylation ( $k_2/K$ ) par les  $\beta$ -lactamines et/ou par une augmentation de la vitesse de désacylation ( $k_3$ ) de la sérine active du domaine TP (Chesnel et al., 2002).

### III Les mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines médiées par les PBPs

Le phénomène de résistance aux antibiotiques a été rapporté dès les années 50 (Scanga, 1950), quelques années seulement après leurs premières utilisations en thérapie humaine. Aujourd'hui, en France, plusieurs souches bactériennes sont résistantes aux principales familles d'antibiotiques, composés de dernière génération inclus.

En ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines, les bactéries ont développé différents moyens pour résister. Il existe deux mécanismes spécifiques aux bactéries à gram négatifs : la diminution de perméabilité de la membrane externe et les systèmes d'export des antibiotiques par des pompes à efflux. La production de  $\beta$ -lactamases qui dégradent les antibiotiques et l'utilisation de PBPs de faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines sont des mécanismes communs aux bactéries à gram positif et négatif.

Nous nous restreindrons ici à la présentation des mécanismes mettant en jeu des PBPs de faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines, objet du travail présenté dans ce manuscrit.

#### III.1 Mécanismes impliquant des PBPs supplémentaires

Certaines bactéries ont développé un mécanisme de résistance impliquant l'utilisation d'une PBP supplémentaire. Celle-ci a une affinité faible pour les  $\beta$ -lactamines et permet aux bactéries de survivre à des concentrations d'antibiotiques inhibant les PBPs endogènes.

##### III.1.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* dispose de trois mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines : il peut hydrolyser l'antibiotique avec une  $\beta$ -lactamase (Wallmark, 1954), il peut posséder des PBPs endogènes ayant une affinité réduite pour les  $\beta$ -lactamines en raison de mutations ponctuelles et peut recruter une PBP additionnelle qui n'est pas sensible aux  $\beta$ -lactamines (Hackbarth et al., 1995).

Cette dernière stratégie est due à l'expression d'une cinquième PBP nommée PBP2a (Hartman et al., 1984; Utsui et al., 1985). Celle-ci est le produit du gène *mecA* dont l'expression est dérégulée en présence de certaines  $\beta$ -lactamines. L'origine de *mecA* n'est pas connue, mais on suppose qu'il serait issu d'une souche de staphylocoque non identifiée à

ce jour et qu'il s'est répandu dans plusieurs espèces dont *S. aureus*, *S. epidermitis*, *S. haemolyticus* et *S. hominis* (Pierre et al., 1990). PBP2a est une PBP de classe B qui continue à exercer son activité transpeptidase nécessaire pour la synthèse du peptidoglycane quand les quatre PBPs natives sont inhibées. La réaction de PBP2a avec les  $\beta$ -lactamines est très lente ( $k_2/K$  approximatif de  $15 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et négligeable à des concentrations thérapeutiques par rapport au temps de génération des bactéries (Graves-Woodward et al., 1998; Lu et al., 1999).

Une trentaine de gènes auxiliaires essentiels à la croissance bactérienne appelés *fem* (factor essential for methicillin resistance) ont été identifiés comme étant nécessaires au développement complet de la résistance conférée par PBP2a (De Lencastre et al., 1999). Ces gènes sont généralement impliqués dans le métabolisme de la paroi cellulaire, dans des fonctions régulatrices et coopèrent avec *mecA* d'une façon encore méconnue.

### III.1.2 Entérocoques

*Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont à l'origine d'importantes pathologies humaines, dont des infections nosocomiales. De manière générale, les entérocoques sont des pathogènes naturellement résistants aux  $\beta$ -lactamines en raison de la présence d'une PBP de haute masse moléculaire appelée PBP5 qui prend en charge la transpeptidation quand les cinq autres PBPs sont inhibées par les antibiotiques (Fontana et al., 1983; Fontana et al., 1985).

Une augmentation du niveau d'expression de PBP5 permet aux bactéries d'atteindre des niveaux de résistance moyens (CMI<sup>1</sup> pour l'ampicilline de  $8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). En plus de ce phénomène, des mutations ponctuelles dans cette PBP permettent l'obtention de hauts niveaux de résistance (CMI allant jusqu'à  $512 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (Klare et al., 1992; Fontana et al., 1994).

Notons que dans une souche particulière de *E. hirae* (S185) on observe, en plus de PBP5, une PBP3r de faible affinité pour les  $\beta$ -lactamines qui semblerait être codée par un gène plasmidique (Piras et al., 1993).

---

<sup>1</sup> La CMI (concentration minimale inhibitrice) est la plus petite concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance des bactéries.



## III.2 Mécanismes impliquant le remaniement de gènes de PBPs endogènes

Chez certaines bactéries, l'usage des  $\beta$ -lactamines a sélectionné des souches possédant des PBPs endogènes de moindre affinité pour ces antibiotiques mais qui conservent leur activité physiologique.

Les gènes des PBPs impliqués dans la résistance sont dits mosaïques (Spratt, 1988). Cette caractéristique résulte de recombinaisons génétiques intra- et inter-espèces de fragments d'ADN. C'est grâce à un phénomène de compétence naturelle que de l'ADN exogène peut être intégré efficacement dans le génome des souches réceptrices. Des mutations ponctuelles peuvent également être contractées.

### III.2.1 *Neisseria*

Les différentes espèces de *Neisseria* possèdent quatre PBPs, nommées PBP1, 2, 3 et 4. Les deux premières sont des PBPs de haute masse moléculaire, respectivement de classe A et de classe B. PBP3 et PBP4 sont des PBPs de basse masse moléculaire. Des expériences de liaison avec de la pénicilline radioactive montrent que PBP1 et PBP2 sont impliquées dans le phénomène de résistance de *N. gonorrhoeae*. Mais seul le gène *penA*, qui code pour PBP2, est mosaïque dans les souches résistantes de *N. gonorrhoeae* (Spratt, 1988) et *N. meningitidis* (Spratt et al., 1989). Les blocs d'ADN échangés dans *penA* sont originaires de diverses espèces commensales telles que *N. flavescens*, *N. cinerea* ou *N. perflava* (Spratt et al., 1989; Spratt et al., 1992; Bowler et al., 1994; Ameyama et al., 2002). On trouve aussi souvent des mutations générant des insertions de codons dans *penA* des souches résistantes, alors que dans la majorité des cas, les gènes mosaïques codent pour le même nombre d'acides aminés.

Le peptidoglycane des souches ayant un gène *penA* modifié possède plus de pentapeptides que celui des souches ayant un gène *penA* inchangé. Cette observation indique une modification de l'activité transpeptidase et/ou carboxypeptidase de PBP2 (Antignac et al., 2003).

### III.2.2 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* est responsable de nombreuses pathologies telles que des otites, des pneumopathies et des méningites. L'accroissement alarmant de la prévalence de souches

de pneumocoques résistantes à plusieurs antibiotiques constitue un problème de santé publique sérieux. En 2003, une étude épidémiologique des observatoires régionaux du pneumocoque menée sur 5414 souches a montré que 2716 d'entre elles (50 %) présentaient une sensibilité diminuée à la pénicilline G (Maugein, 2006).

Le pneumocoque possède cinq PBPs de haute masse moléculaire et une PBP de basse masse moléculaire. Les premières sont les PBPs de classe A nommées PBP1a, PBP1b et PBP2a et les PBPs de classe B nommées PBP2x et PBP2b. La seconde est la carboxypeptidase PBP3.

Comme pour *Neisseria*, la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *S. pneumoniae* est due à des recombinaisons génétiques résultant en la production de PBPs de faible affinité pour ces antibiotiques (Hakenbeck et al., 1980; Zigelboim et al., 1980).

### III.2.2.1 Compétence naturelle de *S. pneumoniae*

Le pneumocoque possède un système naturel de transformation qui lui permet d'échanger du matériel génétique avec d'autres espèces de streptocoques telles que *S. mitis* ou *S. oralis* (Laible et al., 1991; Dowson et al., 1994).

L'induction de l'état de compétence est sous le contrôle du CSP (« Competence Stimulating Peptide ») (Havarstein et al., 1995). Il s'agit d'un peptide phéromone sécrété de 17 acides aminés. Il existe deux variants du CSP chez le pneumocoque : CSP-1 ( $\text{NH}_2$ -EMRLSKFFRDFILQRKK-COOH) et CSP-2 ( $\text{NH}_2$ -EMRISRIILDFLFLRKK-COOH) (Pozzi et al., 1996). La compétence est induite quand la concentration extracellulaire de CSP atteint une valeur de 1 à 10 ng.ml<sup>-1</sup>. Le CSP se fixe sur son récepteur à la surface du pneumocoque, ce qui déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la transcription des gènes impliqués dans la liaison, le réarrangement, l'importation et l'intégration de l'ADN par recombinaison, assurant au pneumocoque une facilité d'adaptation à diverses pressions de sélection, comme celle induite par les antibiotiques (Peterson et al., 2000).

### III.2.2.2 PBPs et gènes mosaïques

Une des conséquences de la compétence naturelle de *S. pneumoniae* est la mosaïcité des gènes de PBPs d'isolats cliniques. Ceux-ci divergent d'environ 20% par rapport aux gènes de

PBPs issus de souches sensibles (Dowson et al., 1989), avec comme conséquence une modification de la séquence d'acide aminé d'approximativement 10%. Le séquençage des PBPs montre que dans les souches cliniques résistantes seules PBP2x (Laible et al., 1991), PBP2b (Dowson et al., 1989) et PBP1a (Dowson et al., 1989) sont mosaïques. Ceci indique que parmi les six PBPs du pneumocoque, PBP2x, PBP2b et PBP1a sont les cibles majoritairement modifiées en présence d'une pression de sélection par les  $\beta$ -lactamines. PBP1b et PBP3 ne sont pas essentielles (Schuster et al., 1990; Hoskins et al., 1999), ce qui est probablement la raison pour laquelle ces protéines ne sont pas impliquées dans la résistance. PBP2x et PBP2b sont essentielles à la survie de la bactérie (Kell et al., 1993). Comme elles sont très sensibles aux  $\beta$ -lactamines, ce sont des variants de celles-ci qui sont sélectionnés en premier en présence d'antibiotiques. L'intervention d'une PBP2b de faible affinité permet à la bactérie d'acquérir des niveaux de résistance faibles aux pénicillines (pipéracilline), alors que celle d'une PBP2x de faible affinité entraîne un niveau de résistance faible aux pénicillines et aux céphalosporines (céfotaxime) (Grebe et al., 1996; Krauss et al., 1996). Notons qu'une PBP2b modifiée n'est pas nécessaire pour une résistance aux céphalosporines puisque ces antibiotiques n'ont qu'une très faible affinité pour PBP2b (Hakenbeck et al., 1987).

PBP1a et PBP2a ne sont pas essentielles individuellement (Hoskins et al., 1999; Paik et al., 1999). L'acquisition de forts niveaux de résistance aux céphalosporines requiert la modification de PBP1a en plus de celle de PBP2x (Coffey et al., 1995; Smith et al., 2003). Le fait que PBP1a soit la cible principale de l'antibiotique, plutôt que PBP2a s'explique par la faible affinité intrinsèque de PBP2a pour les  $\beta$ -lactamines (Zhao et al., 2000).

Dans le cas de hauts niveaux de résistance aux pénicillines, il semblerait que l'acquisition des deux PBP1a et PBP2x d'affinité réduite soit nécessaire en plus de la présence d'une PBP2b modifiée (Hakenbeck et al., 1994; Smith et al., 1998).

### III.2.2.3 Caractérisation cinétique des PBPs du pneumocoque

La transpeptidation avec des substrats qui miment la réaction physiologique n'a jamais été démontrée *in vitro* pour les PBPs du pneumocoque. Par contre, l'hydrolyse d'un substrat analogue thiol-ester appelé S2d par les PBPs a été observée et caractérisée (Adam et al., 1991; Jamin et al., 1993b).

En revanche, la réaction des PBPs avec les  $\beta$ -lactamines se fait *in vitro* et a été très bien caractérisée (Frère et al., 1975). L'efficacité d'acylation  $k_2/K$  de PBP2x, PBP1a, PBP1b et

PBP2a peut être déterminée pour différentes  $\beta$ -lactamines en exploitant la diminution de la fluorescence intrinsèque de la protéine après ajout de l'antibiotique (Nieto et al., 1973; Frere et al., 1975), ou par des analyses en spectrométrie de masse associées à une technique de cinétique rapide (« quench flow ») (Lu et al., 2001). La vitesse de désacylation est aussi mesurable *in vitro* par différentes méthodes telles que la spectrométrie de masse sur des réactions bloquées à différents temps (Di Guilmi et al., 2000) ou la mesure de la perte de pénicilline radioactive au cours du temps (Jamin et al., 1993a).

#### III.2.2.4 Les mutations de PBP2x

L'alignement des 83 séquences de domaines TP de PBP2x disponibles révèle trois grandes familles de séquences. La première contient des séquences non-mosaïques très similaires à la séquence de la souche sensible de référence R6. Les deux autres familles sont caractérisées par des ensembles de mutations assez différentes et suggèrent que deux mécanismes de résistance ont été sélectionnés chez le pneumocoque (Pernot et al., 2004). Une de ces familles est caractérisée par la présence de la mutation T338A<sup>2</sup> et l'autre par la mutation Q552E.

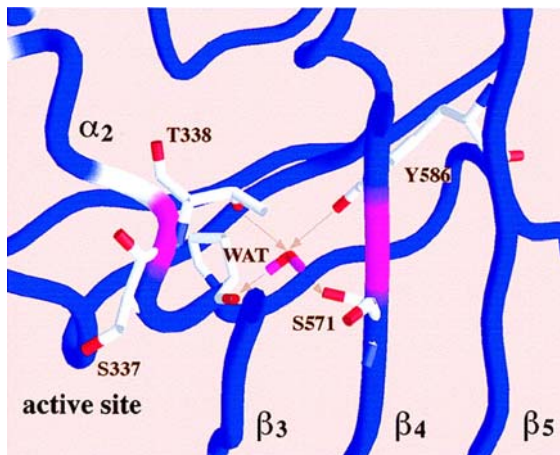
La mutation T338A est la première substitution dont l'importance et l'implication pour la résistance ont été amplement décrites au niveau structural et fonctionnel. *In vitro*, la protéine R6-PBP2x-T338A<sup>3</sup> a une efficacité d'acylation deux fois plus faible que R6-PBP2x pour la pénicilline. Les mutants réverses des deux protéines de souches cliniques résistantes 4790-PBP2x-A338T et Sp328-PBP2x-A338T ont un  $k_2/K$  augmenté d'un facteur 6 par rapport à celui des protéines non-mutées pour le même antibiotique. *In vivo*, l'intégration de la mutation T338A dans le gène *pbp2x* de la souche R6 ne lui confère pas un niveau de résistance assez élevé pour être sélectionnée par les  $\beta$ -lactamines. Le niveau de résistance à la pénicilline de la souche R6 ayant intégré le gène 4790-*pbp2x*-A338T diminue d'un facteur 2 (Mouz et al., 1998; Chesnel et al., 2003).

La thréonine 338 établit une liaison hydrogène avec une molécule d'eau présente dans le site actif (figure 11). Il a été proposé que la suppression de cette liaison provoque la perte de la molécule d'eau et par ce fait déstabilise le site actif et défavorise la liaison avec

<sup>2</sup> La première lettre désigne l'acide aminé originel et la seconde l'acide aminé vers lequel celui-ci est muté. Le nombre correspond à la position dans la séquence.

<sup>3</sup> R6 désigne la souche de laquelle est issue la protéine, PBP2x la protéine en question et T338A la mutation présente dans la protéine. Les noms en minuscules et en italiques désignent des gènes. Cette convention est utilisée pour d'autres souches, gènes et protéines tout au long du manuscrit.

l'antibiotique (Mouz et al., 1998). La structure de PBP2x du résistant clinique Sp328 a confirmé l'absence de cette molécule d'eau (Dessen et al., 2001).



**Figure 11 : Structure tridimensionnelle du site actif de PBP2x de la souche R6.**

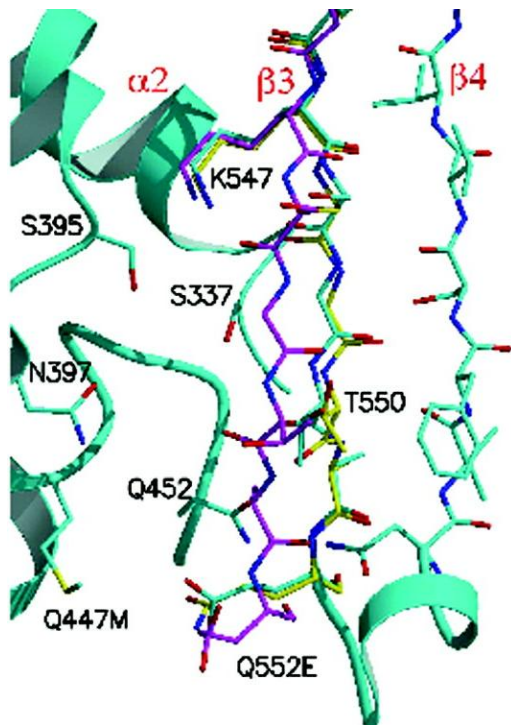
WAT est la molécule d'eau présente dans le site actif. S337 est la sérine active. Les flèches indiquent les liaisons hydrogènes entre la molécule d'eau et les atomes voisins (Mouz et al., 1998).

Dans un sous-ensemble de la famille ayant la mutation T338A, on observe la présence de la substitution M339F. Une corrélation a été identifiée entre la présence de cette mutation et le haut niveau de résistance des souches (Coffey et al., 1995; Asahi et al., 1999; Ferroni et al., 2001; Nagai et al., 2002; Chesnel et al., 2003). En plus de l'effet important de cette mutation sur l'efficacité d'acylation (les PBP2x possédant la substitution M339F ont un  $k_2/K$  pour la pénicilline 1000 fois plus faible que R6-PBP2x (Lu et al., 2001; Chesnel et al., 2003)), il y a un effet sur la vitesse de désacylation. Celle-ci est augmentée d'un facteur 40 à 70 pour la pénicilline pour les PBP2x des souches résistantes et l'effet est principalement dû à la substitution M339F (Di Guilmi et al., 2000; Lu et al., 2001; Chesnel et al., 2003). La combinaison des mutations aux positions 338 et 339 a un effet très important. Ainsi, R6-PBP2x-T338A-M339F a une efficacité d'acylation diminuée d'un facteur 26 pour la pénicilline et *in vivo* l'intégration de R6-*pbp2x*-T338A/M339F permet de diminuer la sensibilité de la souche R6 d'un facteur 2.

La structure du double mutant R6-PBP2x-A338T-M339F met en évidence un réarrangement du site actif. On observe une réorientation de la sérine 337 active qui ne pointe plus vers le centre du site actif, mais établit une liaison hydrogène avec T550 au lieu de K340 (Chesnel et al., 2003).

La mutation Q552E caractérise la troisième famille de séquences. L'introduction de cette mutation dans PBP2x provoque une réduction d'un facteur 4 de l'efficacité d'acylation et confère un faible niveau de résistance à la souche R6 (Mouz et al., 1999; Pernot et al., 2004). La structure de PBP2x de la souche 5259 ayant la mutation Q552E met en évidence un déplacement de 0.5Å du brin  $\beta_3$  qui porte le motif KTG, ce qui provoque une réduction

d'accessibilité au site actif. Le même mécanisme a été observé pour PBP2a de *Staphylococcus aureus* (Lim et al., 2002) (figure 12). De plus, l'introduction d'une charge négative à la position 552 modifie l'entrée du site actif et défavorise la liaison des  $\beta$ -lactamines qui sont chargées négativement (Mouz et al., 1999; Pernot et al., 2004).



**Figure 12 : Déplacement du brin  $\beta$ 3 dans PBP2a de *S. aureus* (magenta), PBP2x de la souche R6 (jaune) et PBP2x de la souche 5259 (cyan) (Pernot et al., 2004).**

Ces résultats mettent en évidence deux mécanismes de résistance différents. Il y a d'une part celui qui affecte la chimie du site actif (mutations T338A et M339F) et d'autre part celui qui influe sur l'accessibilité du site actif.

Une dernière mutation qui a été décrite comme étant impliquée dans les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines est T550A. Celle-ci confère une résistance exclusivement aux céphalosporines dans des souches cliniques et les mutants de laboratoire (Coffey et al., 1995; Grebe et al., 1996; Sifaoui et al., 1996; Asahi et al., 1999).

Le tableau 1 résume les effets phénotypiques et biochimiques des mutations étudiées précédemment dans le contexte de la souche sensible R6. On observe que les substitutions étudiées jusqu'ici ne sont responsables que d'une faible partie de la diminution d'efficacité d'acylation observée entre PBP2x de la souche R6 et les PBP2x d'origine clinique possédant ces substitutions.

	$k_2/K$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )				CMI ( $\mu g.ml^{-1}$ )				Réf.
	Céfotaxime		Pénicilline G		Céfotaxime		Pénicilline G		
	2x-R6	2x-Clin.	2x-R6	2x-Clin.	2x-R6	2x-Clin.	2x-R6	2x-Clin.	
<b>T338A</b>	115000 ± 3000	3600 ± 100	27000 ± 1000	250 ± 10	nt	0.64 <sup>a</sup>	nt	0.125 <sup>a</sup>	#1
<b>M339F</b>	46000 ± 3000	480 ± 30	18000 ± 500	104 ± 2	0.055	2.0 <sup>a</sup>	0.027	0.125 <sup>a</sup>	#1
<b>T338A-M339F</b>	9700 ± 400	480 ± 30	4300 ± 300	104 ± 2	0.134	2.0 <sup>a</sup>	0.034	0.125 <sup>a</sup>	#2
<b>Q552E</b>	54300 ± 5800	1520 ± 900	15100 ± 700	3670 ± 300	0.047	0.094	0.032	0.047	#2
<b>T550A</b>	22000 ± 500	-	93000 ± 7000	-	0.3	-	-	-	#3

**Tableau 1 : Effets phénotypiques et biochimiques des mutations T338A, M339F, Q552E et T550A.**

Dans la partie gauche du tableau sont présentées les efficacités d'acylation  $k_2/K$  pour les protéines PBP2x de la souche R6 ayant la ou les mutation(s) indiquée(s) dans la première colonne du tableau (2x-R6) et pour les protéines PBP2x de souches cliniques résistantes ayant entre autres la ou les mutation(s) indiquée(s) dans la première colonne (2x-Clin.). Les souches cliniques choisies sont la souche 4790 pour la mutation A338T, la souche 5204 pour la mutation M339F et la double mutation A338T-M339F et la souche 5259 pour la mutation Q552E.

La partie droite du tableau correspond aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la souche R6 transformée soit avec un gène *pbp2x* de cette même souche ayant la ou les mutation(s) indiquée(s) dans la première colonne du tableau (2x-R6), soit avec un gène *pbp2x* des souches cliniques résistantes citées ci-dessus (2x-Clin.).

L'efficacité d'acylation de R6-PBP2x est de  $223600 \pm 2070 M^{-1}.s^{-1}$  pour le céfotaxime et de  $84900 \pm 2900 M^{-1}.s^{-1}$  pour la pénicilline G. Les CMI de la souche R6 pour la pénicilline G et le céfotaxime sont inférieures à  $0,016 \mu g.ml^{-1}$ . nt: aucun transformant n'a été obtenu. a: le gène *pbp2x* en question a été co-transformé avec le gène *pbp1a* de la souche clinique résistante 5204. Réf. : références bibliographiques #1 (Chesnel et al., 2003), #2 (Pernot et al., 2004) et #3 (Grebe et al., 1996).

### III.2.2.5 Les mutations de PBP2b

Sur 90 séquences de PBP2b, deux substitutions sont toujours présentes dans les souches résistantes : T446A/S et E476G.

Seule la mutation T446A qui est directement adjacente au motif SXN a été caractérisée biochimiquement : elle réduit l'« affinité »<sup>4</sup> pour la pénicilline de 60% (Pagliero et al., 2004).

<sup>4</sup> L'affinité relative de R6-PBP2b-T446A a été déterminée en mesurant la quantité de  $\beta$ -lactamines nécessaire pour inhiber 50% de la fixation de pénicilline radioactive ( $IC_{50}$ ) et en la rapportant à celle nécessaire pour R6-PBP2b.

D'autres mutations ont été identifiées comme étant potentiellement impliquées dans le phénomène de résistance, mais leur importance relative et leurs implications mécanistiques n'ont pas été étudiées à ce jour. Ceci est principalement dû au fait qu'on ne dispose pas de structure à haute résolution de PBP2b.

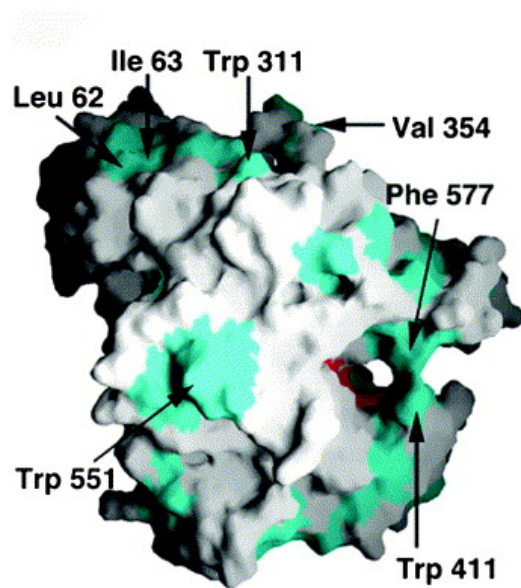
### III.2.2.6 Les mutations de PBP1a

Les hauts niveaux de résistance dépendent de PBP1a. Il y a principalement deux mutations importantes pour la réduction d'affinité de PBP1a pour les  $\beta$ -lactamines. Seules des études *in vivo* ont été faites pour cette protéine.

La première est T371A qui est la mutation équivalente à T338A dans PBP2x. La réversion de cette substitution dans une PBP1a d'une souche clinique résistante diminue le niveau de résistance conféré par PBP1a en présence de PBP2x et PBP2b de faible affinité (Smith et al., 1998). Certaines séquences mosaïques de PBP1a, y compris celles de souches très résistantes, ne possèdent pas cette mutation (Smith et al., 2003).

La seconde mutation correspond à un groupe de quatre résidus en position 574-577 : TSQF muté en NTGY. Ces quatre mutations sont observées dans toutes les séquences mosaïques. Leur réversion provoque une diminution de la résistance conférée par PBP1a (Smith et al., 2003). La structure tri-dimensionnelle de PBP1a révèle que le site catalytique est positionné dans une région allongée de type « tunnel » (Contreras-Martel et al., 2006). Ce dernier est fermé par une paroi hydrophobe qui est formée en partie par l'interaction entre F577 et W411 (figure 13). Les quatre mutations en positions 574-577 changent probablement les caractéristiques de l'entrée du tunnel en modifiant la polarité et en diminuant l'accessibilité du site actif à l'antibiotique (Smith et al., 2003).





**Figure 13 : Représentation de la surface du domaine TP de la PBP1a de *S. pneumoniae*.** Le site actif est marqué en rouge. Les résidus hydrophobes sont représentés en cyan. Les résidus Trp411 et Phe577 forment une paroi hydrophobe. (Contreras-Martel et al., 2006)

L539W est une mutation qui diminue aussi la résistance conférée par PBP1a. Mais elle n'a été observée que dans une seule souche résistante (Smith et al., 2003).

## IV Conclusion

Cette première partie met en évidence la complexité des mécanismes moléculaires de la résistance de *Streptococcus pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines. C'est surtout la mosaïcité des PBPs qui rend l'étude des mutations difficile. Grâce à des méthodes classiques de caractérisations fonctionnelles, phénotypiques et structurales, seules 4 mutations de PBP2x ont été caractérisées de façon détaillée depuis 1998 (Mouz et al., 1998).

Etant donné que les hypothèses d'implications de certaines substitutions dans le phénomène de résistance ne peuvent plus être faites par l'analyse de structures tridimensionnelles et d'alignements de séquences disponibles, il a fallu développer de nouvelles approches permettant d'étudier de nombreuses mutations plus efficacement. Ainsi, une méthode haut-débit de mutagenèse dirigée, d'expression, de purification et de caractérisation fonctionnelle des PBPs a été nécessaire pour une telle approche.

C'est dans ce contexte qu'une introduction bibliographique sur les méthodes à haut-débit et l'automatisation en biologie moléculaire, en biochimie et en biologie structurale est présentée dans la deuxième partie de cette introduction.

# **Les méthodes à haut-débit et l'automatisation en biologie moléculaire, biochimie et biologie structurale**

## **I Pourquoi l'automatisation ?**

Les disciplines émergentes de cette dernière décennie telles que la génomique, la protéomique ou la biologie des systèmes ont comme point commun l'importante quantité de données. Pour générer ces données, les laboratoires de recherche se tournent vers de nouveaux outils: l'automatisation. Un automate, ou robot, est un dispositif assurant un enchaînement automatique et continu d'opérations mécaniques.

Pour des raisons évidentes, l'industrie pharmaceutique utilise des automates depuis plusieurs dizaines d'années déjà pour le criblage de molécules à visée thérapeutique. Nous nous intéresserons ici uniquement à la robotisation des laboratoires de recherche académique dans le domaine de la biologie moléculaire, de la biochimie et de la biologie structurale.

L'implantation de l'automatisation permet aux chercheurs d'aborder des projets de recherche selon une approche dite haut-débit. En effet, grâce à la robotique, le traitement d'un problème biologique est beaucoup moins contraint par le nombre d'échantillons à analyser. De plus, la flexibilité des robots commercialisés actuellement est assez grande pour que chaque utilisateur puisse développer des protocoles adaptés à son sujet de recherche. D'autre part, l'automatisation contribue aussi fortement à la libération des chercheurs des tâches fastidieuses de manipulation de liquides biologiques, à la réduction des coûts des expériences par la diminution des volumes réactionnels, à la limitation des risques d'erreurs et à la traçabilité et la reproductibilité des manipulations effectuées. C'est donc sans surprise que l'on observe actuellement un développement important d'automates dédiés aux laboratoires de recherche en biologie. Notons que, malgré la standardisation et l'accessibilité croissante des protocoles et des kits commerciaux dédiés à la robotisation, une phase de développement technique pour la mise au point des méthodes est généralement incontournable.

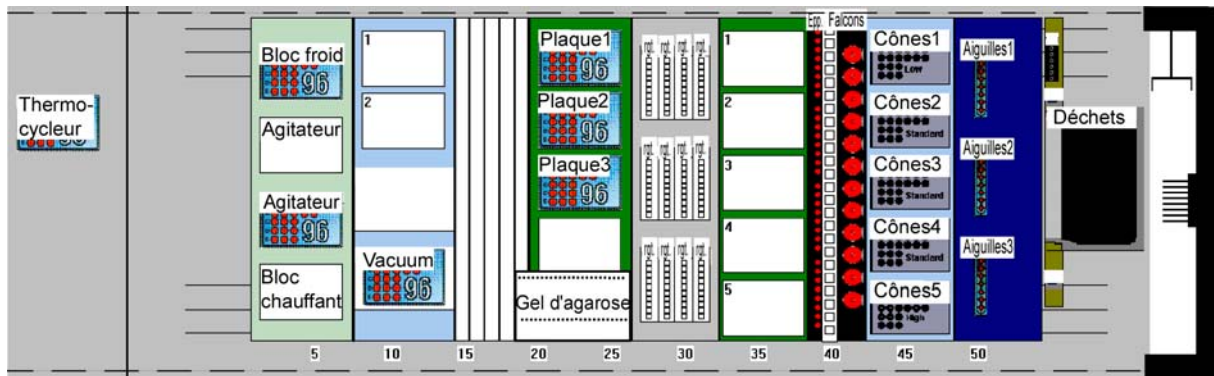
## II Capacités des automates

Il existe principalement deux catégories de robots. La première englobe les instruments spécialisés dans une tâche unique, comme par exemple les robots pour le dépôt d'ADN sur support, les collecteurs de colonies bactériennes ou encore les distributeurs de liquides. La seconde se réfère à des automates multifonctionnels permettant de faire de nombreuses tâches différentes sur une même plateforme. Ces derniers sont caractérisés par leur flexibilité et leur adaptabilité à divers types d'applications. Les principales entreprises qui commercialisent ce type de robots sont regroupées dans le tableau 2.

<b>Entreprise</b>	<b>Site internet</b>
Beckman Coulter	<a href="http://www.beckmancoulter.com">www.beckmancoulter.com</a>
Cartesian/Genome Solutions	<a href="http://www.cartesiantech.com">www.cartesiantech.com</a>
Colibri	<a href="http://www.colibrirobotics.com">www.colibrirobotics.com</a>
CyBio	<a href="http://www.cybio-ag.com">www.cybio-ag.com</a>
Gilson	<a href="http://www.gilson.com">www.gilson.com</a>
Hamilton Co.	<a href="http://www.hamiltoncompany.com">www.hamiltoncompany.com</a>
Matrix Technologies (formerly Apogent)	<a href="http://www.matrixtechcorp.com">www.matrixtechcorp.com</a>
Molecular Devices	<a href="http://www.moleculardevices.com">www.moleculardevices.com</a>
Perkin-Elmer	<a href="http://www.perkinelmer.com">www.perkinelmer.com</a>
Protodyne	<a href="http://www.protodyne.com">www.protodyne.com</a>
Qiagen	<a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a>
Robbins Scientific	<a href="http://www.robsci.com">www.robsci.com</a>
RoboDesign	<a href="http://www.robodesign.com">www.robodesign.com</a>
Sias	<a href="http://www.sias.biz">www.sias.biz</a>
Tecan	<a href="http://www.tecan.com">www.tecan.com</a>
TekCel	<a href="http://www.tekcel.com">www.tekcel.com</a>
The Automation Partnership	<a href="http://www.automationpartnership.com">www.automationpartnership.com</a>
Titertek	<a href="http://www.titertek.com">www.titertek.com</a>
Tomtec	<a href="http://www.tomtec.com">www.tomtec.com</a>
TTP Labtech	<a href="http://www.ttplabtech.com">www.ttplabtech.com</a>
Velocity11	<a href="http://www.velocity11.com">www.velocity11.com</a>
Xiril	<a href="http://www.xiril.com">www.xiril.com</a>
Zinsser Analytic	<a href="http://www.zinsser-analytic.com">www.zinsser-analytic.com</a>
Zymark	<a href="http://www.zymark.com">www.zymark.com</a>

**Tableau 2 : Entreprises commercialisant des systèmes de type manipulateurs de liquides.** (Felton, 2003)

Un exemple de plateforme d'un robot de type manipulateur de liquide est représenté dans la figure 14.



**Figure 14 : Représentation schématique de la plateforme du robot MicrolabStar™ de Hamilton.**

La structure noire à droite représente un élément mobile portant la tête de pipetage à 8 positions et un bras robotisé. Cet élément se déplace sur deux rails représentés par des pointillés. Les rectangles blancs correspondent à des positions libres pouvant accueillir différents types de microplaques. Les éléments en position 30 sont des réservoirs de liquides. Epp. : portoirs pour des tubes de type « eppendorfs ». « Falcons » : portoir pour des tubes de type « falcon » de 15 et 50 ml.

De manière générale, les supports utilisés sont des microplaques standard de dimension extérieure 128x86 mm à usage unique selon la norme SBS/ANSI (Society for Biomolecular Sciences/American National Standards Institute). Il existe une multitude de formats allant de 6 à 3456 puits, avec des volumes de 16 ml à 14 µl, des natures de plastiques et des formes de puits variables (fonds coniques, ronds, plats, etc....).

Dans les paragraphes suivants, un inventaire des capacités existantes sur les robots est présenté.

## II.1 Manipulation de liquides

La tête de pipetage est l'élément central d'un robot. Aspirer et distribuer des liquides est l'application la plus souvent automatisée. Mais c'est aussi la plus difficile à mettre en œuvre. Il faut en effet que les systèmes soient flexibles, qu'ils permettent de traiter de très nombreux échantillons en parallèle, qu'ils pipètent de manière très précise et reproductible et qu'ils disposent de moyens de contrôle et de mesure d'erreurs.

Il existe deux principales technologies de pipetage : l'aspiration et la distribution par déplacement de liquide et celles par déplacement d'air (Felton, 2003). La première utilise un fluide de pipetage (« working fluid ») généralement contrôlé par une valve solénoïde et une seringue. Ce système permet de pipeter une large gamme de volumes allant jusqu'à des

volumes très faibles (de l'ordre du nanolitre) de manière très précise. L'inconvénient de cette méthode réside dans l'influence des variations de pression et de température sur le débit du fluide de pipetage et par là même sur le volume distribué ou aspiré. La méthode de déplacement d'air est calquée sur le modèle des pipettes manuelles traditionnelles. Ce système n'utilise pas de fluide de pipetage, évitant ainsi la contamination des échantillons. Mais la compressibilité de l'air peut générer des erreurs de pipetage lors de la manipulation de petits volumes. Notons qu'avec l'avènement des nanotechnologies, des robots distribuant des volumes de l'ordre du nanolitre sont maintenant commercialisés (Picoliter Inc., TTP Lab Tech). Ces automates sont équipés de pipettes piézo-électriques et de distributeurs de type jet d'encre (Hsieh et al., 2004). Cette technologie vise à étudier entre autres des systèmes à cellule unique avec l'avantage d'un effet de dilution très faible. Ces techniques induisent néanmoins beaucoup de contraintes, car il faut adapter les supports, les conditions atmosphériques et inventer de nouvelles méthodes de contrôle du flux adaptées.

Le nombre de cônes ou d'aiguilles fixes ou détachables sur une tête de pipetage varie généralement entre 4 et 384. Les systèmes récents de fixation des cônes sur les canaux permettent d'atteindre une précision de 0.1 mm sur les trois axes. Les volumes pipetés de manière courante varient de 20 nl (Cartesian Technologies Inc.) à plus de 1 ml (Qiagen).

Le contrôle et l'identification d'erreurs de pipetage sont un point critique dans l'automatisation. Les robots peuvent détecter la présence de liquide ou de bulles d'air, identifier des problèmes d'obstruction de cônes ou d'aiguilles, détecter l'interface entre une phase aqueuse et une phase organique et même mesurer le volume contenu dans un puits. Généralement, les niveaux de liquides sont déterminés par des mesures de pression ou de conductivité, mais actuellement des méthodes acoustiques sont en cours de développement (Felton, 2003).

## **II.2 Bras robotisés, éléments mobiles et stockage**

Pour minimiser les interventions manuelles, les automates sont équipés de bras robotisés qui peuvent déplacer des microplaques, des tubes et autres éléments non-fixes. Ainsi, il existe par exemple des robots de montage/démontage de cristaux de protéines sur certaines lignes de lumière dédiées à la cristallographie des protéines (e. g. CATS, robot installé sur la ligne de lumière FIP (« French beamline of Investigations of Proteins ») à l'ESRF de Grenoble).

Le stockage des microplaques peut être automatisé par l'utilisation de portoirs sur lesquels il est possible d'empiler des plaques une par une ou par groupe. Différents moyens de transferts tels que des bras articulés, des ascenseurs ou des carrousels amènent ainsi les échantillons dans des enceintes de stockage qui peuvent être thermostatées.

Des systèmes robotisés de convoyage de microplaques par un acheminement des portoirs sur des rails ou des carrousels permettent d'augmenter le rendement d'une approche haut-débit.

### **II.3 Thermocycleurs**

Des thermocycleurs sont fréquemment associés aux automates. Ces derniers sont rarement utilisés exclusivement pour la PCR. Ils peuvent par exemple servir d'incubateurs pour des digestions enzymatiques ou pour les chocs thermiques de bactéries.

En raison de nombreuses applications de la PCR (Vosberg, 1989; Innis, 1990; Komminoth et al., 1993; Reischl et al., 1995; Tse et al., 2003), beaucoup de nouvelles technologies se développent dans ce domaine. Ainsi, Roche a mis au point un thermocycleur à air pulsé (IndyCycler™) qui permet de faire des PCR en 35 min. Le Rapid cyclor™ de Biogene utilise des capillaires en verre et peut traiter 48 échantillons en 10 minutes. Plus récemment, Genesystem a développé le GenDisc Cyclor™ qui est un analyseur d'ADN par PCR en temps réel. Ce dernier utilise un consommable jetable au format d'un disque CD. Ce disque permet le traitement simultané de 3 à 6 échantillons par heure et peut faire varier jusqu'à 12 paramètres par échantillon. Un réseau de micro-canaux permet de répartir automatiquement les échantillons vers les différents secteurs d'analyse. La PCR est réalisée par rotation du disque sur 2 ou 3 thermorésistances programmées aux températures adéquates.

### **II.4 Stations de lavages, de filtrations et modules magnétiques**

Cette catégorie de modules fixes des plateformes automatisées est essentielle pour de nombreuses applications en biologie moléculaire, biochimie et biologie structurale. Pour limiter l'utilisation de cônes à usage unique, de nombreux utilisateurs préfèrent acheter des robots équipés d'aiguilles métalliques fixes ou de cônes réutilisables avec des stations de lavage associées. Ces dernières sont entièrement autonomes et permettent de laver l'extérieur et l'intérieur de 8 à 384 aiguilles ou cônes en parallèle.

Les blocs de filtration sont en général constitués d'un emplacement de microplaque délimité par un joint et équipé d'une ouverture centrale couvrant toute la surface où se trouvent les puits. Cet emplacement est relié à une pompe à vide permettant l'aspiration du liquide contenu dans les puits par le bas. Ces accessoires sont très utiles pour les purifications d'ADN et de protéines utilisant des microplaques filtrantes et pour remplacer des étapes de centrifugation (Scheich et al., 2003).

L'utilisation de modules magnétiques s'applique à de nombreux tests biologiques (Haukanes et al., 1993), tels que l'isolation de protéines liant l'ADN (Ren et al., 1994), l'analyse de séquences spécifiques d'ADN (Boffa et al., 1995), ou encore l'immuno-séparation magnétique de souches bactériennes exprimant des antigènes de surfaces caractéristiques (Olsvik et al., 1994). Ils sont généralement très utiles pour des manipulations de routines telles que les purifications de protéines ou d'ADN. Ces modules permettent d'incuber et de laver des billes magnétiques ayant fixé l'échantillon étudié en utilisant un aimant qui les maintient dans les puits lors des différentes étapes de pipetage.

## **II.5 Incubateurs, agitateurs et portoirs**

Les incubateurs et les agitateurs sont la plupart du temps adaptés pour un format de microplaques classique. On trouve des blocs de réfrigération permettant de conserver à 4°C des réactifs sensibles tels que des bactéries compétentes ou des enzymes, ainsi que des blocs chauffants utilisés par exemple pour des digestions, des cultures ou encore des étapes d'évaporation. Ces blocs peuvent parfois aussi servir comme agitateurs. Cette dernière application est néanmoins le plus souvent isolée, évitant ainsi des variations de température pendant les incubations. Généralement la vitesse d'agitation maximale ne dépasse pas 2000 rpm.

On trouve aussi souvent des portoirs pour tous types de tubes, augmentant ainsi la flexibilité des supports utilisés.

Notons que la gestion par code-barres des portoirs et des plaques est incontournable quand on travaille en haut-débit.



## II.6 Détecteurs et caméras

Certains robots sont capables de lire et de quantifier la fluorescence grâce à des détecteurs photomultiplicateurs combinés à des scanners à lumière laser. Des caméras associées à des sources de lumières ultra-violettes ou au xénon permettent de faire de l'imagerie en fluorescence (Patton, 2000).

Pour la biologie moléculaire, il existe des robots piqueurs de colonies bactériennes (BioPick<sup>TM</sup> de BioRobotics). Ces derniers sont équipés d'une caméra CCD, d'un logiciel d'analyse d'images qui identifie les colonies et d'aiguilles de repiquage qui redistribuent les colonies dans des plaques de cultures qui ont généralement 384 puits (Uber et al., 1991; Lehrach, 1997). Ce type d'instrument est particulièrement utile pour la construction et l'étude de bibliothèques d'expression (Bussow et al., 1998).

Une dernière catégorie d'instruments « non-aveugles » est celle des robots de visualisation de gouttes en cristallographie de protéines (Optimag Veeco Oasis 1700 Imager<sup>TM</sup>). Ces derniers disposent d'un microscope couplé à une caméra CCD et utilisent un algorithme d'analyse d'image pour la détection de cristaux (Spraggon et al., 2002).

## II.7 Microfluidique

Pour faire face aux besoins de traitement de nombreux échantillons en parallèle dans des volumes de plus en plus faibles, on observe depuis quelques années le développement de plateformes à puces équipées de systèmes microfluidiques (laboratoire sur puce). Le terme microfluidique se réfère à des instruments, des systèmes et des méthodes dédiés à la manipulation de flux de fluides sur des distances de l'ordre du micromètre (Pihl et al., 2005). Ces derniers permettent une parallélisation massive, ainsi qu'une diminution considérable du temps nécessaire par échantillon traité et constituent une alternative sérieuse aux systèmes robotisés actuels (Hong et al., 2003).

Le premier instrument nanofluidique qui a été développé manipule des gouttelettes selon un processus électrocinétique et permet de faire des analyses d'ADN incluant des réactions enzymatiques et des analyses par électrophorèse (Burns et al., 1998). Plus récemment, Caliper Life Science a développé un système adapté à de nombreuses applications haut-débit tels que les tests enzymatiques utilisés dans le criblage de nouvelles molécules thérapeutiques (Johnson, 2002).

## II.8 Logiciels de pilotage

Ces logiciels ont des interfaces utilisateurs très similaires. Il s'agit de logiciels de type « drag and drop » (« traîner et déposer ») très simples. Les protocoles sont créés par l'ajout successif d'étapes préprogrammées par défaut. En général, une fois que les étapes sont insérées aux protocoles (pipeter, agiter, déplacer, etc.), elles peuvent être modifiées pour préciser les volumes à pipeter, les vitesses d'agitation, les destinations des plaques, etc.

## II.9 Gestions de données

En raison de la grande accumulation d'informations engendrée par les approches haut-débit, il a fallu développer des systèmes de gestion informatisés des données : les LIMS (« Laboratory Information Management Systems »). Le but de ces outils est de suivre, de traiter, de stocker et de gérer les informations et les produits générés par l'activité automatisée. Il y a trois domaines fonctionnels dans un LIMS. Le premier est le suivi de l'échantillon : il se traduit en général par une simple corrélation entre un tube ou un puits et une entrée dans une base de données. Le second est la documentation des données brutes d'analyse des échantillons. Le troisième est l'organisation des résultats sous une forme compréhensible pour l'utilisateur final.

En 2000, on décomptait déjà 92 LIMs (Avery et al., 2000). On peut classer ces systèmes de gestion en trois catégories principales : applications générales, cliniques et spécialisées.

Parmi les LIMS disponibles gratuitement en ligne, on trouve HalX (<http://halx.genomics.eu.org/>) (Prilusky et al., 2005) qui peut être décrit comme un cahier de laboratoire électronique couvrant toutes les étapes allant du clonage de gènes jusqu'à l'analyse des données de cristallographie des protéines. CLIMS2 est un LIMS dédié aux grands programmes de génomique structurale (<http://clims.med.monash.edu.au>) (Amin et al., 2006). Pour l'analyse et le stockage des résultats issus des puces à ADN, le programme MARS a été développé (<http://genome.tugraz.at>) (Maurer et al., 2005). Enfin, un dernier exemple est MMP-LIMS, spécialisé dans la cartographie du génome du maïs (<http://www.maizemap.org/bioinformatics.htm>) (Sanchez-Villeda et al., 2003).

## III Principales applications haut-débit automatisées

### III.1 Biologie moléculaire

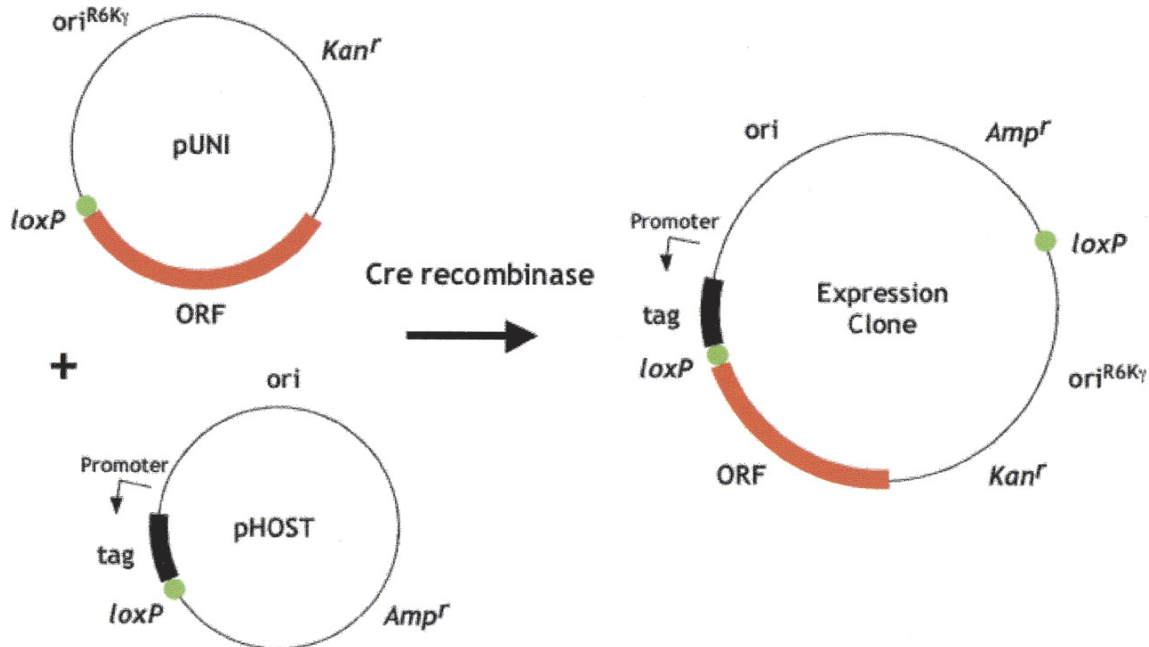
#### III.1.2 Clonage

La première étape d'un clonage consiste en règle générale à faire une PCR ou une RT-PCR pour générer un grand nombre de copies du gène à étudier. En raison de l'utilisation d'une polymérase, il y a un risque non négligeable d'introduction de mutations à prendre en compte. L'utilisation de gènes synthétiques permet d'optimiser plus facilement la séquence par rapport aux codons rares ou aux régions régulatrices, ainsi que d'éviter la mise au point des conditions de PCR souvent nécessaire.

Les systèmes de clonage utilisant des enzymes de restriction sont mal adaptés au haut-débit. Ces méthodes ont comme principal inconvénient de nécessiter des sites de restrictions absents dans les inserts et des mises au point de conditions d'incubation pour les digestions. Des stratégies indépendantes des sites de restrictions sont plus efficaces, notamment la méthode du LIC (« Ligation Independent Cloning ») qui consiste à ajouter des séquences homologues au vecteur de part et d'autre de l'insert, de créer des extrémités cohésives d'une longueur de 12 à 15 nucléotides par digestion du vecteur et de l'insert en utilisant l'activité exonucléase de la T4 DNA-polymérase, d'hybrider le vecteur et l'insert et de directement transformer le produit d'hybridation dans les bactéries (Aslanidis et al., 1990).

Depuis la découverte de la disponibilité et de la possible utilisation de la recombinaison homologue pour cloner de l'ADN dans *Escherichia coli* (Zhang et al., 1998), de nouvelles méthodes de clonage facilement adaptables à des méthodes haut-débit se sont développées. Il s'agit du transfert de gènes d'un vecteur à l'autre *in vitro*. Il y a principalement trois systèmes permettant de cloner des gènes en utilisant la recombinaison homologue (Marsischky et al., 2004). Ce sont les systèmes commerciaux Gateway<sup>TM</sup> de Invitrogen et Creator cloning system<sup>TM</sup> de Clontech, ainsi que Univector cloning system du laboratoire de Stephen Elledge (Baylor College of Medicine) (figure 15) (Liu et al., 1998; Liu et al., 2000). Tous trois se basent sur l'utilisation de séquences de recombinaison placées à une extrémité ou de part et d'autre de l'insert et présentes dans le vecteur de clonage. Elles utilisent un recombinaise (BP et LR clonase pour Gateway<sup>TM</sup>, in-fusion et cre-recombinase pour Creator cloning system<sup>TM</sup>, Cre-recombinase pour Univector) qui permet d'intégrer l'insert dans le vecteur tout en

éliminant un gène létal (*ccdb* dans Gateway™) ou en insérant un gène de résistance, permettant ainsi la sélection des clones recombinants. Notons que ces systèmes nécessitent que le gène soit préalablement cloné dans un vecteur pour pouvoir ensuite par exemple le transférer dans différents systèmes d'expression.



**Figure 15 : Fonctionnement du système de clonage Univector.**

Un vecteur pUNI portant le gène à cloner est fusionné avec un vecteur hôte par recombinaison au niveau des sites *loxP*.

Un autre système de clonage particulièrement adapté au haut débit est le « Gap-repair cloning » qui utilise la recombinaison homologe dans la levure. Le fragment d'ADN à cloner est amplifié par PCR avec des oligonucléotides permettant l'ajout de séquences homologues à un vecteur de clonage de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La recombinaison du produit de PCR et du vecteur linéarisé se fait ensuite *in vivo* (Marsischky et al., 2004).

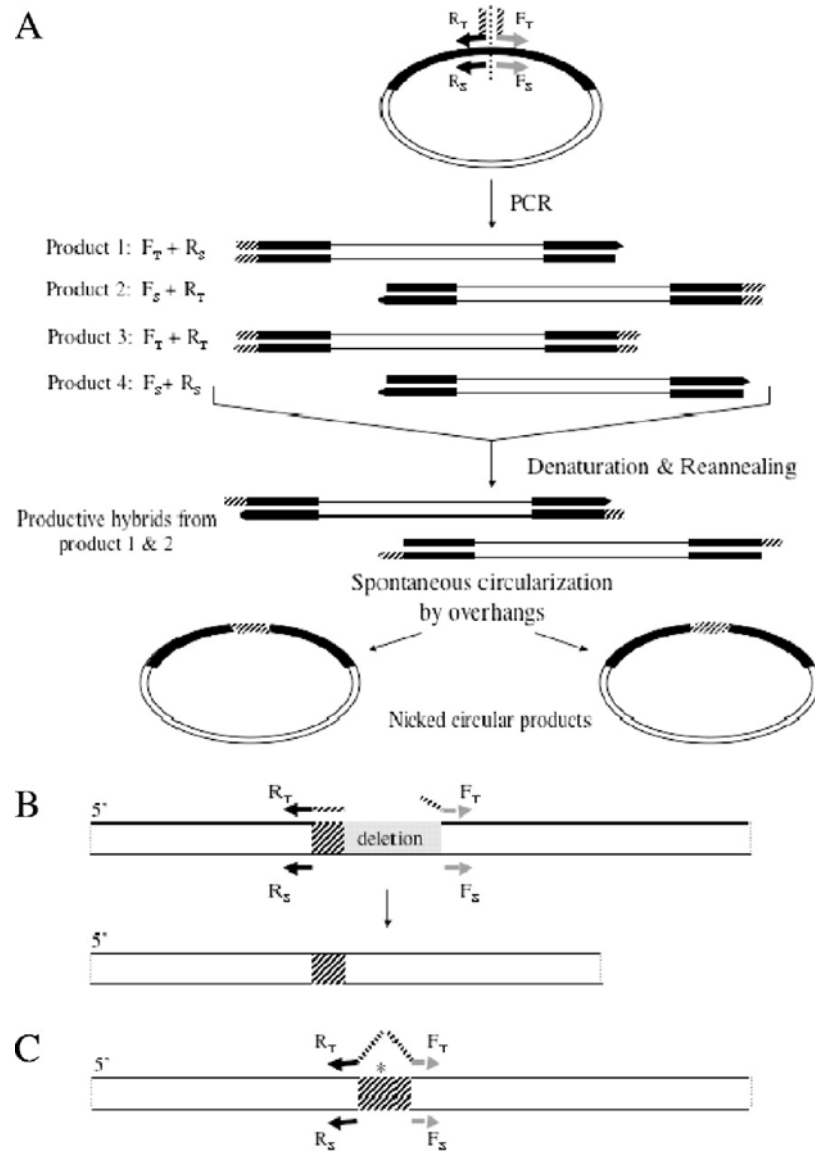
Il a été récemment démontré qu'une adaptation de la méthode de mutagenèse dirigée QuickChange™ de Stratagene permet de cloner un produit PCR à un endroit précis d'un vecteur quelconque sans modifier la séquence de l'insert ou du vecteur (van den Ent et al., 2006). Cette technique se base sur l'hybridation *in vitro* de séquences homologues à la partie du vecteur de clonage ciblé. Ces séquences se trouvent de part et d'autre de l'insert qui se comporte comme un couple d'oligonucléotides de mutagenèse, introduisant une insertion correspondant à l'insert à cloner. Du fait de sa simplicité, cette technique est prometteuse pour le clonage à haut-débit.

### III.1.2 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée utilisant des oligonucléotides mutagéniques et celle par PCR sont les deux principales méthodes automatisables.

La première peut se faire soit par la méthode de Kunkel qui utilise un ADN matrice simple brin et un unique oligonucléotide mutagénique (Kunkel et al., 1991), soit par la méthode QuickChange™ de Stratagene. Cette dernière est particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'introduire une ou plusieurs mutations dans un plasmide quelconque en trois étapes seulement : PCR de mutagenèse pour amplifier les deux brins du plasmide en insérant les mutations, digestion des brins non-mutés qui sont méthylés par l'endonucléase DpnI et transformation de la réaction dans les bactéries. Des adaptations de cette méthode permettent de faire de la mutagenèse saturante à un site précis (Zheng et al., 2004) ou sur toute la longueur du gène étudié en créant une banque de mutants (Saboulard et al., 2005).

La seconde méthode de mutagenèse se base sur la PCR classique (Sambrook, 1989). Il existe de nombreuses variations de la méthode par PCR (Kammann et al., 1989; Giebel et al., 1990; Mikaelian et al., 1992; Michael, 1994; Ke et al., 1997; Wu et al., 2005). Celles-ci ne sont pas très attractives pour l'automatisation car elles impliquent l'utilisation d'au moins trois oligonucléotides et nécessitent le sous-clonage du produit final dans un vecteur. Mais récemment, une nouvelle technique de PCR mutagénique entièrement automatisable, sans sous-clonage, atteignant des efficacités supérieures à 95% et très rapide (4h), a été décrite (Chiu et al., 2004). La méthode est basée sur des amplifications inverses de la matrice à muter avec deux oligonucléotides longs portant des extensions complémentaires contenant la mutation à intégrer et deux oligonucléotides courts. Après une réaction de PCR unique avec les quatre oligonucléotides, le produit d'amplification est dénaturé par chauffage. En diminuant la température, un vecteur muté se forme par hybridation des extrémités cohésives. Cette méthode appelée SLIM (« Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis ») semble prometteuse pour des applications haut-débit (figure 16).



**Figure 16 : Représentation schématique de la méthode de clonage SLIM.**

Les parties des oligonucléotides spécifiques au gène sont représentées par des flèches. Les parties hachurées sont les extensions aux extrémités 5'. Les oligonucléotides directs sont représentés en noir et les oligonucléotides indirects en gris.

A : insertion de séquence ; B : délétion de séquence ; C : échange de séquence. (Chiu et al., 2004)

Notons que pour toute mutagenèse dirigée, un point important est la conception des oligonucléotides de mutagenèse. Celle-ci est aujourd'hui facilitée par la disponibilité de programmes spécialisés tels que primer generator (<http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi>) (Turchin et al., 1999) ou primerX (<http://bioinformatics.org/primerx/links.html>).

### III.1.3 Séquençage d'ADN

Les nombreux projets de séquençage d'organismes divers représentent un marché de plusieurs centaines de millions de dollars par an (Smailus et al., 2005). Des nouvelles approches automatisées se développent afin de diminuer le coût par échantillon. Ces dernières se basent soit sur de nouvelles techniques telles que le séquençage par synthèse (Brenner et al., 2000), le séquençage sur colonies polymérasés (Mitra et al., 2003) ou le séquençage de molécules uniques (Braslavsky et al., 2003), soit sur des adaptations de la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977) visant à utiliser des volumes faibles de réactifs. Ce dernier cas est actuellement le plus utilisé. Les adaptations sont par exemple le séquençage utilisant quatre fluorophores différents pour marquer les nucléotides terminateurs (Smith et al., 1986), celui utilisant des électrophorèses en capillaires (Dovichi, 1997) et celui se faisant dans des compartiments ayant des volumes de l'ordre du nanolitre (Smailus et al., 2005).

### III.1.4 Technologie des puces

Cette technologie est particulièrement intéressante dans le domaine du criblage à haut-débit. Elle permet d'étudier de très nombreux échantillons en très faible quantité et d'en extraire beaucoup d'informations. Méthodologiquement, il s'agit de tester ou d'identifier des ligands potentiels par hybridation sur des puces portant des « micro-spots » d'ADN, de protéines ou de petites molécules organiques.

L'utilisation la plus commune est l'analyse de l'expression de gènes par des puces à oligonucléotides, ADNc ou ARN. Dans cette application, il existe deux principales catégories. La première concerne les puces modulables et adaptables à de nombreuses applications se basant sur un format de lame de microscope. La seconde correspond à tous les autres types de puces. Dans cette deuxième catégorie, le plus important fabricant est le pionnier Affymetrix. Il a été le premier à exploiter ce domaine avec la puce GenChip<sup>TM</sup> (Fodor, 1995) et fabrique aujourd'hui des puces portant plus de 250000 fragments d'ADN. Un exemple d'application haut-débit potentielle est la mesure des changements des niveaux d'ARNm dans le domaine de la classification et du diagnostic prédictif des cancers (Khan et al., 2001).

Les puces à protéines sont des outils prometteurs pour la recherche de molécules thérapeutiques et le diagnostic (Stoll et al., 2002). Malgré certains problèmes techniques

comme la stabilité ou le maintien de la fonctionnalité des protéines (Howbrook et al., 2003), certaines applications ont déjà été décrites. Ainsi, MacBeath et Schreiber ont pu étudier l'activité de liaison de trois paires de protéines connues en utilisant des puces à protéines de type lames de microscope (MacBeath et al., 2000).

Deux autres technologies émergentes dans ce domaine sont les puces à sucres (Fukui et al., 2002) et les puces à tissus ou cellules (Kononen et al., 1998).

## III.2 Biochimie

### III.2.1 Expression et purification de protéines recombinantes

Les protéines purifiées sont des réactifs clés pour de nombreux tests qui permettent parfois de comprendre des points fondamentaux comme la structure, la fonction ou la régulation des protéines. Leur disponibilité est donc essentielle.

Généralement, les systèmes d'expression et de purification automatisés se font en format de microplaques. Mais on peut aussi automatiser des purifications haut-débit en format plus grand. En effet, Scott A. Lesley rend compte d'une purification automatisée simultanée de 96 protéines à partir de 96 cultures bactériennes de 70 ml utilisant des automates spécialisés avec des rendement moyens de 10 mg de protéines (Lesley, 2001).

#### III.2.1.1 Les systèmes d'expression

Le système d'expression le plus utilisé et le mieux adapté au haut-débit est le système bactérien *Escherichia coli*. Ses principaux avantages sont la robustesse du système, le faible coût et la facilité d'utilisation. Un excellent exemple d'application de ce dernier est l'étude du protéome de *Methanobacterium thermo-autotrophicum* pour lequel 424 protéines non-membranaires ont été clonées et produites dans *E. coli* pour des analyses structurales. 80% de ces protéines ont pu être exprimés et 100 d'entre elles étaient solubles. 10 structures tridimensionnelles ont été résolues dans cette étude (Christendat et al., 2000). Mais cette méthode d'expression présente aussi de nombreux inconvénients comme la formation de corps d'inclusions, le repliement non natif des protéines et le manque de modifications post-



traductionnelles. C'est pourquoi d'autres méthodes d'expression ont été amenées à l'automatisation.

Bien que plus difficile à mettre en œuvre, les systèmes d'expression eucaryotes sont souvent incontournables pour certaines protéines. Ils ont notamment la propriété de glycosyler et de phosphoryler les protéines recombinantes. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* sont les organismes eucaryotes les plus utilisés dans le haut-débit (Boettner et al., 2002; Holz et al., 2002). Les cellules de mammifères sont la méthode de choix pour l'expression de protéines humaines, mais elles présentent deux inconvénients majeurs qui sont leur fragilité et leurs faibles niveaux d'expression. Un compromis entre ces deux méthodes est le système d'expression en cellules d'insectes. Celui-ci conserve l'avantage d'une certaine robustesse ainsi que d'une bonne expression et permet des modifications post-traductionnelles proches de celles des cellules de mammifères (Gilbert et al., 2002).

Les systèmes d'expression acellulaires sont particulièrement bien adaptés à l'automatisation à cause de l'absence de membranes cellulaires, ce qui permet de s'affranchir de l'étape d'intégration de l'ADN dans les cellules, de la lyse cellulaire et de la clarification du lysat. L'absence de cellules vivantes évite les problèmes de toxicité et l'ouverture du système permet des manipulations directes des conditions réactionnelles (Betton, 2004). De plus, les systèmes d'expression utilisant des lysats de cellules eucaryotes ont l'avantage de faire les modifications post-traductionnelles adéquates (Braun et al., 2003). Les systèmes les plus courants se basent sur des lysats de bactéries, de germes de blé et de réticulocytes. Des rendements de  $6 \text{ mg.ml}^{-1}$  de protéines purifiées peuvent être atteints avec ce type de système (Kigawa et al., 1999).

### III.2.1.2 Criblage d'expression et de solubilité

Dans les processus haut-débit, la première étape consiste souvent à tester différentes conditions d'expression en faisant varier des paramètres comme la température, la souche d'expression, les milieux de culture, l'étiquette de la protéine et sa localisation N- ou C-terminale pour identifier un protocole qui maximise la quantité de protéines solubles récupérées. Certains groupes ont développé des tests de criblages pour rapidement estimer la solubilité des protéines. Pour éviter les longs processus de lyse et de purification, des protocoles de criblages *in vivo* ont été mis au point (Wigley et al., 2001; Lesley et al., 2002a). Wigley et al. ont ainsi développé une méthode se basant sur la complémentation structurale

des fragments  $\alpha$  et  $\omega$  de la  $\beta$ -galactosidase. Dans ce système, l'activité enzymatique est corrélée avec la solubilité des protéines fusionnées avec le domaine  $\alpha$ .

D'autres approches plus fiables et plus directes consistent à faire soit des micro-purifications, soit des lyses suivies de quantifications relatives des protéines solubles par ELISA (Lesley et al., 2002a), dot-blot (Knaust et al., 2001; Busso et al., 2003; Vincentelli et al., 2005), spectrométrie de masse (Chance et al., 2002) ou SDS-PAGE (Braun et al., 2002; Hammarstrom et al., 2002; Shih et al., 2002).

### III.2.1.3 Lyse

Les lyses cellulaires sont généralement chimiques, bien qu'il existe maintenant des instruments de lyse par ultrasons adaptés au haut-débit (Moreland et al., 2005). Les cellules sont lysées par une incubation dans un tampon contenant du lysozyme ou dans un tampon de lyse commercial tel que le Bugbuster<sup>TM</sup> de Novagen, le CelLytic<sup>TM</sup> de Sigma ou le Popculture<sup>TM</sup> de Invitrogen. Pour diminuer la viscosité du lysat, on rajoute souvent une nucléase.

La lyse peut se faire directement sur les cultures ou sur les culots de bactéries. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases peut être ajouté lors de cette étape pour limiter la dégradation des protéines au cours de la purification.

### III.2.1.4 Purification

On peut considérer que la purification par affinité de protéines portant une étiquette est une règle générale dans les approches automatisées (Acton et al., 2005). L'étiquette 6xHistidine est la plus répandue à cause de sa petite taille qui limite probablement l'encombrement stérique, de son affinité relativement forte pour les colonnes d'affinité aux ions métalliques, et de sa fonctionnalité dans des conditions dénaturantes. Cette étiquette n'est malheureusement pas très efficace pour les protéines eucaryotes. Des étiquettes plus grandes comme la GST (« Gluthation-S-Transférerase ») et la MBP (« Maltose Binding-Protein ») sont plus adaptées pour ces dernières car elles ont un effet stabilisant et solubilisant (Murby et al., 1996; Braun et al., 2002; Waugh, 2005).

La fixation des protéines, les lavages et l'élution se font soit en microplaques de filtration associées à un bloc de filtration pour des purifications sur des résines d'affinité classiques (Scheich et al., 2003), soit en microplaques normales associées à un élément magnétique pour des résines d'affinité couplées à des billes magnétiques (Lin et al., 2005a).

Les manipulations sont généralement faites sur une plateforme automatisée ayant tous les éléments nécessaires, évitant ainsi les interventions manuelles.

### **III.2.1.5 Repliement *in vitro***

Un des points critiques dans l'expression de protéines hétérologues dans *E. coli* est la formation fréquente d'agrégats amorphes de protéines mal repliées appelés corps d'inclusions. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des méthodes de repliement des protéines qui se trouvent sous forme agrégée.

La stratégie générale de renaturation des protéines consiste en l'isolation des corps d'inclusions, en la solubilisation en présence de hautes concentrations en agents chaotropes, en la purification de la protéine dénaturée et finalement au repliement en retirant de manière contrôlée l'agent dénaturant. La dernière étape de changement de tampon peut se faire par dilution, par dialyse, par dia-filtration ou sur colonne (Li et al., 2004). Pour vérifier le bon repliement de la protéine, un test fonctionnel est souvent mis en œuvre. Mais cela implique de connaître la fonction de chaque protéine, ce qui est rare dans les approches haut-débit. Des méthodes telles que le dichroïsme circulaire, la fluorescence, la diffusion dynamique de lumière ou encore la sensibilité aux protéases (Heiring et al., 2001) se sont donc développées.

Bien que Maxwell et al. rendent compte que l'hydrochloride de guanidine est un agent dénaturant généralement efficace sur des protéines d'une masse inférieure à 18kDa (Maxwell et al., 2003), on peut affirmer qu'en règle générale il n'y a pas de tampon de renaturation universel. C'est pourquoi certains groupes ont développé des méthodes haut-débit de criblage de conditions de repliement de protéines (Vincentelli et al., 2004; Lin et al., 2005b).

### **III.2.2 Tests fonctionnels**

Avec les outils actuels, il est relativement facile de générer un grand nombre de molécules chimiques ou biologiques sous différentes formes tels que des peptides, des protéines purifiées, des oligonucléotides, des banques d'expression dans des bactéries, etc. Mais la

quantification de l'importance relative de chacune des molécules ainsi créées constitue souvent un goulot d'étranglement dans les processus de criblage à haut-débit.

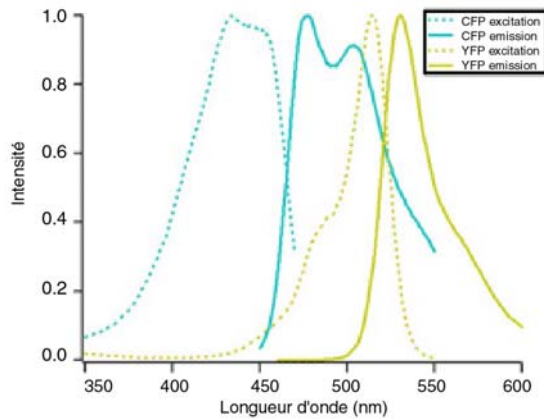
Il est donc primordial de disposer de tests dits fonctionnels permettant de cribler rapidement un grand nombre d'échantillons. Un bon test de criblage doit être simple, non-radioactif, robuste (c'est-à-dire avoir un fort rapport signal-bruit), homogène, contenir un minimum de réactifs, ajustable au format de microplaques et automatisable.

Il y a deux principales catégories de tests fonctionnels : des tests *in vitro* de liaison de ligand, de clivage enzymatique, d'inhibition de réaction, etc. et des tests *in vivo* utilisant des systèmes cellulaires.

Pour la première catégorie, il existe plusieurs techniques physico-chimiques comme la luminescence, l'absorbance ou la RMN pour quantifier une réaction, mais la plus répandue est la fluorescence (Liu et al., 2004). Les tests se basant sur la fluorescence sont très utilisés dans le criblage à haut-débit à cause de leur haute sensibilité et de leur relative simplicité d'adaptation à l'automatisation. Les chromophores utilisés peuvent être les substrats ou les produits d'une réaction enzymatique. Ils peuvent être fixés aux ligands ou aux protéines par des fusions au niveau génétique ou par des pontages chimiques. Pour certaines réactions, il est possible de mesurer directement les variations de fluorescence intrinsèque des protéines lors des réactions (Nieto et al., 1973; Frere et al., 1975). Mais l'inconvénient majeur de cette méthode réside dans le rapport signal-bruit qui est souvent trop faible à cause du niveau du signal lui-même et à l'influence du milieu dans lequel la mesure est faite (Burbaum et al., 1997).

La polarisation de fluorescence se base sur la perte de mobilité rotationnelle d'un groupement fluorescent suite à l'événement de liaison. Quand la molécule fluorescente est excitée par une lumière polarisée, l'émission est dépolarisée en fonction de la rotation de la molécule entre le moment de l'excitation et celui de l'émission (Williams, 2004).

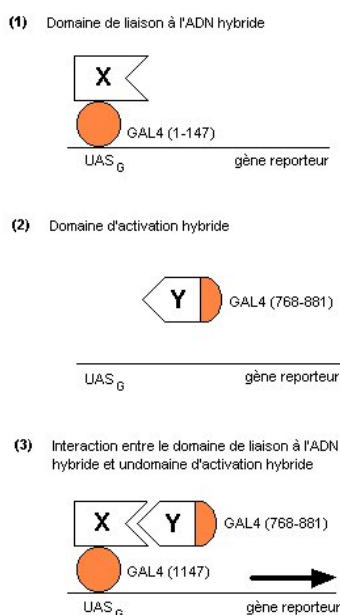
Le FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») est une technique qui permet de détecter la proximité de deux molécules fluorescentes (figure 17). Elle se base sur un transfert d'énergie entre les deux chromophores dû à un recouvrement du spectre d'émission du chromophore donneur avec le spectre d'absorption du chromophore accepteur. Pour qu'un signal soit observé, il faut que la distance entre les deux partenaires soit inférieure à 10 nm. Cette technique est par exemple utilisable pour mesurer les affinités de liaisons entre un anticorps et un antigène (Seidel et al., 2004). Notons que cette méthode est aussi applicable dans des cellules vivantes (Braun et al., 2005).



**Figure 17 : Spectre d'excitation et d'émission de deux chromophores fréquemment utilisés pour le FRET.** CFP : « cyan fluorescent protein », le donneur; YFP : « yellow fluorescent protein », l'accepteur.

De nombreuses autres techniques de fluorescence telles que l'anisotropie de fluorescence, la spectroscopie de corrélation de fluorescence, la spectroscopie de fluctuation de fluorescence ou encore le FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting ») ont été appliquées dans le cadre de méthodes haut-débit (Liu et al., 2004). Ces types de mesures sont beaucoup utilisées pour l'étude de certains récepteurs couplés aux protéines G qui sont des cibles très intéressantes pour le développement de nouveaux médicaments (Thomsen et al., 2005).

La deuxième catégorie de tests fonctionnels sont les systèmes cellulaires. Ces derniers se basent généralement sur l'activation ou la répression de l'expression d'un gène rapporteur suite à la liaison entre les deux molécules étudiées. Les gènes rapporteurs les plus courants sont la  $\beta$ -galactosidase, la luciférase et la GFP (« Green Fluorescent Protein ») (Thomsen et al., 2005). Une application courante de systèmes cellulaires est le double-hybride (figure 18). Cette méthode permet la détection d'interactions entre deux protéines par leur capacité à reconstituer ou abolir l'activité d'un facteur de transcription sur l'expression d'un gène rapporteur.



**Figure 18 : Stratégie de détection des interactions entre protéines par un système double hybride dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.**

La protéine X (l'appât) est fusionnée avec le domaine GAL4 liant l'ADN (1) et la protéine Y (la proie) au domaine GAL4 activant la transcription (2). L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle (3) et donc à l'activation de la transcription du gène rapporteur contenant un site de liaison à GAL4. (Chien et al., 1991)

### III.2.3 Méthodes analytiques

L'analyse des échantillons produits à partir de méthodes haut-débit est souvent un facteur limitant. De nombreux protocoles de développement de nouveaux catalyseurs, d'optimisation de voies de synthèses, de développement de nouvelles molécules actives, d'identification de molécules et de contrôles de qualité nécessitent des processus analytiques complexes difficilement automatisables (Thurow, 2006).

Dans le domaine de la protéomique, il est souvent nécessaire d'identifier les protéines présentes dans un échantillon. Ceci implique la séparation préalable de ces protéines avant leur caractérisation par spectrométrie de masse par exemple. Généralement, cette séparation se fait par gel de polyacrylamide uni- ou bi-dimensionnel, technique qui n'est pas la plus propice aux applications haut-débit. Pour s'affranchir de cette étape, il est possible d'utiliser des techniques de chromatographies multi-dimensionnelles ou des ultra-filtrations avant l'analyse par spectrométrie de masse (Tabb et al., 2002).

Les contrôles de qualité dans différents types de production représentent un grand défi analytique. Dans la production d'oligonucléotides synthétiques par exemple, les techniques classiques sont les gels de polyacrylamide et la chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Mais il existe notamment deux approches plus intéressantes pour l'automatisation qui sont la spectrométrie de masse et l'électrophorèse en capillaires (Kenseth et al., 2004).

### III.3 Biologie structurale : cristallogénèse

L'avènement de l'automatisation a révolutionné la cristallogénèse de protéines. Grâce à cette technologie, le nombre de conditions que l'on peut cribler est très large. Le facteur limitant est maintenant la quantité de protéine purifiée disponible. Mais celui-ci l'est de moins en moins, car des avancées dans la miniaturisation permettent aujourd'hui de diminuer considérablement les quantités nécessaires (Mueller et al., 2001). Traditionnellement les gouttes de cristallisation se faisaient dans des plaques à 24 puits avec des gouttes suspendues d'un volume minimum de 1  $\mu$ l (diffusion de vapeur). Avec les nouvelles méthodes dites de nano-cristallisation, les cristaux poussent dans des gouttes assises ayant des volumes allant jusqu'à 100 nl (Lesley et al., 2002b). Il a même été démontré qu'il est techniquement possible de faire des cristaux dans des gouttes de 1 nl (Kuyl et al., 2002).

Généralement les grands centres de cristallisation sont équipés de plateformes entièrement automatisées qui remplissent les réservoirs avec les différents tampons, font les gouttes de protéines, stockent les plaques avec une gestion par code-barres et évaluent les cristaux avec des caméras (Mueller et al., 2001).

Le futur de la cristallogénèse réside très probablement dans les techniques de croissance de cristaux au sein de systèmes microfluidiques (van der Woerd et al., 2003).

# PRESENTATION DU TRAVAIL



## **Présentation du travail**

Trois PBPs sont majoritairement impliquées dans les processus moléculaires de résistance de *S. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines : PBP2x, PBP2b et PBP1a. Dans les isolats cliniques résistants, les gènes codants pour ces PBPs sont mosaïques. Suite à de multiples événements de recombinaisons avec des fragments d'ADN provenant principalement d'autres souches de pneumocoques tels que *S. mitis* ou *S. oralis*, les séquences divergent d'environ 20% par rapport à celles de la souche de référence R6 (Dowson et al., 1989). Les modifications sont des substitutions d'acides aminés qui sont à l'origine de la diminution d'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines. Les PBPs modifiées conservent leurs rôles physiologiques dans la synthèse du peptidoglycane.

PBP2x et PBP2b sont essentielles pour la survie de la bactérie (Kell et al., 1993) et sont nécessaires pour l'acquisition de la résistance aux pénicillines et aux céphalosporines (Grebe et al., 1996; Krauss et al., 1996). PBP1a est essentielle en absence de PBP2a (Hoskins et al., 1999; Paik et al., 1999) ; elle est indispensable pour atteindre de hauts niveaux de résistances aux céphalosporines ou aux pénicillines, respectivement en complément de PBP2x ou de PBP2x et PBP2b (Hakenbeck et al., 1994; Coffey et al., 1995; Smith et al., 1998; Smith et al., 2003).

Il y a en moyenne 40 substitutions dans le domaine TP de PBP2x et de PBP1a d'une souche clinique résistante (CMI pour la pénicilline G supérieure à 1 mg.L<sup>-1</sup>). Il a été précédemment démontré que certaines substitutions de PBP2x étaient impliquées dans sa baisse d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines (Mouz et al., 1998; Mouz et al., 1999; Chesnel et al., 2003; Pernot et al., 2004). Mais ces mutations n'expliquent qu'une partie de la diminution de l'efficacité d'acylation de PBP2x par les antibiotiques. Dans le cas de PBP1a, seules des études *in vivo* ont montré que trois mutations étaient impliquées dans la diminution de sensibilité des bactéries aux antibiotiques (Smith et al., 1998; Smith et al., 2003).

Les alignements de séquences de PBPs mosaïques et l'analyse de structures tridimensionnelles ont été complètement exploités pour proposer des hypothèses sur l'implication potentielle de certaines substitutions dans les processus moléculaires à la base de

la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Il est possible qu'un nombre restreint de mutations soient responsables de la perte d'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines ayant pour conséquence une augmentation du niveau de résistance (Chesnel, 2003).

Je soutiens la thèse que, grâce à la mise en place d'une approche exhaustive de caractérisation de chacune des mutations observées dans une souche clinique fortement résistante, il est possible d'identifier toutes les mutations impliquées dans le phénomène de résistance de la souche en question.

Ce manuscrit décrit le développement technique qui a permis de mettre en place une telle approche et son utilisation pour la caractérisation exhaustive de toutes les mutations de PBP2x présentes dans le domaine TP de la souche clinique résistante 5204, menant à l'identification de toutes les substitutions clés ainsi qu'à l'élucidation d'un nouveau mécanisme moléculaire de baisse d'affinité de PBP2x pour les  $\beta$ -lactamines. De plus, une étude fonctionnelle et phénotypique de la résistance impliquant PBP1a est décrite.

Le développement technique pour la création de protocoles adaptés à cette étude constitue une grande partie de ce travail. Nous avons mis en place un processus automatisé permettant de faire de la mutagenèse dirigée, de l'expression, de la purification et de la caractérisation fonctionnelle de manière rapide et reproductible sur un grand nombre d'échantillons.

Nous avons ainsi pu créer une collection de mutants ponctuels de 5204-PBP2x. Chaque membre de cette collection porte une substitution correspondant à une réversion d'un acide aminé vers celui présent dans R6-PBP2x. Cette stratégie a été favorisée pour déceler d'éventuelles mutations impliquées dans des effets coopératifs. Des mesures d'efficacité d'acylation pour le céfotaxime sur chacune de ces protéines mutées nous ont permis d'identifier des positions impliquées dans la baisse d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines. Pour confirmer cette découverte, ces mêmes mesures ont été faites sur des mutants directs de ces positions dans R6-PBP2x. Des mutants multiples dans R6-PBP2x et 5204-PBP2x ont été créés pour quantifier l'implication globale de toutes les mutations identifiées sur l'efficacité d'acylation. Enfin, pour valider l'importance des substitutions nouvellement identifiées sur la résistance de la bactérie, les gènes 5204-*pbp2x* et R6-*pbp2x* mutés ont été co-transformés sous forme plasmidique avec le gène 5204-*pbp1a* dans *S. pneumoniae* R6 et le niveau de résistance des transformants a été déterminé.

Suite à cette étude exhaustive, un nouveau mécanisme de résistance impliquant deux des mutations nouvellement identifiées a été élucidé. L'évaluation de ce modèle a été faite par une analyse des structures de PBP2x disponibles (Pares et al., 1996; Gordon et al., 1999; Dessen

et al., 2001) combinées à une estimation de la flexibilité d'une région de la molécule impliquée dans la résistance.

PBP1a étant essentielle pour atteindre des forts niveaux de résistance, une analyse détaillée de mutants directs et indirects simples et multiples de PBP1a au niveau des positions précédemment identifiées (Smith et al., 1998; Smith et al., 2003), ainsi que de plusieurs mutants cliniques sauvages a été faite. L'étude du comportement biochimique de ces protéines ainsi que de leur influence sur le phénotype des bactéries nous a paru importante pour disposer d'une compréhension plus globale des mécanismes de résistance.

Ce manuscrit présente les résultats de ces travaux ainsi que les principales conclusions qui en découlent quant à la compréhension des mécanismes de résistance de *S. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines.

RÔLE DES SUBSTITUTIONS DE PBP2<sub>x</sub>  
DANS LA RESISTANCE DE *S.*  
*PNEUMONIAE* AUX  $\beta$ -LACTAMINES

## **Rôle des substitutions de PBP2x dans la résistance de *S. pneumoniae* aux $\beta$ -lactamines**

### **Matériels et Méthodes : publication n° I**

#### **Avertissement aux lecteurs**

La publication n° I est une contribution technique exposant les méthodes automatisées mises en place et utilisées pour la caractérisation fonctionnelle de PBP2x et de ses variants. Toutes les méthodes utilisées pour l'étude de PBP2x sont exposées dans cette publication et dans la publication n° II.

#### **Processus haut-débit automatisé pour la mutagenèse dirigée, l'expression, la purification et la caractérisation d'enzymes.**

Raphaël Carapito, Benoit Gallet, André Zapun and Thierry Vernet. Automated high-throughput process for site-directed mutagenesis, production, purification and kinetic characterization of enzymes. *Anal. Biochem.* (sous presse - 2006)

Dans cette publication, un protocole expérimental constitué par une succession de six méthodes automatisées nécessitant plusieurs automates est décrit. La procédure permet de créer des centaines de mutants ponctuels d'une même protéine en quelques jours.

La méthode est illustrée par la création d'une collection de 41 mutants de PBP2x, ainsi que par celle d'un mutant multiple ayant intégré 7 mutations avec une efficacité proche de 90 %.



# Automated high-throughput process for site-directed mutagenesis, production, purification, and kinetic characterization of enzymes

Raphaël Carapito, Benoit Gallet, André Zapun, Thierry Vernet \*

*Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS UMR 5075/IUJF), Grenoble Cedex 1 F-38027, France*

Received 15 February 2006

## Abstract

Site-directed mutagenesis followed by functional characterization is a widely used approach to obtain information on the structure–function relationship of proteins. Due to time and cost considerations, the number of amino acids studied is frequently reduced. To address the need for convenient parallel production of numerous point mutants of a protein, we developed an automated method to perform classical site-directed mutagenesis, protein purification, and characterization in a high-throughput manner. The process consists of a succession of six fully automated protocols that can be adapted to any automated liquid handling systems. Our procedure allows construction, validation, and characterization of hundreds of site-directed mutants of a given protein in just 4 days. The method is especially adapted to projects aiming at the study of unique or multiple mutants without the need to construct and screen large libraries of random mutants. The usefulness of the technique is illustrated by the construction and characterization of tens of single mutants of the penicillin-binding protein 2x (PBP2x) from *Streptococcus pneumoniae*. Moreover, seven mutations of PBP2x were obtained simultaneously in a single experiment with efficiency close to 90%.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Automation; High throughput; Mutagenesis; Protein purification; Enzyme kinetics

Large-scale site-directed mutagenesis is a powerful tool to get information on the structure–function relationship of proteins. To understand reaction mechanisms or to map interaction sites, analyses of the role of numerous amino acid positions of a given protein are often necessary. Moreover, such investigations are appropriate for the isolation of improved protein variants for biotechnology applications. Such approaches are time-consuming when performed by classical site-directed mutagenesis, such as the Kunkel [1] or Quick Change (Stratagene) method, or expensive when performed by in vitro gene synthesis.

To overcome these limitations, we have developed a fully automated process to create, validate, and test a high number of mutants of a given protein based on the auto-

mation of existing protocols. This method implies the use of automated liquid handling systems and allows significant reduction of time and material investments (excluding depreciation of robots). We also developed an associated protein production and purification protocol as well as an automated assay based on the monitoring of intrinsic protein fluorescence for our reaction of interest: acylation of penicillin-binding proteins (PBPs)<sup>1</sup> by  $\beta$ -lactam antibiotics. These protocols are based on the adaptation of existing methods in the fields of high-throughput protein expression and purification [2–7] and intrinsic protein fluorescence measurements [8–10]. For illustration, we present here the generation and characterization of a set of 42 variants of PBP2x. The scientific

\* Corresponding author. Fax: +33 4 38 78 54 94.  
E-mail address: [vernet@ibs.fr](mailto:vernet@ibs.fr) (T. Vernet).

<sup>1</sup> Abbreviations used: PBP, penicillin-binding protein; LB, Luria–Bertani.

significance of the results has been presented elsewhere [11].

The chosen mutagenesis method is that of Kunkel, which is well adapted for the study of numerous mutations of a limited set of proteins. Despite the need to generate single-strand DNA, this method has several advantages compared with other existing methods. Contrary to PCR-based mutagenesis [12–14], it is not necessary to clone the mutated gene. Unlike the Quick Change method (Stratagene), only one mutagenic primer is used per mutation, resulting in significant cost savings. Moreover, the method is amenable to simultaneous multiple site-directed mutagenesis in a single reaction. Finally, contrary to massive mutagenesis [15,16], because each mutant is well identified and isolated throughout the whole process, there is no requirement for a selection or screening procedure. We present here an automated and efficient time-saving method to generate and test hundreds of chosen single or multiple point mutants.

## Materials and methods

### Equipment

Most of the automated steps (protocols 1, 2, 3, and 5) were performed on the liquid handling robot Microlab STAR (Hamilton). Isolation of plasmid DNA from *Escherichia coli* (protocol 4) was carried out by the BioRobot 8000 (Qiagen). Kinetic parameters were measured with the FLUOstar Optima microplate reader (BMG Labtech) (protocol 6). The methods for running the robots are available from [www.ibs.fr/content/ibs\\_eng/presentation/lab/lim/doc.htm](http://www.ibs.fr/content/ibs_eng/presentation/lab/lim/doc.htm).

### Mutagenic primers

For diagnostic purposes, mutagenic oligonucleotides were designed with a silent mutation creating a diagnostic restriction site together with the mutation of interest. Inserted restriction sites are presented in Table 1. For example, the mutagenic primer used to create the double mutant A338T/F339M was the 43-base primer rev-A338T + F339M (5'-GCTAACATCATGACCTTCATG GTCGATCCTGGTTCATAGTTAC-3'), which introduces two substitutions at positions 338 and 339 (coding DNA sequence 5'-GCCTTT-3' modified in 5'-ACCATG-3' [reverse complement italicised], protein sequence Ala338Phe339 modified in Thr338Met339) and creates a *Taq*I restriction site (underlined).

### Site-directed mutagenesis (protocol 1)

Single-strand DNA of the plasmid to be mutated was prepared according to Kunkel and coworkers [1]. Briefly, the plasmid was transformed into *E. coli* strain CJ236 (*dut-1, ung-1, thi-1, relA-1*, pCJ105 [Cm<sup>r</sup>]), and the transformed strain was infected by the helper phage M13KO7

to produce single-strand dUTP-containing DNA. A 5-pmol ml<sup>-1</sup> dilution of the purified single-strand DNA in annealing buffer (200 mM Tris [pH 7.4], 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl) was prepared and aliquoted to be used for the automated mutagenesis.

Unless otherwise indicated, 96-well PCR plates (Greiner Bio-One) were used throughout. One or up to six phosphorylated mutagenic primers (5 µl, 0.5 pmol each primer) were added to 5 µl of single-strand template DNA and submitted to an annealing thermo program (5 min at 90 °C, 20 min at 56 °C, 20 min at 37 °C, and 5 min at 4 °C with a cooling rate of 0.03 °C/s) on the thermocycler (TRobot, Biometra) coupled to the Microlab STAR robot. The second strand was synthesized by adding 10 µl of a mix containing 150 pmol dNTPs (Fermentas), 1 µg of T4 protein gene 32 (New England Biolabs), 2.5 U of T4 DNA polymerase (Promega), and 4 U of T4 DNA ligase (Promega) in synthesis buffer (250 mM Tris [pH 8.0], 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 350 mM NaCl, 15 mM dithiothreitol, 7.5 mM ATP). After an incubation for 2 h at 37 °C and for 20 min at 65 °C on the thermocycler, 10 µl of the reaction product was transformed into *E. coli* strain MC1061 (*hsdR2 hsdM + hsdS + araD139 D[ara-leu]<sub>7697</sub>D[lac]<sub>X74</sub> galE15 galK16 rpsL [Str<sup>r</sup>] mcrA mcrB1*).

### Transformation (protocol 2)

Of the mutagenesis reaction products, 10 µl was transformed into *E. coli* strain MC1061 using the CaCl<sub>2</sub> procedure [17]. For protein expression, 5 µl of plasmids from positive clones was transformed into *E. coli* strain BL21 codon+ RIL (Stratagene).

DNA to be transformed was transferred into 50 µl of prealiquoted competent *E. coli* in a sterile plate placed on the cooling block of the deck. After 20 min at 4 °C, the plate was moved to the prewarmed thermocycler for a 45-s heat shock at 42 °C. Afterward, the plate was immediately moved back to the cooling block, where 100 µl of fresh Luria–Bertani (LB) medium was added. Then 20 µl of the transformation reaction was spread directly onto prewarmed 24-well LB agar plates (Greiner Bio-One) containing ampicillin at 100 µg.ml<sup>-1</sup>. After 1 min shaking at 1000 rpm, the agar plates were incubated overnight at 37 °C.

### Diagnostic of mutants (protocol 3)

Mutations were confirmed by restriction analysis. For each mutagenesis reaction, 4 or 8 colonies were manually picked up to inoculate 1 ml of LB medium (100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin) supplemented with 5 g L<sup>-1</sup> glycerol in a round-bottom 96-deep-well plate (Greiner Bio-One). After an overnight incubation at 37 °C under 350 rpm agitation, 1 µl of the cultures was used to amplify a 1253-bp fragment of the target gene via PCR.

First a PCR master mix containing 500 mM KCl, 100 mM Tris–HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100, 1.5 mM

Table 1  
Mutational screening of PBP2x

Mutation	Diagnostic restriction site	Mutagenesis efficiency (%)	Acylation efficiency $k_2/K$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
L281Q	<i>MseI</i>	75	250 ± 15
N311D	<i>TaqI</i>	50	350 ± 40
S337A	<i>AgeI</i>	50	0
A338T	<i>TaqI</i>	70	825 ± 50
A338T/F339M	<i>TaqI</i>	75	4300 ± 400
S346A	<i>TaqI</i>	63	260 ± 15
S347A	<i>HhaI</i>	100	260 ± 20
S355G	<i>MspI</i>	63	360 ± 50
Y358V	<i>MseI</i>	60	300 ± 10
F364L	<i>MseI</i>	38	280 ± 30
T371I	<i>Sau3AI</i>	75	1600 ± 100
T382G	<i>MspI</i>	75	300 ± 20
G384R	<i>SmaI</i>	88	1100 ± 80
L389T	<i>HpyCH4IV</i>	88	200 ± 30
T400M	<i>NlaIII</i>	75	650 ± 120
S401T	<i>HpyCH4IV</i>	50	275 ± 30
K417N	<i>TaqI</i>	50	290 ± 30
S444N	<i>MseI</i>	57	200 ± 20
L462I	<i>Sau3AI</i>	86	475 ± 45
T486P	<i>Sau3AI</i>	71	255 ± 40
N488D	<i>Sau3AI</i>	57	310 ± 15
S490T	<i>MspI</i>	50	3701 ± 35
V491A	<i>TaqI</i>	57	350 ± 20
E506D	<i>BfaI</i>	50	390 ± 65
T510L	<i>MseI</i>	63	210 ± 40
N513T	<i>RsaI</i>	50	330 ± 25
H514N	<i>BfaI</i>	25	330 ± 45
I516V	<i>RsaI</i>	38	335 ± 45
L523V	<i>MspI</i>	25	460 ± 45
Y531S	<i>TaqI</i>	88	315 ± 20
I536T	<i>Sau3AI</i>	71	410 ± 50
I537V	<i>Sau3AI</i>	29	315 ± 15
V546L	<i>AluI</i>	63	210 ± 10
S565L	<i>MseI</i>	75	225 ± 35
N567D	<i>TaqI</i>	50	85 ± 2
V572A	<i>MseI</i>	50	285 ± 35
N574S	<i>TaqI</i>	75	315 ± 20
N576S	<i>AluI</i>	50	440 ± 30
F595Y	<i>MspI</i>	25	335 ± 45
T605N	<i>Sau3AI</i>	29	995 ± 210
E616D	<i>MseI</i>	50	290 ± 25
A338T/F339M/T371I/G384R/T400M/N567D/T605N	<i>TaqI/Sau3AI/SmaI/NlaIII</i>	88	60,000 ± 6500 <sup>a</sup>

Note. The acylation efficiency of PBP2x<sup>\*</sup>-5204-wt (control) is 390 ± 20  $M^{-1} s^{-1}$ .

<sup>a</sup> Acylation efficiency was determined at 28 °C.

MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol primer 2X1 (5'-GGGACAGACGGCATT ATTACCTAT-3'), 20 pmol primer 2XTP3 (5'-GGTGAA ATATCCTTGATGCTAGGC-3'), 5 pmol dNTPs, and 2.5 U Taq DNA polymerase [18] was distributed in a 96-well PCR plate at 4 °C. Then 1 µl of the above-mentioned cultures was added, and the following cycling conditions were used: 1 cycle at 94 °C for 5 min; 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1.5 min; and 1 cycle at 72 °C for 10 min.

Then 5 µl of the PCR products was added directly to 10 µl of a mix containing 2.5 U of the appropriate restriction enzyme (Promega) in the recommended buffer. After 2 h incubation at the appropriate temperature on the thermocycler, 2 µl of 6× loading dye was added. Then 10 µl was loaded onto a 2% agarose gel on the deck of the robot.

After 25 min migration at 135 V, the agarose gel was soaked in a 0.5-µg ml<sup>-1</sup> ethidium bromide bath for 10 min and the bands were visualized under UV light.

#### Purification of plasmid DNA (protocol 4)

The purification was performed as described in the application note from Macherey–Nagel Inc. [19].

#### Protein expression and purification (protocol 5)

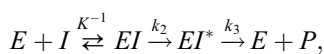
Recombinant proteins were expressed as fusion with glutathione-S-transferase in *E. coli* strain BL21 codon+RIL (Stratagene). Cells were grown in 4 ml autoinduction medium [20] containing 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin in 24-well



plates (Greiner Bio-One) for 24 h at 37 °C under 350 rpm agitation. After 15 min centrifugation at 4000g, cells were lysed by shaking resuspension in 500  $\mu$ l of 0.5 $\times$  Bug Buster (Novagen) containing 30 KU of rLysozyme (Novagen) and 10 U of Benzonase (Novagen) for 20 min at 600 rpm at room temperature. After 20 min centrifugation at 4000g, the supernatant was pipeted onto 100  $\mu$ l glutathione Sepharose (Amersham) previously aliquoted in a 96-well filter plate (Pall). The resin was washed twice with 750  $\mu$ l of 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) and 200 mM KCl. Proteins were eluted in two steps with 800  $\mu$ l of 5 mM reduced glutathione (Sigma) in the same buffer.

#### Kinetic activity measurement (protocol 6)

The interaction of PBP2x with  $\beta$ -lactams can be described by the following equation [21]:



where  $E$  is the enzyme,  $I$  is the  $\beta$ -lactam, and  $P$  is the inactivated product. First a noncovalent complex  $EI$  is formed ( $K$  = dissociation constant), followed by the acylation of the active site Ser337 by the  $\beta$ -lactam ( $k_2$  = rate constant). Then the enzyme is deacylated with the rate constant  $k_3$ . Deacylation is extremely slow and negligible. The efficiency of acylation,  $k_2/K$ , is determined by monitoring the decrease of the intrinsic fluorescence of the protein following the addition of various concentrations of the antibiotic [22,23].

The protein eluates (150  $\mu$ l) were transferred in a black 96-well FLUOTRAC 200 plate (Greiner Bio-One), and the fluorescence was recorded using a microplate reader (BMG Labtech) prewarmed at 37 °C. The excitation wavelength was 280 nm, and the emission was recorded at 320 nm. Shortly after starting emission recording, 50  $\mu$ l of a cefotaxime solution was injected into the well (1.2 s) and the plate was shaken for 1 s. After this 2.2 s of dead time, the exponential fluorescence decrease was monitored. These measurements were repeated four times with cefotaxime concentrations varying between 80 and 320  $\mu$ M. The curves were automatically generated by the FLUOstar software (BMG Labtech) and analyzed using the Biokine 32 software (version 1.27, BioLogic). At a given concentration of antibiotic, the apparent pseudo-first-order rate constants  $k_{app}$  were determined by nonlinear least-squares fitting to the equation  $Fluo_t = Fluo_0 \exp(-k_{app} \cdot t)$ . The efficiencies of acylation  $k_2/K$  were determined by linear fitting to the equation  $k_{app} = (k_2/K)[\text{cefotaxime}]$ .

#### Results and discussion

PBP2x is involved in cell wall synthesis and division of *Streptococcus pneumoniae* [24,25] and is the target of  $\beta$ -lactam antibiotics [26]. Resistance to  $\beta$ -lactams in *S. pneumoniae* is due in great part to mutations in PBP2x [27,28]. PBP2x from clinical resistant strains typically has tens of amino acid substitutions [29] when compared with PBP2x from sensitive strains. Only a few of these mutations

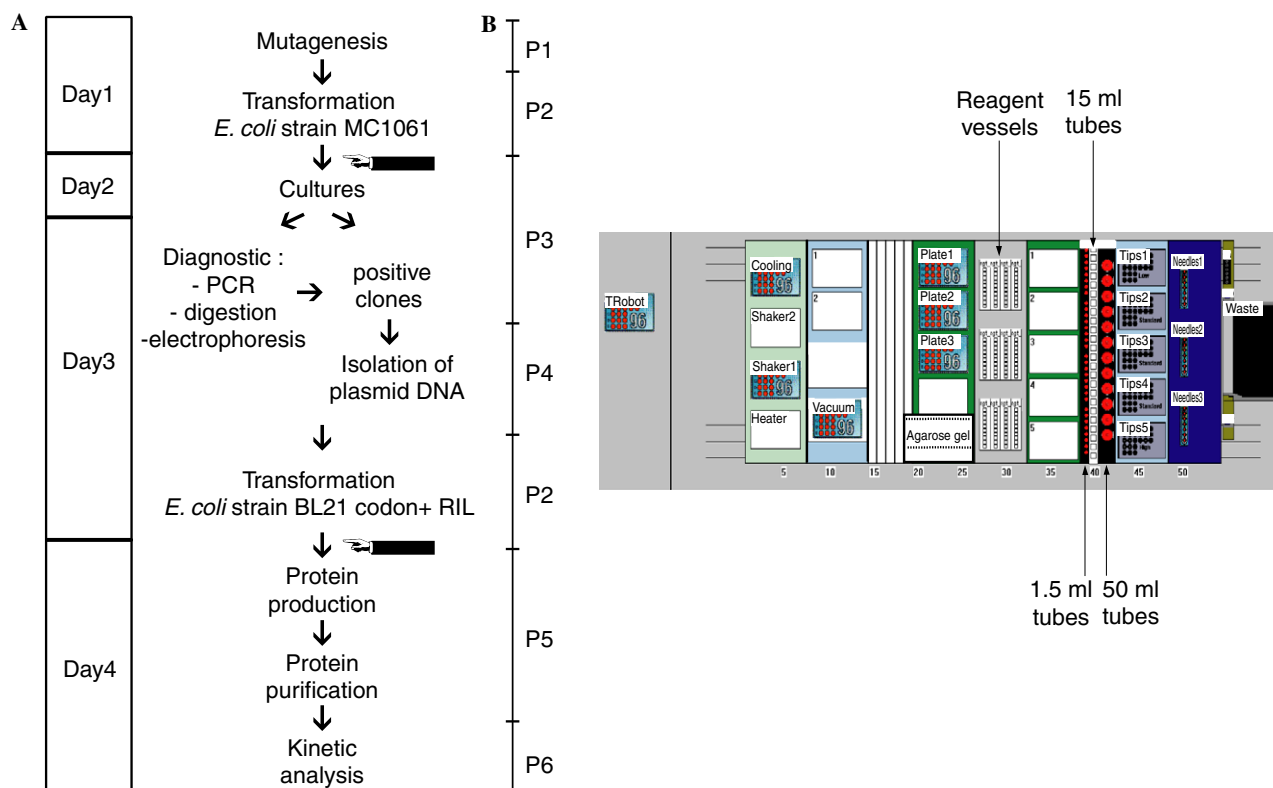


Fig. 1. Operating procedure. (A) Major steps of the process with time schedule in days. P1 to P6 refer to the automated protocols 1 to 6. The major manual interventions (colony picking) are labeled with the finger-pointing signs. (B) Deck layout of the pipetting robot Microlab STAR.

are likely to play a role in lowering the binding capacity of the antibiotic. To gain insight into the resistance mechanism, we investigated the effect of every individual substitution found in PBP2x from the highly resistant strain 5204. Following a first round of mutant analysis, proteins that included two or seven mutations were constructed and characterized. For these purposes, we developed the parallel and automated approach presented here.

An outline of the operating procedure is shown in Fig. 1A. The process was divided into six protocols controlled by six instrument-specific methods. After the mutagenesis reaction, the transformation of the hybrid plasmid into *E. coli* strain MC1061 allowed the suppression of the parental nonmutated strand and its replacement by the complementary sequence of the mutated strand. The transformants obtained were used to inoculate cultures to be tested by PCR and restriction digestion. Cultures corresponding to two restriction positive clones were used for the isolation of plasmid DNA. After transformation of the latter into *E. coli* strain BL21 codon+ RIL, production cultures were started from a single clone. The proteins were purified by affinity chromatography using glutathione Sepharose beads, and the reaction of the protein with the antibiotic was measured directly on the eluates.

The whole process can be performed in 4 days. Compared with nonautomated methods, 10 to 100 times more samples can be processed during this time.

To keep the process efficient, we compromised in developing a system that is just short of full automation; all but two major steps were automated. Production of a large quantity of single-strand DNA template for the mutagenesis and inoculation of cultures following transformation were performed by hand. The latter could have been automated by using a colony-picker robot. Note that a few minor steps, including the transfer of plates to centrifuges or incubators and the transfer of agarose gels from the robot to the electrophoresis apparatus on a bench, remained manual.

Fig. 1B shows the deck layout of the Microlab Star with all of the devices and consumables necessary for protocols 1, 2, 3, and 5. The agarose gel was not initially part of the robot's configuration. The casting unit containing the gel was adapted to the deck, and the robot was reconfigured accordingly. After the loading, the gel was moved to the electrophoresis apparatus outside of the deck.

The 41 primers were designed with the web-based computer program PrimerX (<http://bioinformatics.org/primerx/>). The silent diagnostic restriction sites (Table 1)

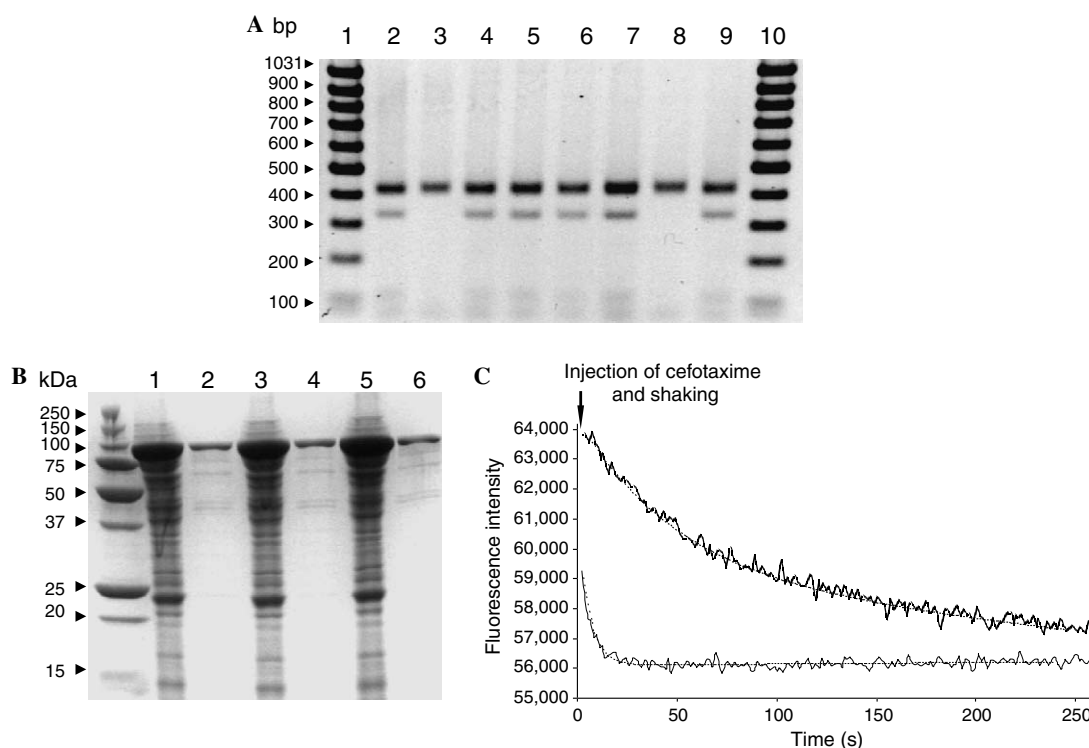


Fig. 2. PBP2x\*-5204-A338T/F339M: Site-directed mutagenesis, purification, and kinetic characterization. (A) Picture of a 2% agarose gel in TAE buffer stained with ethidium bromide representing the restriction analysis of *pbp2x* PCR fragments. Lanes 1 and 10 correspond to the MassRuler DNA Ladder (Promega). Lanes 2 to 9 are digestions of PCR products with *TaqI*. Clones 3 and 8 are negative (fragments of 429, 420, and 404 bp). Clones 2, 4 to 7, and 9 are positive (fragments of 420, 404, 325, and 104 bp). (B) Purification of glutathione-S-transferase-tagged PBP2x\*-5204-A338T/F339M. Proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE and Coomassie staining. Lanes 1, 3, and 5: cell lysates loaded on the glutathione Sepharose columns (equivalent to 8  $\mu$ l culture). Lanes 2, 4, and 6: eluates (equivalent to 12.5  $\mu$ l of culture). (C) Kinetics of the fluorescence decrease of PBP2x\*-5204-wt (bold line) and PBP2x\*-5204-A338T/F339M (medium line) on reaction with cefotaxime. The iterated fits to the equation  $Fluo_t = Fluo_0 \exp(-k_{app}t)$  are represented with dashed lines.

were designed manually, although this could have been done with dedicated software [30]. The vector used was pGEX-f1-5204-*pbp2x*<sup>\*</sup>, containing the f1 replication origin of phage f1, and 5204-*pbp2x*<sup>\*</sup>, the gene fragment encoding the extracellular domain (residues 49–750 indicated by an asterisk) of PBP2x from the resistant clinical strain 5204. The results of the mutagenesis and enzymatic characterization are presented in Table 1. The protein mutated at the active site serine 337 (S337A) was a negative control for the kinetic measurements. The mean mutagenesis efficiency was  $59 \pm 19\%$  for the single mutants. The efficiencies for the contiguous double mutant using a single oligonucleotide (75%) and for the septuple mutant using six oligonucleotides (88%) were in the range of efficiencies obtained for the single mutations. The latter result illustrates the power of the method to produce simultaneously a high number of mutations in a given protein using a single reaction. For illustration purposes, the restriction analysis for the double mutant PBP2x<sup>\*</sup>-5204-A338T/F339M is presented in Fig. 2A. In this example, six of eight tested colonies had the mutation inserted (mutation efficiency of 75%).

With the 12 different enzymes that are used to diagnose mutations at 40 positions, restriction digestions with different enzymes in separate reactions would allow nonambiguous diagnostic in most cases (i.e., our mutant at seven positions). However, if many multiple mutants are planned from the onset, it is prudent to design the primers such that different restriction sites are used for mutations that are close in the sequence. This precaution should allow good discrimination of restriction patterns.

One positive clone of each mutant was chosen for the production and purification of the mutated proteins. For the sake of brevity, detailed results are presented only for the PBP2x<sup>\*</sup>-5204-A338T/F339M double mutant that was purified three times independently to assess the reproducibility of the protocol (Fig. 2B). The concentration of the 100-kDa protein eluates varied between 3.1 and 3.9  $\mu\text{M}$ .

Kinetic measurements were performed on the eluates without further processing of the samples. Because the measured parameter is independent of the protein concentration, the latter was not adjusted. The kinetics for PBP2x<sup>\*</sup>-5204-wt (control) and PBP2x<sup>\*</sup>-5204-A338T/F339M at a cefotaxime concentration of 80  $\mu\text{M}$  are shown in Fig. 2C. Compared with PBP2x<sup>\*</sup>-5204-wt, the mutated protein showed a significantly faster kinetic. The same measures were performed at four different cefotaxime concentrations in three different experiments. The acylation efficiencies were  $390 \pm 20$  and  $4300 \pm 400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for PBP2x<sup>\*</sup>-5204-wt and PBP2x<sup>\*</sup>-5204-A338T/F339M, respectively.

Seven substitutions induced a significant modification of the acylation efficiency of the protein (Table 1). Therefore, these 7 mutations (out of 40) are involved in the mechanism of *S. pneumoniae* resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. The very fast acylation efficiency of the multiple mutant ( $60,000 \pm 6500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) results from the combined effect of the seven substitutions.

Such measures can be performed on all proteins that undergo fluorescence changes upon binding of a substrate. With a dead time of 2.2 s, the technique is applicable to moderately fast reactions, avoiding the use of complex and time-consuming stopped-flow devices. All assays insensitive to small variations of protein concentration can be performed directly in multiwell plates after the purification step. Alternatively, protein concentration can be normalized following protein concentration determination, a procedure that is also amenable to automation.

In conclusion, a high-throughput process covering site-directed mutagenesis, protein production, purification, and characterization has been developed. This method is particularly useful for the study of numerous single or multiple targeted amino acid modifications of individual proteins. Identification of catalytic amino acid (e.g., by alanine scanning), elucidation of enzymatic reaction mechanism, and epitope or interaction site mapping are a few examples of the possible applications of this technique.

#### Acknowledgments

We thank Marjolaine Noirclerc-Savoie for stimulating discussions. This work was supported by the European Commission Sixth Framework Program grants LSMH-CT-COBRA 2003-503335 and LSHM-CT-EUR-INTA-FAR 2004-512138. This work was conducted using the RoBioMol platform of the Institut de Biologie Structurale financed by Rhône-Alpes Genopole (hosted by the Fondation Rhône-Alpes Futur).

#### References

- [1] T. Kunkel, K. Bebenek, J. McClary, Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA, *Methods Enzymol.* 204 (1991) 125–139.
- [2] P. Braun, Y. Hu, B. Shen, A. Halleck, M. Koundinya, E. Harlow, J. LaBaer, Proteome-scale purification of human proteins from bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 2654–2659.
- [3] P. Braun, J. LaBaer, High throughput protein production for functional proteomics, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 383–388.
- [4] L. Dieckman, M. Gu, L. Stols, M.I. Donnelly, F.R. Collart, High throughput methods for gene cloning and expression, *Protein Expr. Purif.* 25 (2002) 1–7.
- [5] S.A. Lesley, High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world, *Protein Expr. Purif.* 22 (2001) 159–164.
- [6] C. Scheich, V. Sievert, K. Bussow, An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography, *BMC Biotechnol.* 3 (2003) 12.
- [7] S. Yokoyama, Protein expression systems for structural genomics and proteomics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 39–43.
- [8] C. Buehler, J. Dressen, K. Mueller, P.T.C. So, C.Y. Dong, A. Schilb, U. Hassiepen, K. Stoeckli, M. Auer, Multi-photon excitation of intrinsic protein fluorescence and its application to pharmaceutical drug screening, *Assay Drug Dev. Technol.* 3 (2005) 155–167.
- [9] H.H. Parikh, K. McElwain, V. Balasubramanian, W. Leung, D. Wong, M.E. Morris, M. Ramanathan, A rapid spectrofluorimetric technique for determining drug-serum protein binding suitable for high-throughput screening, *Pharm. Res.* 17 (2000) 632–637.

- [10] P.G. Righetti, B. Verzola, Folding/unfolding/refolding of proteins: present methodologies in comparison with capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 22 (2001) 2359–2374.
- [11] R. Carapito, L. Chesnel, T. Vernet, A. Zapun, Pneumococcal  $\beta$ -lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 1771–1777.
- [12] A. Aiyar, Y. Xiang, J. Leis, Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR, *Methods Mol. Biol.* 57 (1996) 177–191.
- [13] T.M. Ishii, P. Zerr, X.M. Xia, C.T. Bond, J. Maylie, J.P. Adelman, Site-directed mutagenesis, *Methods Enzymol.* 293 (1998) 53–71.
- [14] M.M. Ling, B.H. Robinson, Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal. Biochem.* 254 (1997) 157–178.
- [15] M. Delcourt, Method for massive directed mutagenesis, U.S. patent application 20040048268 (2004).
- [16] D. Saboulard, V. Dugas, M. Jaber, J. Broutin, E. Souteyrand, J. Sylvestre, M. Delcourt, High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips, *BioTechniques* 39 (2005) 363–368.
- [17] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [18] E. Grimm, P. Arbuthnot, Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 4518–4519.
- [19] Macherey–Nagel Inc., An automated method for plasmid purification using Nucleospin Robot-96 Plasmid on the Biorobot 8000 (Qiagen), Application note (2002).
- [20] F.W. Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.* 41 (2005) 207–234.
- [21] J.M. Frere, J.M. Ghuysen, M. Iwatsubo, Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase–transpeptidase from *Streptomyces* R61 and  $\beta$ -lactam antibiotics: a choice of models, *Eur. J. Biochem.* 57 (1975) 343–351.
- [22] M. Nieto, H.R. Perkins, J.M. Frère, J.M. Ghuysen, Fluorescence and circular dichroism studies on the *Streptomyces* R61 DD-carboxypeptidase–transpeptidase: Penicillin binding by the enzyme, *Biochem. J.* 135 (1973) 493–505.
- [23] M. Jamin, C. Damblon, S. Millier, R. Hakenbeck, J.M. Frere, Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with beta-lactams, *Biochem. J.* 292 (1993) 735–741.
- [24] D.J. Tipper, J.L. Strominger, Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 1133–1141.
- [25] E.M. Wise Jr., J.T. Park, Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 75–81.
- [26] D.J. Waxman, J.L. Strominger, Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 825–869.
- [27] T. Grebe, R. Hakenbeck, Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of  $\beta$ -lactam antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 829–834.
- [28] J. Krauss, M. van der Linden, T. Grebe, R. Hakenbeck, Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*, *Microb. Drug Resist.* 2 (1996) 183–186.
- [29] Y. Asahi, Y. Takeuchi, K. Ubukata, Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2x in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1252–1255.
- [30] A. Turchin, J.F. Lawler Jr., The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis, *BioTechniques* 26 (1999) 672–676.

---

## Résultats et Discussion : publication n° II

### **La résistance de *Streptococcus pneumoniae* aux $\beta$ -lactamines est due à une flexibilité structurale de PBP2x.**

Carapito R, Chesnel L, Vernet T, Zapun A. Pneumococcal beta-lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. J Biol Chem. 2006 Jan 20;281(3):1771-7

#### **Objectif**

Les travaux présentés dans cette publication (Carapito et al., 2006) visaient à identifier et caractériser toutes les mutations responsables de la résistance conférée par PBP2x dans la souche résistante de *S. pneumoniae* 5204.

#### **Quatre nouvelles mutations de PBP2x déterminantes pour la résistance.**

Les protocoles présentés dans la publication n° I nous ont permis de créer une collection de 41 mutants de 5204-PBP2x dont chacun a une substitution révertée vers l'acide aminé présent dans la souche sensible R6. La caractérisation enzymatique de ces protéines a mis en évidence 6 mutations induisant une augmentation significative de l'efficacité d'acylation de 5204-PBP2x pour le céfotaxime. Parmi ces substitutions, il y a A338T et F339M qui ont déjà été décrites dans des travaux précédents (Mouz et al., 1998; Mouz et al., 1999; Chesnel et al., 2003; Pernot et al., 2004), ainsi que quatre nouvelles mutations. Ces dernières sont T371I, G384R, T400M et T605N ; elles provoquent respectivement des augmentations de  $k_2/K$  de facteurs 4, 2,9, 1,7 et 2,5. De plus, une septième substitution (N576D) ayant un effet inverse sur la cinétique d'acylation a été identifiée.

Pour quantifier le rôle individuel des substitutions aux positions nouvellement identifiées, des mutants directs de R6-PBP2x ont été générés et leur efficacité d'acylation déterminée. Plusieurs combinaisons de différentes substitutions dans R6-PBP2x et 5204-PBP2x ont également été réalisées et caractérisées au niveau biochimique.

L'influence des substitutions a été quantifiée *in vivo* en transformant *S. pneumoniae* R6 avec les gènes des mutants simples et multiples de R6-PBP2x et 5204-PBP2x modifiés aux positions 338, 339, 371, 384, 400, 567 et 605.

En analysant l'ensemble de ces résultats, il a été conclu que dans la souche 5204, les substitutions I371T et R384G ont un effet coopératif, N605T a un rôle individuel, M400T est importante pour la résistance d'une manière contexte dépendante et N567D a peut-être un rôle dans le maintien de l'activité physiologique des PBP2x modifiées ou dans des interactions avec d'autres protéines impliquées dans la résistance.

### **Un nouveau mécanisme moléculaire de résistance impliquant la dynamique d'une boucle de PBP2x.**

Les mutations I371T et R384G de 5204-PBP2x se situent sur une boucle structurale entre les résidus 364-395. Cette région est flexible dans la structure de Sp328-PBP2x dont la séquence est très proche de celle de 5204-PBP2x. Cette mobilité peut être mise en évidence par un test de digestion tryptique. L'implication des mutations I371T et R384G dans la flexibilité de la boucle a été démontrée en appliquant ce test sur des mutants de R6-PBP2x et de 5204-PBP2x simples et combinés au niveau des positions 371 et 384. De plus, cette mobilité est directement corrélée avec des efficacités d'acylations faibles et les niveaux de résistance élevés.

La déstabilisation de la région 364-395 défavorise probablement l'interaction non-covalente avec l'antibiotique et/ou affecte la réactivité de la sérine active 337 par un remodelage du site actif dû à la proximité du second motif catalytique S(395)SN.

### **Six mutations sont responsables de la quasi-totalité du phénomène de résistance conféré par 5204-PBP2x.**

La réversion simultanée des six substitutions aux positions 338, 339, 371, 384, 400 et 605 dans 5204-PBP2x provoque une augmentation de l'efficacité d'acylation d'un facteur 1000, ce qui la ramène au même ordre de grandeur que celle de R6-PBP2x. L'expérience inverse de mutagenèse directe de R6-PBP2x induit une diminution d'un facteur 100 du  $k_2/K$ . Ceci indique la présence d'une certaine coopérativité entre les six mutations et les 35 autres

substitutions présentes dans 5204-PBP2x. *In vivo*, l'effet global important sur la résistance de ces substitutions est confirmé.

En conclusion, il peut être affirmé que sur 41 substitutions présentes dans PBP2x de la souche résistante 5204, seules six d'entre elles sont responsables de la quasi-totalité de l'effet sur l'acylation et sur la résistance conférées par 5204-PBP2x.

# Pneumococcal $\beta$ -Lactam Resistance Due to a Conformational Change in Penicillin-binding Protein 2x\*

Received for publication, October 24, 2005, and in revised form, November 21, 2005 Published, JBC Papers in Press, November 22, 2005, DOI 10.1074/jbc.M511506200

Raphaël Carapito, Laurent Chesnel, Thierry Vernet<sup>1</sup>, and André Zapun

From the Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale (Commissariat à l'Energie Atomique/CNRS UMR 5075/Université Joseph Fourier), Grenoble, France

*Streptococcus pneumoniae* is a life-threatening human pathogen that is increasingly resistant to a wide array of drugs. Resistance to  $\beta$ -lactams, the most widely used antibiotics, is correlated with tens of amino acid substitutions in their targets; that is, the penicillin-binding proteins (PBPs), resulting from multiple events of recombination. To discriminate relevant substitutions from those that are incidental to the recombination process, we report the exhaustive characterization of all the mutations in the transpeptidase domain of PBP2x from the highly resistant strain 5204. A semi-automated method combining biochemical and microbiological approaches singled out 6 mutations of 41 (15%) that are essential for high level resistance. The hitherto uncharacterized I371T, R384G, M400T, and N605T together with the previously studied T338M and M339F account for nearly all the loss of affinity of PBP2x for  $\beta$ -lactams. Most interestingly, I371T and R384G cause the conformational change of a loop that borders the entrance of the active site cavity, hampering antibiotic binding. For the first time all the mutations of a PBP relevant to  $\beta$ -lactam resistance have been identified, providing new mechanistic insights. Most notable is the relationship between the decreased susceptibility to  $\beta$ -lactams and the dynamic behavior of a loop.

The discovery of penicillin more than 60 years ago launched the antibiotic era, and  $\beta$ -lactams are still the most widely used drugs to combat bacterial infections today.  $\beta$ -Lactam antibiotics inhibit an essential step in bacterial cell wall synthesis, namely the cross-linking of the peptidoglycan by transpeptidases (TPs).<sup>2</sup> The antibiotics hamper the TP activity by acylating the active site serine of the penicillin-binding proteins (PBPs) enzymes (1). The active site of PBPs is bordered by three defining conserved motifs, SXXK with the catalytic serine, SXN, and KSG.

However, several mechanisms have arisen that greatly threaten the clinical efficacy of  $\beta$ -lactams. Depending on the organisms, the strategies vary and can be combined.  $\beta$ -Lactamases can be expressed that degrade the antibiotics. Altered endogenous PBPs or an additional non-susceptible PBP can be expressed. In Gram-negative bacteria, the outer membrane permeability to the drugs can be decreased and/or the drugs can be actively expelled from the periplasm (2, 3).

*Streptococcus pneumoniae* is a major human pathogen of the upper

respiratory tract that causes a number of serious life-threatening diseases. It is responsible for non-invasive infections such as otitis media, sinusitis, or pneumonia. Invasive *S. pneumoniae* infections lead to more severe afflictions like bacteremia or meningitis. In resistant strains altered PBPs are less susceptible to inhibition by antibiotics while remaining physiologically functional (4). The low susceptibility of PBPs from resistant strains to  $\beta$ -lactam results mainly from a decreased rate of acylation (5–7), although PBPs with both slower acylation and faster deacylation rates are known (8).

*S. pneumoniae* contains five high molecular weight PBPs. Mainly three of them are involved in the mechanism of  $\beta$ -lactam resistance: PBP2x, -1a, and -2b. PBP2x and 2b are essential. PBP2x is a primary determinant of  $\beta$ -lactam resistance, because it is the first one modified under selective pressure by some  $\beta$ -lactams (9, 10).

Because of its natural competence, *S. pneumoniae* is able to recombine its genomic DNA with that from other strains or from related species such as *Streptococcus mitis* or *Streptococcus oralis* to form mosaic *pbp* genes (11, 12). Because of this mechanism and additional point mutations, a wide variety of amino acid substitutions (13) is observed in PBP2x, -1a, and -2b, of which only a restricted set is likely relevant for resistance.

Pbp2x sequences of clinical strains can be classified in three groups. Sequences of  $\beta$ -lactam-susceptible strains are similar to that of the susceptible reference laboratory strain R6. The two other groups harbor generally more than 30 mutations in the TP domain and originate from strains with reduced susceptibility to  $\beta$ -lactams (14). One group is characterized by the well studied T338A substitution (5). The other group is composed of sequences containing the Q552E substitution (6).

The two groups of proteins display reduced reactivity toward  $\beta$ -lactam because of two different mechanisms (5, 6). These mechanisms may sometimes be combined, as a few sequences can harbor mutations at both positions 338 and 552.

Four PBP2x mutations that play a role in resistance have been studied in detail. The earlier cited substitution T338A, immediately adjacent to the catalytic Ser-337, and the additional modification at position 339, which further decreases the susceptibility to  $\beta$ -lactams, likely affect the reactivity of the active site serine (5); so does T550A, although its effect is restricted to cephalosporins (15). Q552E likely influences binding of the antibiotic (6). In each case these individual mutations explain only part of the decrease in reactivity toward  $\beta$ -lactams measured for PBP2x from clinical strains and the corresponding resistance. However, there is no clear structure- or alignment-based clue to identify other mutations involved. Identification of all the mutations participating in the resistance process is a crucial step in the development of sequence-based diagnostic tools, in understanding the molecular mechanisms of resistance, and in the future design of better  $\beta$ -lactam antibiotics or adjuvants that might restore susceptibility.

We present here an exhaustive study of all the 41 amino acid substitutions located in the TP domain of PBP2x from the highly resistant

\* This work was supported by the European Commission 6th Framework Program Grants LSMH-CT-COBRA 2003-503335 and EUR-INTAFAR LSHM-CT-2004-512138. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France. Tel.: 33-4-38-78-96-81; Fax: 33-4-38-78-54-94; E-mail: thierry.vernet@ibs.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: TP, transpeptidase; PBP, penicillin-binding protein; MIC, minimal inhibitory concentration.



## Resistance-relevant Substitutions in PBP2x

clinical strain 5204 (penicillin G minimal inhibitory concentration (MIC) = 6.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; cefotaxime MIC = 12.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; serotype 14) (16). The effect of each mutation on the acylation efficiency was investigated. We report five new mutations (I371T, R384G, M400T, D567N, and N605T) affecting the kinetics of reaction with  $\beta$ -lactams in a way that is correlated with resistance phenotypes. Substitutions at positions 371 and 384 affect the resistance by modulating the dynamic behavior of a loop that borders the entrance of the active site.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Transformations and MICs**—The non-encapsulated *S. pneumoniae* R6 was used as a recipient strain for genetic transformation. To prevent correction of the introduced mutations by the Hex mismatch repair system of the bacteria, an altered R6 strain (*hexA::spc*) (17) was used in some cases. The modified strain was obtained by transforming R6 *S. pneumoniae* with genomic DNA of the R320 strain (generously provided by B. Martin, CNRS, Toulouse) and selection on spectinomycin. Bacteria were grown in C-medium supplemented with 0.18% boiled albumin to an optical density of 0.15 at 620 nm, taken as the onset of the exponential phase. Aliquots withdrawn immediately or after further incubation for 30 min were stored in 20% glycerol at  $-80^\circ\text{C}$  until used. About 50 ng of plasmid DNA was added to 100  $\mu\text{l}$  of competent cells (thawed on ice and diluted 10-fold in C-medium with 0.18% boiled albumin). After incubation for 30 min at  $30^\circ\text{C}$  and 120 min at  $37^\circ\text{C}$ , cells were plated on Columbia blood agar base EH (BD Biosciences) plates enriched with 4% defibrinated horse blood containing concentrations of cefotaxime ranging from 0 to 1.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . After overnight incubation at  $37^\circ\text{C}$ , isolated colonies were picked and grown overnight in Todd Hewitt medium (Difco) to be stored at  $-80^\circ\text{C}$  in 20% glycerol.

The MICs were determined using the E-test method on Muller-Hinton agar plates supplemented with 5% sheep blood. Transformants from overnight liquid cultures were plated on agar plates at 0.5 McFarland. E-test strips (AB Biodisk) were laid on the plates, and the MIC was read after an incubation period of 18–24 h.

**Plasmids and Site-directed Mutagenesis**—The expression plasmid pGEX-5204-*pbp2x\** containing the gene fragment encoding the extracellular domain (residues 49–750, indicated by an asterisk) of PBP2x from the resistant clinical strain 5204 was modified by introducing the replication origin of phage f1 as follows. A NotI/MluI fragment containing the f1 origin was isolated from pGEX-f1-R6-*pbp2x\** (6) and cloned into the pGEX-5204-*pbp2x\** plasmid. The resulting pGEX-f1-5204-*pbp2x\** was used for site-directed mutagenesis and protein expression. The previously described pGEX-f1-R6-*pbp2x\** (6) plasmid was used for site-directed mutagenesis and expression of PBP2x\* from strain R6.

Site-directed mutagenesis was carried out by the method of Kunkel *et al.* (18). Apart from the preparation of single-stranded dUTP-containing DNA, all steps including transformation and plating were performed on the pipetting robot MicroLab STAR (Hamilton). Because mutagenic primers contained a silent restriction site, the presence of the desired mutation in transformants was checked by PCR of the TP domain coding region and restriction analysis. The insert of all the chosen clones was sequenced and found to be error-free.

**Protein Expression and Purification**—Recombinant PBP2x\* from strain R6 and 5204 and all the mutants was expressed as fusion with glutathione *S*-transferase in MC1061 *Escherichia coli*. Cells were grown in 25 ml of autoinduction medium (19) for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ . Pelleted cells were lysed by resuspension in 1 ml of CellLytic B-II (Sigma) containing 90 kilounits of rLysozyme (Novagen) and 25 units of Benzoylase (Novagen) for 30 min at room temperature. The supernatant was incubated with 100  $\mu\text{l}$  of glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) on a

rotating wheel for 20 min. The resin was washed with 3 ml of 10 mM sodium phosphate, pH 7, 200 mM KCl in a 96-well filter plate (Pall) on the MicroLab STAR robot (Hamilton). Proteins were eluted with 800  $\mu\text{l}$  of 5 mM reduced glutathione (Sigma). For proteins used in the proteolysis assay, the resin was washed with 3 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and eluted in 300  $\mu\text{l}$  of the same buffer after cleavage with 10 units of thrombin (Sigma).

**Kinetics**—The  $k_2/K$  acylation parameter was determined directly on the eluates by monitoring the decrease of the intrinsic fluorescence of the protein after the addition of the antibiotic to the proteins in a 96-well black fluotrac-200 plate (Greiner Bio-One) with a Fluostar Optima micro-plate reader (BMG Labtech). The protein concentration was about 0.5  $\mu\text{M}$ , and that of cefotaxime (Sigma) was varied between 5 and 320  $\mu\text{M}$ . The excitation wavelength was 280 nm, and the emission was recorded at 320 nm. At a given concentration of antibiotic, the apparent pseudo-first order rate constant  $k_{\text{app}}$  was determined by non-linear least-squares fitting to the equation  $\text{Fluo}_t = \text{Fluo}_0 \exp(-k_{\text{app}}t)$ . The efficiency of acylation  $k_2/K$  was determined by linear regression fitting to the equation  $k_{\text{app}} = (k_2/K)[\text{antibiotic}]$ .

**Monitoring of Loop 365–394 Dynamics by Proteolysis**—Purified PBP2x\* variants were subjected to trypsin digestion as follows. About 40  $\mu\text{g}$  of protein were incubated with 80 ng of trypsin (Sigma) in 56  $\mu\text{l}$  at room temperature. At various times aliquots were withdrawn and heated for 10 min at  $95^\circ\text{C}$  in SDS-PAGE sample buffer. Aliquots containing about 5  $\mu\text{g}$  of protein were analyzed by SDS-PAGE (15% acrylamide) and Coomassie staining.

### RESULTS

**PBP2x Sequences Comparison**—5204-PBP2x has 80 amino acid changes compared with R6-PBP2x, including 41 in the TP domain. There are the two well characterized T338A and M339F substitutions and 39 other previously uncharacterized modifications (between residues 281 and 616, Fig. 1). The TP domain of 5204-PBP2x differs only at 7 positions from that of PBP2x from strain Sp328, the structure of which is known (20); they are F339M, M343T, F364L, A378E, T400M, V572A, and F595Y, where the first amino acid is that from 5204-PBP2x, and the second is from Sp328-PBP2x. The TP domain of 5204-PBP2x differs from that of PBP2x from strain 4790 at positions 339, 343, 378, 400, and 595. 4790-PBP2x has been well characterized previously together with 5204-PBP2x (14). The results presented below concern both 5204-specific mutations (positions 339 and 400) and substitutions common to the two related Sp328- and 4790-PBP2x sequences. Thus, some of the described phenomena and conclusions certainly apply to a wide class of PBP2x from clinical strains, including strains Sp328 and 4790.

**Mutagenesis and Protein Production**—A large set of mutated PBP2x\* was produced to test the influence of substitutions in different contexts. In a first screen, each modified residue of the PBP2x TP domain of strain 5204 was reverted to the original R6-PBP2x amino acid. This strategy was chosen to detect substitutions that may be involved in cooperative effects. With the converse strategy, cooperativity between substitutions would require the introduction of multiple mutations in R6-PBP2x to produce an effect. In a second time, a limited set of pertinent R6-PBP2x point mutants was created to assess the importance of some substitutions in the context of a sequence from a susceptible strain. For *in vitro* characterization, the modified-PBP2x\*s, R6-PBP2x\* and 5204-PBP2x\*, were expressed in *E. coli* and purified by glutathione affinity chromatography. The fusion proteins were eluted by competition with reduced glutathione. The homogeneity was assessed by Coomassie-stained SDS-PAGE. Yields were about 35–40 mg/liter of culture.

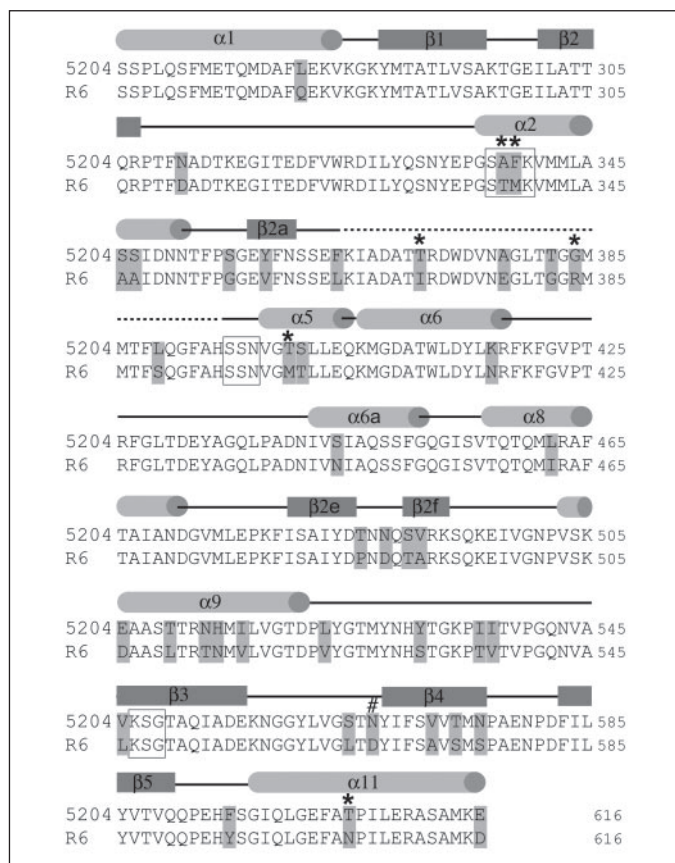
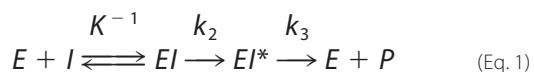


FIGURE 1. Sequence alignment and secondary structure elements of the transpeptidase domain of PBP2x from strains R6 and 5204. Secondary structure elements are assigned referring to the structure of PBP2x of the clinical resistant strain Sp328 (20). Cylinders represent  $\alpha$ -helices, rectangles correspond to  $\beta$ -strands, and lines correspond to loops. The dotted line shows the flexible region of Sp328-PBP2x\* between residues 365 and 394. Every amino acid substitution is highlighted in gray. The three catalytic motifs are framed. The six mutations participating to the resistance phenomenon are marked with an asterisk. Position 567 is marked by the symbol #.

**Screening of Mutations Affecting Acylation Efficiency**—The interaction of PBPs with  $\beta$ -lactams can be described by the equation (21),



where  $E$  is the enzyme,  $I$  is the  $\beta$ -lactam, and  $P$  is the inactivated product. First, a noncovalent complex  $EI$  is formed (dissociation constant =  $K$ ) followed by the acylation of the active site Ser-337 by the  $\beta$ -lactam (rate constant =  $k_2$ ). Last, the enzyme is deacylated with the rate constant  $k_3$ . The efficiency of acylation is characterized by the second-order rate constant  $k_2/K$ . It was measured at pH 7 by monitoring the decrease of intrinsic fluorescence of the protein upon binding of cefotaxime. Although 5204-PBP2x\* is known to have faster deacylation kinetics (higher  $k_3$ ) than R6-PBP2x\*, deacylation was negligible under the experimented conditions.

The efficiency of acylation by cefotaxime at 37 °C of 5204-PBP2x\* and its mutants is presented in Fig. 2. Note that for cases where acylation efficiencies have been published previously, values from the present study are 1.2–2.4-fold lower. This could be due to altered reaction conditions (presence of glutathione) or to the retention of the fusion with the glutathione  $S$ -transferase. The substitutions A338T and F339M served as a control for the screening procedure; they cause a considerable 2.1- and 4.9-fold increase of acylation rate, respectively. Of the

other 39 substitutions, reversal at 4 positions induced a significant rise of the acylation efficiency. The latter is increased 4-, 2.9-, 1.7-, and 2.5-fold for the T371I, G384R, T400M, and T605N substitutions, respectively. Interestingly, the modification N576D leads to the inverse effect and decreases the  $k_2/K$  value 4.7-fold. The remaining 34 mutations do not alter substantially the kinetic of the antibiotic binding (values vary between 200 and 480  $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

To determine whether substitutions detected in the above-described screen have individual effects in the context of R6-PBP2x\*, the  $k_2/K$  values of the T338A, M339F, I371T, R384G, M400T, D567N, and N605T R6-PBP2x\* mutants were measured. Because of the rapid kinetics of R6-PBP2x\* and its variants and the long dead time of the measurements in the microplate reader (2 s), the experiments were performed at 28 °C. For direct comparison, the acylation efficiencies of the corresponding A338T, F339M, T371I, G384R, T400M, N567D, and T605N mutants of 5204-PBP2x\* were also determined at 28 °C. Moreover, the kinetic analysis was also performed on a set of multiple mutants of R6-PBP2x\* and 5204-PBP2x\*. Results are presented in Table 1. Among the four new positions (371, 384, 400, and 605) important for the lower reactivity of 5204-PBP2x\*, only substitutions at residues 384 and 605 showed a corresponding inverse effect on the acylation of R6-PBP2x\*. Both R384G and N605T induced a 27% decrease of the  $k_2/K$  value in R6-PBP2x\*. Because I371T had no influence on the kinetics of R6-PBP2x\*, the threonine 371 of strain 5204 is most likely involved in a cooperative action with one or more other substituted amino acids. Surprisingly, M400T changes the efficiency of acylation of R6-PBP2x\* in a way opposite to that expected from the effect of the reverse mutant in 5204-PBP2x\*; M400T in R6-PBP2x\* increases the  $k_2/K$  value 2.3-fold, whereas the T400M in 5204-PBP2x\* also increases the reactivity 3.4-fold.

Mutations at position 567 show the same inverse effect, *i.e.* N567D in 5204-PBP2x\* and D567N in R6-PBP2x\* decreases and increases, respectively, the acylation rate. These effects are observed for the substitution alone or combined with the six other mutations in R6-PBP2x\* or the 5204-PBP2x\*.

Combination of the six substitutions T338A, F339M, I371T, R384G, M400T, and N605T in R6-PBP2x\* decreases the acylation efficiency more than 100-fold so that it remains only 10-fold higher than that of 5204-PBP2x\*. Reversion of the six residues at the same positions (A338T, M339F, T371I, G384R, T400M, and T605N) in 5204-PBP2x\* causes a near 1000-fold increase of the  $k_2/K$  value. This hexa-mutant of 5204-PBP2x\* is acylated by cefotaxime with an efficiency close to that of R6-PBP2x\* (78%).

**Phenotypes**—To assess the phenotypic impact of the newly identified substitutions, the modified 5204- and R6-*pbp2x*\* were transformed into *S. pneumoniae* R6, and the resistance levels to cefotaxime (MIC) were determined. To avoid masking the effect of mutations in PBP2x by the inhibition of PBP1a (14), all the modified *pbp2x*\* was co-transformed with *pbp1a*\* of strain 5204. The results are presented in Table 2. Integration of the desired mutations in the R6 genome was checked in every case.

In accordance with the  $k_2/K$  values, the single A338T, F339M, T371I, G384R, T400M, and T605N 5204-PBP2x\* reversion mutants showed a decreased level of resistance from 1 to 0.5–0.75  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . The N567D mutation in 5204-PBP2x\* had no effect on the MIC. The combinations of F339M/T400M, A338T/F339M, and T371I/G384R reversions induced greater decreases of resistance level with MICs of 0.5, 0.38–0.5, and 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively. After transformation with the 5204-*pbp2x*\* hexa-mutant A338T/M339F/T371I/G384R/T400M/T605N, sequencing of the gene showed that recombination had occurred

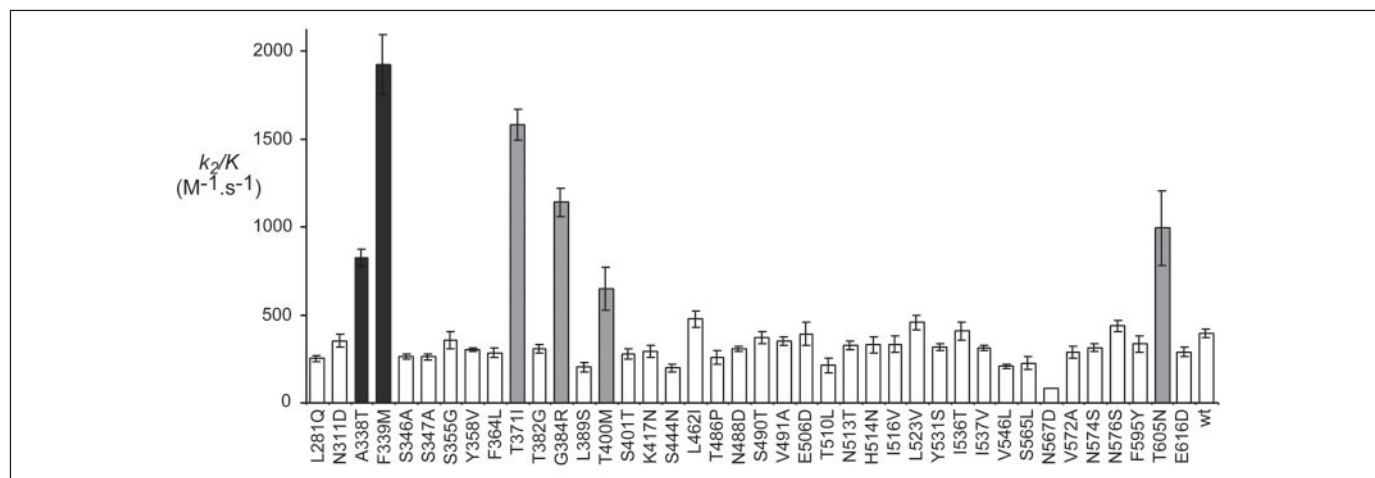


FIGURE 2. Acylation efficiencies of 5204-PBP2x\* variants for cefotaxime at 37 °C. The reactions were performed in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7, 200 mM KCl using a micro-plate reader equipped with an injector. Mean  $k_2/K$  values are given with S.E. calculated from three independent experiments.

TABLE 1

**Acylation efficiencies of PBP2x\* variants for cefotaxime at 28 °C**

The reactions were done in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7, 200 mM KCl. Acylation rates are given with S.E. calculated from three independent experiments.

PBP2x*	$k_2/K$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$
<b>5204-PBP2x*</b>	
Wild type	85 ± 14
A338T	630 ± 60
F339M	1,680 ± 240
T371I	1,380 ± 180
G384R	930 ± 170
T400M	290 ± 40
T605N	380 ± 35
N567D	48 ± 4
A338T/F339M	3,020 ± 500
F339M/T400M	1,435 ± 90
T371I/G384R	1,280 ± 160
A338T/F339M/T371I/G384R/T400M/T605N	78,100 ± 12800
A338T/F339M/T371I/G384R/T400M/N567D/T605N	60,000 ± 6500
<b>R6-PBP2x*</b>	
Wild type	100,000 ± 3800
T338A	51,000 ± 3200
F339M	30,100 ± 950
I371T	101,000 ± 21000
R384G	73,000 ± 4500
M400T	228,000 ± 19000
N605T	73,000 ± 3700
D567N	189,000 ± 14500
T338A/M339F	3,660 ± 635
M339F/M400T	41,000 ± 1700
I371T/R384G	47,000 ± 1700
T338A/M339F/I371T/R384G/M400T/N605T	830 ± 70
T338A/M339T/I371T/R384G/M400T/D567N/N605T	2,500 ± 190

between codons 378 and 382. The N-terminal sequence was that of R6-PBP2x, and the C-terminal sequence was that of 5204-PBP2x with the reverted positions 384, 400, and 605. When transforming with the hepta-mutant A338T/M339F/T371I/G384R/T400M/N567D/T605N, the chosen clones had incorporated the region encoding the whole TP domain with the seven reversions. In both cases the susceptibility was slightly reduced to a MIC of cefotaxime of 0.064  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Apart from the well characterized substitution M339F, which conferred a resistance level of 0.064  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , no single amino acid substitution in R6-PBP2x\* induced a resistance level that allowed selection. Clones carrying the double-mutated genes R6-*pbp2x*\*-T338A/M339F and R6-*pbp2x*\*-I371T/R384G showed a resistance level of 0.125 and 0.064  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of cefotaxime, respectively. Transformation with multiple R6-*pbp2x*\* mutants (R6-*pbp2x*\*-T338A/F339M/I371T/R384G/M400T/N605T and R6-*pbp2x*\*-T338A/F339M/I371T/R384G/

M400T/D567N/N605T) produced strains harboring different combinations of mutations. The latter have MICs ranging from 0.19 to 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . No clone with all the six or seven described mutations could be isolated, suggesting that a combination of all the substitutions is lethal to the bacteria. The clones carrying mutations at positions 338, 339, 371, 384, and 605 have the highest observed MIC (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) among strains carrying R6-*pbp2x*\* variants; they are only half as resistant as those containing the entire coding region of the PBP2x TP domain of strain 5204. Overall, the transformation results demonstrate that the effect on the efficiency of acylation of PBP2x is correlated with the resistance conferred.

*Monitoring of Loop 365–394 Dynamics by Proteolysis*—Two of the four newly found resistance-related amino acid positions (371 and 384) are located in a region that is flexible in the related Sp328-PBP2x\* (4). It consists of a loop region between residues 365 and 394, which is not traceable on the crystal structure of Sp328-PBP2x\* because of a very weak electron density (20). This loop is not mobile in R6-PBP2x (21, 22). Previous work had shown that the conformational change of the 365–394 loop could be assayed by tryptic digestion.<sup>3</sup> Under the same conditions, R6-PBP2x\* is resistant to digestion by trypsin, whereas the very similar Sp328-, 4790-, and 5204-PBP2x\* are cleaved in two fragments of 35 and 40 kDa. N-terminal sequencing of both fragments positioned the cleavage site after Arg-372. We decided to use this assay to investigate the relationship between mutations in position 371 and 384 and the conformational change of the region.

As shown in Fig. 3, R6-PBP2x\* is resistant to trypsin digestion and shows an apparent molecular mass of 75 kDa, whereas 5204-PBP2x\* is cleaved. By inserting R384G and I371T individually or together in R6-PBP2x\*, the protein becomes susceptible to digestion, indicating a destabilization of the loop. Conversely, reversion of the substitutions at the same positions in 5204-PBP2x\* prevents digestion by trypsin, indicating a stabilization of the loop. Substitutions in position 389 and 514, which were proposed previously to destabilize the region 365–394 (20), were investigated in the same manner and showed no influence on the susceptibility to trypsin.<sup>3</sup>

## DISCUSSION

PBP2x is a primary determinant of the resistance to  $\beta$ -lactams in *S. pneumoniae* (9, 10) and shows the greatest sequence variability (13). Previous biochemical and structural studies focused on conserved sub-

<sup>3</sup> L. Chesnel, unpublished information.

TABLE 2

Cefotaxime resistance of the R6 strain transformed with various *pbp2x* genes

MIC of strain R6 < 0.016  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . 5204-*pbp2x*\* genes were transformed into the laboratory strain *S. pneumoniae* R6. R6-*pbp2x*\* genes were transformed into the modified *S. pneumoniae* R6 *hexA*::*spc*.

5204- <i>pbp2x</i> *	Cefotaxime MIC $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Actual reverted substitutions
Wild type	1	NS <sup>a</sup>
A338T	0.75	A338T
F339M	0.5	F339M
T371I	0.5	T371I
G384R	0.5	G384R
T400M	0.75	T400M
T605N	0.75	T605N
N567D	1	N567D
F339M/T400M	0.5	F339M/T400M
A338T/F339M	0.38–0.5	A338T/F339M
T371I/G384R	0.38	T371I/G384R
A338T/F339M/T371I/G384R/T400M/T605N	0.064	G384R/T400M/T605N
A338T/F339M/T371I/G384R/T400M/N567D/T605N	0.064	A338T/F339M/T371I/G384R/T400M/N567D/T605N
R6- <i>pbp2x</i> *	Cefotaxime MIC $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Actual inserted substitutions
T338A	NT <sup>b</sup>	NS
M339F	0.064	M339F
I371T	NT	NS
R384G	NT	NS
M400T	NT	NS
N605T	NT	NS
D567N	NT	NS
M339F/M400T	NT	NS
T338A/M339F	0.125	T338A/M339F
I371T/R384G	0.064	I371T/R384G
T338A/M339F/I371T/R384G/M400T/N605T	0.19	T338A/M339F/I371T/N605T
T338A/M339F/I371T/R384G/M400T/N605T	0.19	T338A/M339F/I371T/R384G
T338A/M339F/I371T/R384G/M400T/N605T	0.5	T338A/M339F/I371T/R384G/N605T
T338A/M339F/I371T/R384G/M400T/D567N/N605T	0.19	T338A/M339F/I371T/M400T/N605T

<sup>a</sup> NS, no substitution was inverted or inserted.

<sup>b</sup> NT, no transformants were found.

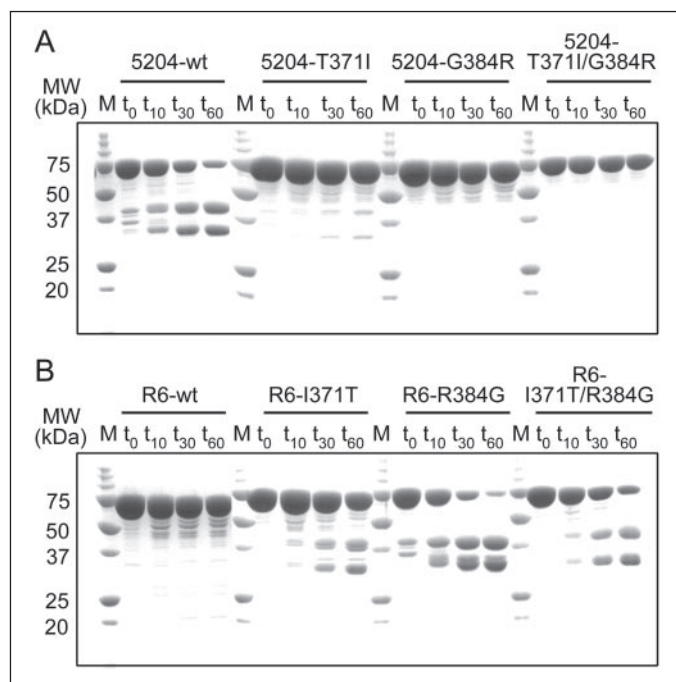


FIGURE 3. Digestion of PBP2x\* variants with trypsin. *A*, digestions of 5204-PBP2x\* and point-mutants. *B*, digestions of R6-PBP2x\* and point mutants. *M* stands for molecular mass markers, and *t*<sub>0</sub>, *t*<sub>10</sub>, *t*<sub>30</sub>, and *t*<sub>60</sub> correspond to incubation times with trypsin (1/500 w/w) at room temperature for 0, 10, 30 and 60 min, respectively, before analysis by SDS-PAGE and Coomassie staining. wt, wild type.

stitutions within the active site (T338A, M339F, Q552E, and T550A) have illuminated crucial mechanistic aspects (5, 6, 14, 15, 23). These results were, however, frustrating in that the effect of the individual

mutations accounted for less than half of the reduction in acylation efficiency measured for proteins from clinical resistant strains. To identify additional mutations that contribute to the low acylation efficiency of PBP2x, we undertook an exhaustive mutagenesis of the protein from the highly resistant isolate 5204. With the exception of the substitution T550A (5, 6, 14, 15, 23), which is present in some PBPs that have a decreased susceptibility to cephalosporins but near normal reactivity with penicillins, the effect of the previously studied substitutions is similar on the reaction with both penicillins and cephalosporins (5, 6, 14, 15, 23). Because 5204-PBP2x\* is equally poorly acylated by penicillins and cephalosporins (5, 6, 14, 15, 23), it is most likely that the findings presented here with cefotaxime apply qualitatively to penicillins as well.

Of 41 mutations present in the TP domain, our study has uncovered the role of four new substitutions in addition to the previously characterized T338A and M339F mutations. The localization of the four new positions on the crystal structure of R6-PBP2x (16, 17) is shown in Fig. 4.

*Dynamics of a Loop in PBP2x Is an Important Resistance Determinant*—Most interesting is the role of residues 371 and 384 in the acylation kinetics and the conformation of the loop spanning residues 364–395. In 5204-PBP2x\*, the T371I and G384R reversions to the amino acids found in R6-PBP2x, individually and together, increase the efficiency of acylation about 10-fold at 28 °C. In R6-PBP2x\*, only the R384G mutation has a modest effect, decreasing the acylation efficiency, with the I371T substitution having no influence. In contrast, the double mutations I371T/R384G cause a major 2-fold drop of the efficiency of acylation. Taken together, these results indicate cooperativity between both substitutions, with the I371T further potentiating the effect of the R384G mutation. Note that among 83 different publicly available PBP2x sequences, a mutation in position 371 is always associated with the R384G substitution (44 times), whereas the latter appears 9 times in the absence of the former.

## Resistance-relevant Substitutions in PBP2x

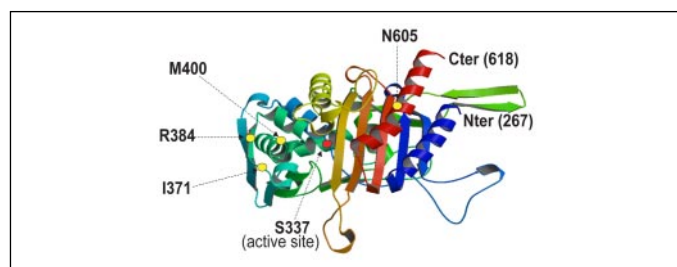


FIGURE 4. Crystal structure of the transpeptidase domain of R6-PBP2x (17). The four amino acid positions essential for high level resistance identified in this work are marked in yellow. The active site Ser-337 is colored in red. Positions 371 and 384 are localized on the loop 365–394 that is flexible in Sp328- and 5204-PBP2x.

The crystal structure of Sp328-PBP2x\*, which is nearly identical in sequence to 5204-PBP2x\*, had revealed that residues 364–395 are in a mobile loop, as no electron densities were observed, with deviation from the structure of R6-PBP2x\* starting at residue 354 (20). The peptide bond after Arg-372 is sensitive to tryptic digestion in several related PBP2x\*s from clinical strains (Sp328, 4790, and 5204) but not in R6- or 5259-PBP2x\*, in which the region 354–395 is structurally well defined (20, 22). Using this differential sensitivity to trypsin, we probed the effect of substitution in positions 371 and 384 on the dynamic of the loop.

Both positions 371 and 384 were found to be important conformational determinants of the region, both in R6- and 5204-PBP2x\*, although substitutions at position 384 seem to have a greater effect (Fig. 3). The destabilization caused by the I371T mutation in R6-PBP2x\* is weaker (with most of the protein remaining undigested after 60 min) than that caused by the R384G substitution. This difference might be correlated with the different effects on the acylation kinetics. Conversely, the T371I mutation in 5204-PBP2x\* does not completely abolish tryptic digestion after 60 min, whereas the G384R substitution does.

The influence of substitutions in position 384 and 371 on the acylation by  $\beta$ -lactams and the loop conformation suggests a causal relationship between the two phenomena. The destabilization of the loop may weaken the non-covalent interactions with the antibiotic (increase the  $K$ ). Alternatively, it may affect the reactivity of the nucleophilic Ser-337 through subtle remodeling of the active site (decrease the  $k_2$ ), as the second catalytic motif, S395N, is disturbed at the end of the mobile loop.

Note that the amino acids at positions 371 and 384 are identical in R6-PBP2x\*-I371T and 5204-PBP2x\*-G384R and conversely in R6-PBP2x\*-R384G and 5204-PBP2x\*-T371I. However, the two R6-PBP2x\* variants are more trypsin-sensitive than the two 5204-PBP2x\* variants (Fig. 3). The 5204-PBP2x\* sequence context tolerates better Thr-371 and Gly-384, and both are necessary to destabilize the loop. The reasons for this difference might be found in two other substitutions in the loop itself. R6-PBP2x\* holds two glycine residues at positions 355 and 382, which are expected to favor flexibility, whereas 5204-PBP2x\* has a serine and a threonine, respectively, which offer fewer degrees of freedom. Thus, with the same amino acids in positions 371 and 384, the loop of 5204-PBP2x\* is less flexible than that of the R6-PBP2x\* variant.

The importance for resistance of substitutions at position 371 and 384 and the resulting mobility of loop 365–394 is confirmed *in vivo*. Reversions T371I and G384R in 5204-pbp2x induced an important 50% decrease of the resistance level. Both substitutions together further decreased the MICs to 38% of the level conferred by the wild type 5204-PBP2x. This is somewhat surprising as the double mutant 5204-PBP2x\* has roughly the same acylation efficiency as the two simple mutants. The double mutant may be physiologically less efficient. The double substitution I371T/R384G in R6-pbp2x induced a MIC of 0.064

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , whereas each substitution alone did not result in a resistance level sufficient for selection.

**Substitution M400T, a Context-specific Resistance Determinant**—In the available sequences of PBP2x, the substitution M400T is always associated with the major resistance determinant M339F (16). In the context of 5204-PBP2x\*, the presence of a threonine in position 400 is important for the low acylation efficiency. However, this role may be restricted to potentiating the effect of the M339F mutation, as reversion of the latter has the same consequences with and without the concomitant reversion T400M. Structurally, the importance of the residue in position 400 can be rationalized by its core localization and its immediate proximity to the long side chain of Lys-340 of the first catalytic motif.

*In vivo* the effects on resistance of the substitution in position 400 in 5204-pbp2x parallel the *in vitro* kinetic results. The T400M reversion decreases resistance alone. However, if the F339M reversion is also present, T400M mutation causes no further decrease of resistance.

It is paradoxical that the presence of a threonine in position 400 in the context of R6-PBP2x\* in the absence or the presence of the M339F substitution has the opposite effect of increasing the acylation efficiency. The reason for this behavior is not known but may be related to the orientation of the distal methyl of Met-400, which points in the opposite direction in the structure of R6-PBP2x\* and the 5204-related Sp328-PBP2x\* (20).

The paradoxical effect of the threonine in position 400 in the context of R6-PBP2x was also observed *in vivo*, because no transformants could be selected with the double mutation M339F/M400T, whereas the single M339F substitution could be obtained. Also, when transformed with DNA encoding the hexa-mutant R6-PBP2x-T338A/F339M/I371T/R384G/M400T/N605T, no clones were obtained that had incorporated the M400T substitution despite using a *hex*<sup>-</sup> strain as recipient. It is possible that by picking among the most resistant clones, we have screened against the introduction of the M400T if this one decreases the resistance.

**The Individual Role of Mutation N605T**—Substitutions in position 605 have an individual and consistent impact on the efficiency of acylation in both R6- and 5204-PBP2x\*. Examination of the available structures (14, 15, 20, 22, 24) reveals that Asn-605 in R6-PBP2x\* forms 2 hydrogen bonds to the backbone nitrogen of residue 538 and carbonyl oxygen of residue 536. This bonding pattern is disrupted in the mutant with the hydroxyl of Thr-605, forming a single weaker hydrogen bond with the main chain nitrogen in position 538, as observed in Sp328-PBP2x\*. It is possible that these modifications participate to the destabilization of the adjacent loop 524–535, which borders the active site and is mobile and invisible in the structure of Sp328-PBP2x\*, like the facing 365–394 region discussed above.

The reversion T605N in 5204-PBP2x reduces the MIC as expected. Conversely, *in vivo* incorporation of the five R6-PBP2x substitutions T338A/M339F/I371T/R384G/N605T into the R6-strain led to transformants with greater resistance than integration of the four substitutions T338A/M339F/I371T/R384G. Thus, position 605 has most likely an individual additive effect on resistance.

**Six Mutations Account for Nearly all the Resistance Conferred by 5204-PBP2x**—Reversion of the six substitutions in positions 338, 339, 371, 384, 400, and 605 in 5204-PBP2x\* results in an efficiency of acylation (increased 1000-fold) of the same order of magnitude as that of R6-PBP2x\*, indicating that they are the substitutions most relevant for the resistance. However, the six converse substitutions in R6-PBP2x\* generate a species with an acylation efficiency reduced 100-fold, with a difference of an order of magnitude remaining with that of 5204-PBP2x\*. This discrepancy indicates that some cooperativity in lowering

the acylation efficiency operates between the six identified substitutions and the remaining 35 mutations. The cooperativity effect is probably collective, as no other single substitution in 5204-PBP2x\* had a significant impact on the  $k_2/K$ .

When transforming *S. pneumoniae* with hexa- or hepta-reverse 5204-*pbp2x* variants, two types of transformants were obtained. In the first, recombination occurred just before codon 382 so that the resulting gene encodes a mosaic PBP2x, with the first third of the TP domain of R6 origin and the last two-thirds from strain 5204 but with some reverted substitutions. The second have the entire TP domain of strain 5204 without the seven substitutions at positions 338, 339, 371, 384, 400, 567, and 605. Because the two types of clones have the same MICs, the 7 mutations preceding residue 382 (*i.e.* 281, 311, 346, 347, 355, 358, 364, and 378) are most likely unnecessary to develop resistance. Moreover, the 28 mutations encoded by the region downstream of codon 378, not including those in positions 384, 400, 567, and 605, are together responsible for the very low observed resistance level (MIC 0.064  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). This level would classify the transformants into the susceptible group of *S. pneumoniae* clinical strains. Thus, all the key mutations responsible for the high level of resistance acting in the 5204-PBP2x context have been identified.

The combination of all the resistance-related substitutions of strain 5204 (T338A, F339M, I371T, R384G, M400T, and N605T) in R6-PBP2x could not be obtained *in vivo*. Among the 16 analyzed transformants resulting from transformations with R6-*pbp2x*\* hexa- and hepta-mutants, R384G and M400T were never observed together, suggesting that a combination of these two mutations in an R6-context is lethal. The most resistant transformants harbor mutations in positions 338, 339, 371, 384, and 605 as expected from the *in vitro* acylation kinetics. However, the sampling may be too small to conclude definitely, and a bias against the incorporation of the M400T substitution may have arisen from picking the most resistant clones, as mentioned above.

**The Highly Conserved Substitution (N567D) Modifies Acylation Efficiency in the Unexpected Direction**—The Asp to Asn substitution at position 567 is the most conserved mutation in PBP2x from resistant strains. Surprisingly, the reversion or integration of the mutation in 5204- or R6-PBP2x\*, respectively, influences the acylation in a direction that is contrary to the expectation. The D567N substitution further sensitizes R6-PBP2x\* to cefotaxime, whereas the reversion in 5204-PBP2x\* further diminishes the acylation efficiency. These effects are also observed in the context of both hexa-mutants. Why the N567D mutation is so conserved in PBP2x proteins with a reduced affinity for  $\beta$ -lactams is a matter of speculations. The fact that it is found in all sorts of unrelated sequences does not support a stabilizing compensatory function. However, a compensatory role in terms of physiological function is possible. Indeed, substitutions that decrease the reactivity of PBP2x toward  $\beta$ -lactams are unlikely to impact favorably on the physiological transpeptidation reaction. The increased reactivity caused by the N567D mutations with  $\beta$ -lactams may be much greater toward the natural substrates than toward the antibiotics. Another possibility is that Asn-567 is involved in interactions with other proteins involved in resistance.

Structurally, an effect of residue 567 is difficult to rationalize as it is surface-exposed and is not particularly near the active site cavity. The amino acid in position 567 is in the loop connecting strands  $\beta 3$  and  $\beta 4$ . It is conceivable that it, thus, influences the conformation of strand  $\beta 3$ , which bears the third catalytic motif. Note that the loop connecting  $\beta 3$  and  $\beta 4$  was found to adopt different conformations in the apo and

acylated form of *S. pneumoniae* PBP1b. These modifications, which extend to the strand  $\beta 3$ , were proposed to have a role in the activation of the physiological enzymatic activity (25).

The substitution N567D in 5204-PBP2x\* did not measurably decrease resistance *in vivo*. However transformants were obtained, indicating that the above speculation about a role of Asn-567 in maintaining the physiological function of PBP2x mutants must be subtle if it is correct.

**Conclusions**—This study demonstrates the role of four new PBP2x amino acid substitutions (I371T, R384G, M400T, and N605T) in the development of high level  $\beta$ -lactam resistance in a clinical isolate of *S. pneumoniae*. Two of these substitutions (I371T and R384G) reveal a new mechanism of resistance that involves a dynamic loop of PBP2x. Moreover, because of the permanent emergence of resistant strains with new mutations, the automated mutagenesis and analysis methods used for this study could be a useful tool for the rapid adaptation of sequence based diagnostic tools for predicting resistance. Finally, we hope that this extensive study will help designing new  $\beta$ -lactams or adjuvants that would restore the efficacy of older drugs by stabilizing a crucial mobile loop in PBP2x.

**Acknowledgments**—We thank Benoit Gallet, Bernard Martin, and Dominique Champelovier for technical assistance, David Lemaire for mass spectrometry analysis, and Otto Dideberg, Andrea Dessen, and Jacques Croizé for stimulating discussions.

## REFERENCES

1. Waxman, D. J., and Strominger, J. L. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 825–869
2. Nikaido, H. (1994) *Science* **264**, 382–388
3. Wilke, M. S., Lovering, A. L., and Strynadka, N. C. (2005) *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 525–533
4. Hakenbeck, R., Kaminski, K., Konig, A., van der Linden, M., Paik, J., Reichmann, P., and Zahner, D. (1999) *Microb. Drug Resist.* **5**, 91–99
5. Mouz, N., Gordon, E., Di Guilmi, A. M., Petit, I., Petillot, Y., Dupont, Y., Hakenbeck, R., Vernet, T., and Dideberg, O. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13403–13406
6. Mouz, N., Di Guilmi, A. M., Gordon, E., Hakenbeck, R., Dideberg, O., and Vernet, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19175–19180
7. Jamin, M., Hakenbeck, R., and Frere, J. M. (1993) *FEBS Lett.* **331**, 101–104
8. Lu, W. P., Kincaid, E., Sun, Y., and Bauer, M. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 31494–31501
9. Grebe, T., and Hakenbeck, R. (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 829–834
10. Krauss, J., van der Linden, M., Grebe, T., and Hakenbeck, R. (1996) *Microb. Drug Resist.* **2**, 183–186
11. Dowson, C. G., Coffey, T. J., and Spratt, B. G. (1994) *Trends Microbiol.* **2**, 361–366
12. Laible, G., Spratt, B. G., and Hakenbeck, R. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**, 1993–2002
13. Asahi, Y., Takeuchi, Y., and Ubukata, K. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1252–1255
14. Chesnel, L., Pernot, L., Lemaire, D., Champelovier, D., Croizé, J., Dideberg, O., Vernet, T., and Zapun, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 44448–44456
15. Pernot, L., Chesnel, L., Le Gouellec, A., Croizé, J., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 16463–16470
16. Chesnel, L., Carapito, R., Croizé, J., Dideberg, O., Vernet, T., and Zapun, A. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2895–2902
17. Claverys, J. P., and Lacks, S. A. (1986) *Microbiol. Rev.* **50**, 133–165
18. Kunkel, T. A., Bebenek, K., and McClary, J. (1991) *Methods Enzymol.* **204**, 125–139
19. Studier, F. W. (2005) *Protein Expression Purif.* **41**, 207–234
20. Dessen, A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J., and Dideberg, O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45106–45112
21. Frere, J. M., Ghuysen, J. M., and Iwatsubo, M. (1975) *Eur. J. Biochem.* **57**, 343–351
22. Gordon, E., Mouz, N., Duee, E., and Dideberg, O. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 477–485
23. Chesnel, L., Zapun, A., Mouz, N., Dideberg, O., and Vernet, T. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 1678–1683
24. Pares, S., Mouz, N., Petillot, Y., Hakenbeck, R., and Dideberg, O. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 284–289
25. Macheboeuf, P., Di Guilmi, A. M., Job, V., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 577–582

RÔLE DES SUBSTITUTIONS DE PBP1a  
DANS LA RESISTANCE DE *S.*  
*PNEUMONIAE* AUX  $\beta$ -LACTAMINES

# **Rôle des substitutions de PBP1a dans la résistance de *S. pneumoniae* aux $\beta$ -lactamines**

## **Matériels et Méthodes**

### **I Plasmides et mutagenèse dirigée**

#### **I.1 Clonage**

Les clonages ont été réalisés en utilisant les techniques classiques de biologie moléculaire décrites dans le manuel « Molecular Cloning » (Sambrook, 1989).

Le phagemide pGex4T1-f1 (Amersham) contenant l'origine de réplication du phage f1 (Mouz et al., 1999) a été utilisé pour le clonage du gène *pbp1a*. Celui-ci permet l'expression d'une protéine fusionnée à la Glutathion-S-Transférase (GST). La purification de plasmides a été réalisée avec le kit Nucleospin (Macherey Nagel).

Seul le fragment de *pbp1a* codant pour la partie périplasmique de PBP1a (PBP1a\*)<sup>5</sup>, c'est-à-dire des résidus 37 à 719, a été cloné (figure 19). Pour la préparation des inserts, les gènes *pbp1a* de cinq souches de *S. pneumoniae* (R6, 5259, 4790, 5245 et 5204) ont été amplifiés par « polymerase chain reaction » (PCR) à partir de 5 ng d'ADN génomique préparé avec le kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Une seule paire d'oligonucléotides a été conçue pour l'ajout d'un site de restriction pour l'endonucléase BamHI en 5' (oligonucléotide A : 5'-GGGGATCCAGCAAGGCTCCTAGCCTATCCG-3') et XhoI en 3' (oligonucléotide B : 5'-CCGCTCGAGCGGTTATGGTTGTGCTGGTTGA-3').

---

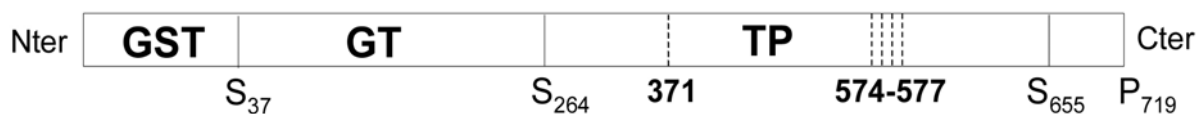
<sup>5</sup> L'astérisque indique qu'il s'agit de la partie périplasmique de la protéine.



Les réactions d'amplification ont été réalisées avec l'enzyme Platinum Taq DNA-polymerase High-fidelity (Invitrogen) utilisant les conditions préconisées par le fournisseur dans un volume réactionnel final de 50 µl. Les cycles d'élongations ont été débutés par une période de dénaturation de 3 min 30 s à 94°C et ensuite par 30 cycles; 30 s à 94°C, 30 s à 55°C et 2 min 30 s à 68°C. Après le contrôle des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose (Sambrook, 1989), les inserts ont été purifiés avec le kit Nucleospin Extract (Macherey Nagel).

La totalité des réactions de PCR purifiées (environ 1 µg), ainsi que 2 µg de phagemide pGex4T1-fl ont ensuite été digérés par 20 unités d'enzymes BamHI et XhoI dans des volumes réactionnels de 50 µl en utilisant les conditions recommandées par le fournisseur (Promega). Après la purification des inserts et du vecteur avec le kit Nucleospin Extract (Macherey Nagel), des réactions de ligations ont été préparées comme suit : 50 ng d'insert ont été mélangés avec 150 ng de vecteur en présence de 3 unités de T4-DNA ligase (Promega) dans un volume réactionnel de 10 µl contenant le tampon fourni avec l'enzyme. Après une incubation de 16 h à 16°C, la totalité des réactions de ligation ont été transformées dans des bactéries compétentes MC1061 (*hsdR2 hsdM+ hsdS+ araD139 D(ara-leu)<sub>7697</sub>D(lac)<sub>x74</sub> galE15 galK16 rpsL (Str<sup>r</sup>) mcrA mcrB1*) par la méthode au CaCl<sub>2</sub> (Sambrook, 1989).

Après vérification de leur insert par séquençage, les transformants ont été utilisés pour la préparation de matrices simple brin pour la mutagenèse dirigée, ainsi que pour l'expression des différentes protéines PBP1a\*-GST<sup>6</sup>. Les différents phagemides ont également été transformés dans *S. pneumoniae* R6.



**Figure 19 : Représentation schématique de la protéine de fusion PBP1a\*-GST de la souche R6.**

GST : Gluthation-S-Transférase. GT : domaine glycosyltransférase. TP : domaine transpeptidase. La portion comprise entre la sérine 655 et la proline 719 correspond au domaine C-terminal. Les nombres en gras correspondent aux positions impliquées dans le phénotype de résistance (Smith et al., 1998; Smith et al., 2003).

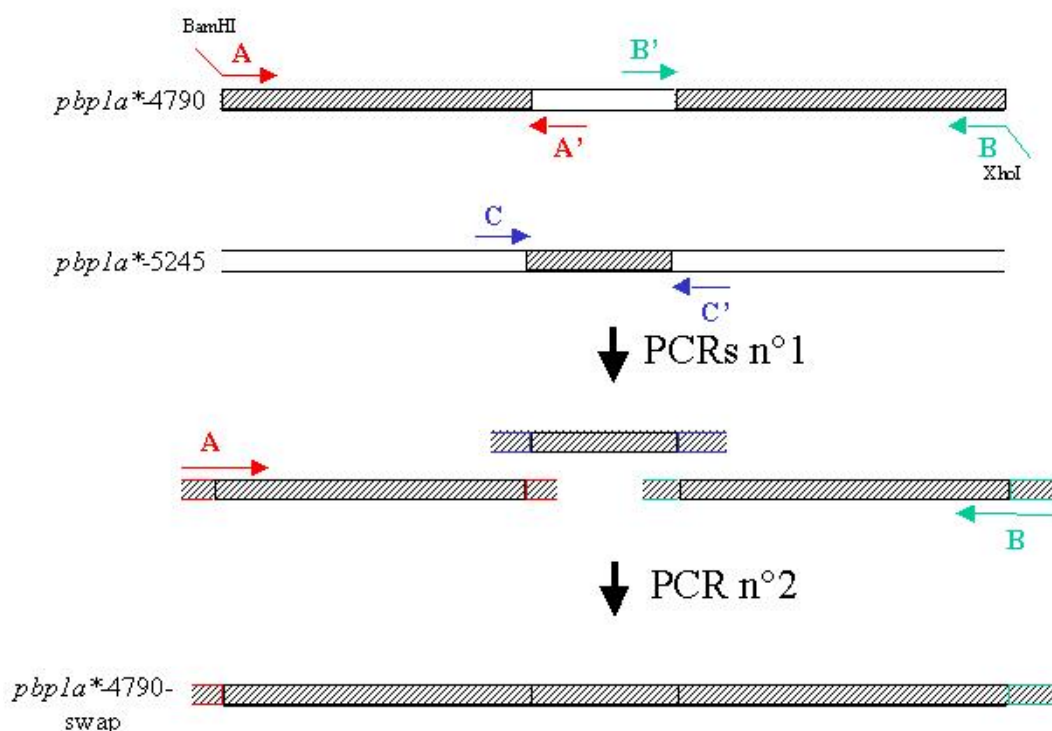
<sup>6</sup> PBP1a\*-GST correspond à la protéine PBP1a\* fusionnée en C-terminal de la glutathion-S-transférase (GST)

## I.2 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée de *pbpla* a été réalisée avec le protocole décrit dans la publication n° I, la seule différence étant la PCR qui précède l'analyse de restriction diagnostique. Celle-ci a été réalisée en utilisant les mêmes conditions que celles pour le clonage (voir paragraphe I.1 ci-dessus). Les oligonucléotides de mutagenèse, ainsi que leur site de restriction pour le diagnostique sont listés en annexe.

## I.3 Translocation de domaine

Afin d'étudier l'effet d'un groupe de substitutions présent sur un segment de séquence, un gène codant pour une PBP1a\* hybride a été construit par une combinaison de deux étapes de PCRs selon le modèle présenté dans la figure 20.



**Figure 20 : Stratégie pour l'insertion d'un fragment du gène 5245-*pbpla*\* dans 4790-*pbpla*\*.**

A-A', B-B' et C-C' sont les couples d'oligonucléotides utilisés pour amplifier trois fragments par trois PCRs lors de la première étape. Une deuxième PCR avec les oligonucléotides A et B permet d'amplifier le produit de fusion de ces trois fragments.

Dans une première étape, trois PCRs avec les paires d'oligonucléotides A-A', B-B' et C-C' ont été réalisées avec la Platinum Taq DNA-polymerase High-fidelity (Invitrogen) en utilisant les conditions réactionnelles recommandées par le fournisseur. Les séquences des oligonucléotides sont présentées dans le tableau 3. pGex-4T1-f1-4790-*pbp1a*\* a été la matrice pour les PCRs avec les paires d'oligonucléotides A-A' et B-B' et pGex-4T1-f1-5245-*pbp1a*\* celle pour la PCR avec la paire C-C'. Les cycles d'élongations ont été débutés par une période de dénaturation de 3 min 30 s à 94°C et ensuite par 30 cycles; 30 s à 94°C, 30 s à la température d'appariement et une incubation à 68°C pendant le temps d'élongation. Les températures d'appariement respectives ont été 60°C, 58°C et 58°C et les temps d'élongation respectifs de 1 min 30 s, 30 s et 30 s pour les PCRs avec les paires d'oligonucléotides A-A', B-B' et C-C'. Les produits des réactions avaient respectivement 1366 paires de bases (bp), 442 bp et 552 bp pour les PCRs avec les paires d'oligonucléotides A-A', B-B' et C-C'. Les produits de ces PCRs ont été purifiés sur un gel d'agarose à 1% (Sambrook, 1989) avec le kit Nucleospin Extract (Macherey Nagel) pour éliminer toute trace de matrice.

La seconde étape a été réalisée en utilisant environ 30 ng de chacun des produits des trois PCRs précédentes comme matrice et les oligonucléotides A et B. Les conditions ont été les mêmes que celles des PCRs décrites dans le chapitre I.1.

Enfin, le produit de fusion ainsi obtenu a été cloné dans pGex-4T1-f1 avec la même méthode que celle décrite dans le chapitre I.1. Le gène de fusion a été nommé swap4790-*pbp1a*\*.

Après vérification par séquençage, le phagemide pGex-4T1-f1-4790swap-*pbp1a*\* a été utilisé pour des transformations de *S. pneumoniae* R6 et pour l'expression et la purification de 4790swap-PBP1a\*-GST.

Nom	Séquence (5'→3')
A	GGGGATCCAGCAAGGCTCCTAGCCTATCCG
A'	GCAGCATAAGCAGCAGCCATTTTTTCACTACTTG
B	CCGCTCGAGCGGTTATGGTTGTGCTGGTTGAGG
B'	ACACTGGCTATGTAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGG
C	TATCGACTATCCAAGCATGCATTATGCAAACG
C'	CGAATAACCTGTCCATACAGCCATAGAATACTTACG

**Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la translocation de domaine.**

---

## II Expression et purification de protéines

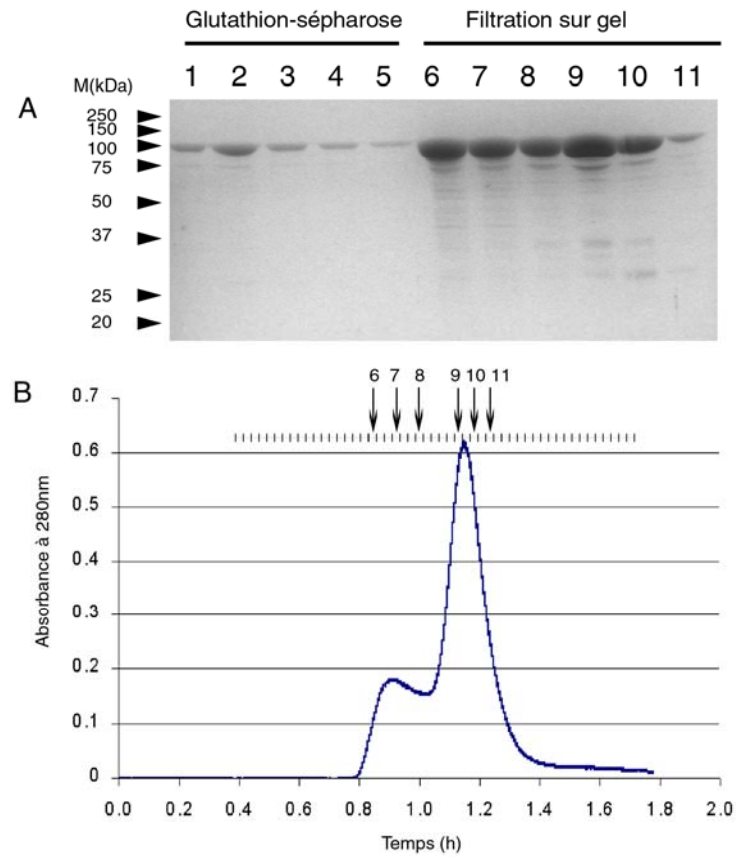
### II.1 Souche et conditions d'expression

La souche d'expression qui a été utilisée est MC1061. Les cellules contenant les différents vecteurs pGex-4T1-f1-*pbp1a*\* ont été cultivées dans du milieu d'auto-induction (Studier, 2005). Un litre de milieu contenant 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'ampicilline a été inoculé avec 30 ml d'une préculture et placé à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant 3 h. Ensuite cette culture a été placée à 20°C sous agitation (250 rpm) pendant 21 h pour l'induction et l'expression de la protéine recombinante.

### II.2 Purification des protéines

Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot a ensuite été repris dans 80 ml de tampon 50 mM Tris pH 8,0, NaCl 0,2 M, CHAPS 1% contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche Diagnostics). Les cellules en suspension ont été lysées par sonication alternante pendant une durée totale de 2 min (Vibra cell, Bioblock Scientific). Le lysat a finalement été centrifugé à 41000 g pendant 30 min à 4°C avant d'être chargé sur la première colonne chromatographique.

La purification a été faite en deux étapes. Tout d'abord, le lysat a été chargé sur une colonne de Glutathion-Sépharose 4B d'environ 5 ml (Amersham). Après un lavage avec 50 ml de 50 mM Tris pH 8,0, NaCl 0,2 M, CHAPS 1% (50 min), la protéine a été éluée par 50 ml de 50 mM Tris pH 8,0, NaCl 0,2 M, glutathion réduit 10 mM (Sigma). Ces 50 ml ont ensuite été concentrés 10 fois sur une membrane de filtration Amicon 30 KDa (Millipore) et injectés sur une colonne de filtration sur gel préparative Superdex 200 (Amersham). La protéine a été éluée avec un tampon 10 mM sodium phosphate pH 7,0, KCl 0,2 M et est sortie de la colonne en deux pics, dont le premier correspond à une forme agrégée et le second à une forme monomérique. L'identité et l'homogénéité ont été vérifiées par spectrométrie de masse et par gel SDS-PAGE (figure 21). Les protéines ont une masse apparente de 100 kDa. Selon les protéines, le rendement de purification par litre de culture a varié entre 4 et 12 mg.



**Figure 21 : Purification de R6-PBP1\*-GST.**

(A) Analyse des fractions des éluats des deux étapes de purification par SDS-PAGE (12,5%). Chaque puits correspond à une fraction. Dix  $\mu\text{l}$  de chaque fraction ont été déposés sur le gel. Les puits 1 à 5 correspondent à 5 fractions de l'éluat de la purification sur la colonne glutathion-séparation répartis entre 1 et 48 ml. Les puits 6 à 11 correspondent aux éluats de la purification par filtration sur gel repérés sur le profil d'éluat représenté en (B). L'injection de l'échantillon a été réalisée au temps 0 h. M : marqueur de masses moléculaires. Débit: 1ml/min.

### III Détermination de l'efficacité d'acylation

#### III.1 La fluorescence intrinsèque

Les protéines possèdent une fluorescence intrinsèque principalement produite par le fluorophore tryptophane. La liaison des  $\beta$ -lactamines sur les PBPs provoque un changement conformationnel qui induit une diminution de la fluorescence intrinsèque de ces protéines (Nieto et al., 1973; Frere et al., 1975; Jamin et al., 1991). Dans PBP2x cette fluorescence est due au tryptophane 374 et dans PBP1a au tryptophane 411 (O. Dideberg, communication orale).

#### III.2 Instrumentation et conditions expérimentales

En raison de la rapidité de la réaction, un appareil de cinétique rapide couplé à un spectrofluorimètre (SFM4 Biologic) a été utilisé. Les seringues de cet instrument sont pilotées par un ordinateur et le temps mort est de 3 ms. Le système constitué par les seringues, les mélangeurs et les tuyaux est situé dans une enceinte thermostatée à 37°C (figure 22). La longueur d'onde d'excitation était de 280 nm et l'émission de fluorescence a été enregistrée dans une fenêtre de 305-360 nm. La concentration de la protéine a été fixée à 0.6  $\mu$ M et les concentrations de céfotaxime (Sigma) et de pénicilline G (Sigma) variaient entre 50 et 1000  $\mu$ M.

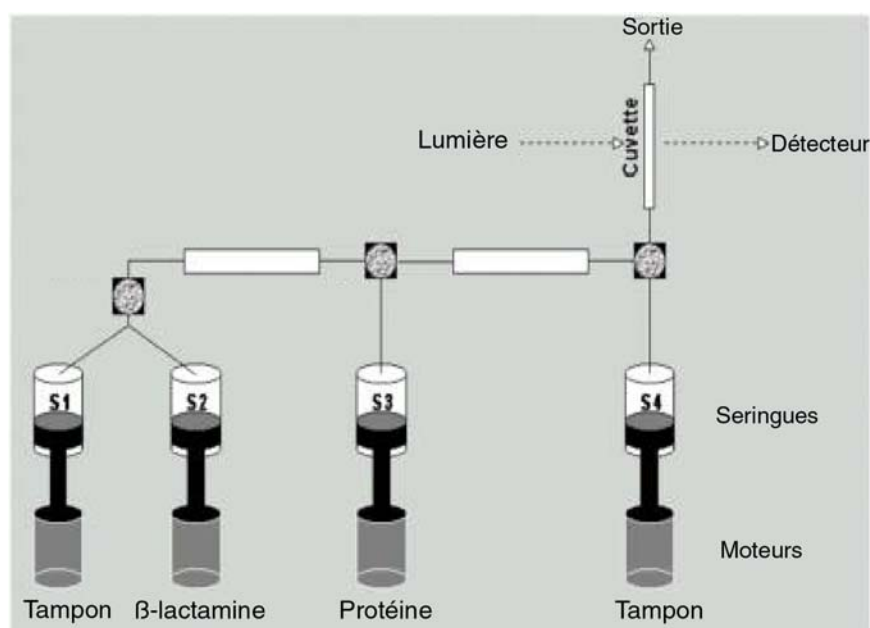
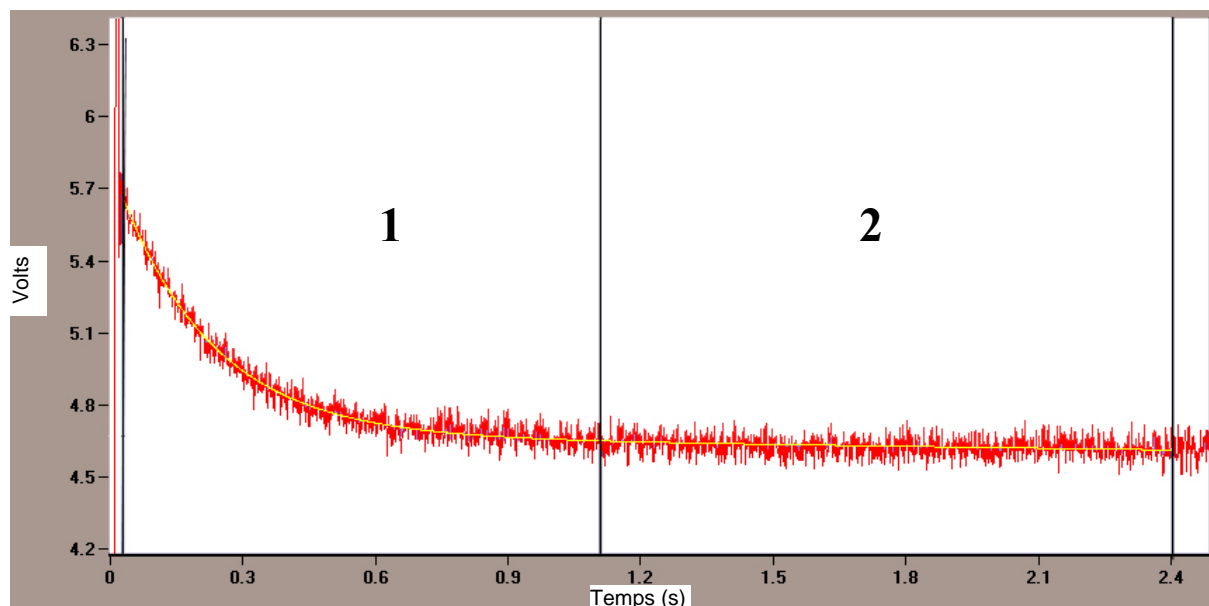


Figure 22 : Schéma d'un spectrofluorimètre couplé à un appareil de cinétique rapide.

### III.3 Traitement des données

Les courbes de décroissance de fluorescence décrivent une exponentielle (figure 23).



**Figure 23 : Exemple d'atténuation de fluorescence de PBP1a par le céfotaxime.**

Il s'agit de la protéine R6-PBP1a\*-GST à 0,6  $\mu\text{M}$  en présence de 500  $\mu\text{M}$  de céfotaxime à 37°C. La figure est issue du logiciel Biokine (Bio-Logic). Les points expérimentaux sont représentés par la courbe rouge. Les lignes noires délimitent les deux fenêtres d'analyses (1 et 2). Le trait jaune correspond à la courbe théorique.

Les courbes ont été analysées à l'aide du programme de traitement des données Biokine (Bio-Logic). L'équation qui décrit l'exponentielle est la suivante :

$$y = at + b + ce^{-kt}$$

où  $a$  représente la pente de l'asymptote,  $b$  son ordonnée à l'origine,  $c$  décrit l'amplitude de l'exponentielle et  $k$  sa constante de vitesse. La valeur de  $a$  est généralement très proche de 0.

On définit deux fenêtres pour ajuster les données à l'équation. La première recouvre la partie exponentielle de la courbe et la seconde la partie asymptotique. Le modèle d'affinement Simplex est utilisé pour analyser les données. Ce dernier procède par itération pour minimiser l'écart entre la courbe théorique et les points expérimentaux. La constante de vitesse  $k$  obtenue est appelée constante de vitesse apparente ( $k_{app}$ ). En reportant les valeurs de  $k_{app}$  mesurées en fonction des concentrations en  $\beta$ -lactamines utilisées, l'efficacité d'acylation  $k_2/K$  peut être déterminée suivant la formule :

$$k_2/K = k_{app} / [\text{antibiotique}]$$

## **IV Caractérisation phénotypique de *S. pneumoniae***

### **IV.1 Transformation de *S. pneumoniae* R6**

Les transformations ont été réalisées selon le protocole présenté dans la publication n° II. Etant donné qu'une PBP1a mosaïque seule ne confère pas de résistance aux  $\beta$ -lactamines (Smith et al., 1998), les gènes de *pbp1a* ont été co-transformés avec le gène *pbp2x* de la souche 5204.

### **IV.2 Détermination de concentrations minimales inhibitrices**

Les mesures de CMI ont été réalisées d'après le protocole présenté dans la publication n° II. En quelques mots : une bandelette E-test<sup>®</sup> (AB Biodisk) a été déposée sur une gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de mouton sur laquelle a préalablement été étalée une suspension bactérienne. Après 18-24 h d'incubation, la CMI a été déterminée par la lecture de la concentration à l'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la graduation de la bandelette E-test<sup>®</sup>.

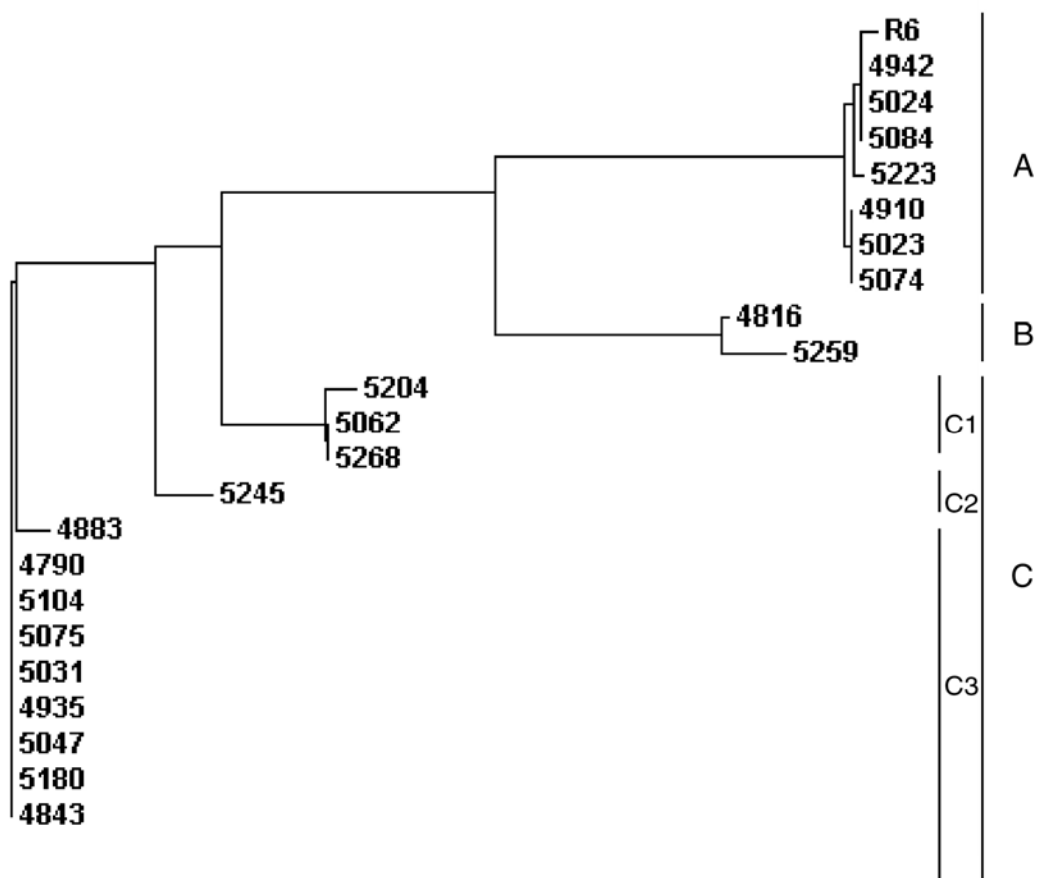


## Résultats et Discussion

### I Les PBP1a de souches cliniques résistantes de *S. pneumoniae*

#### I.1 Classification des séquences de PBP1a

Nous disposons de 22 séquences de domaines TP de PBP1a isolées au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble (Chesnel et al., 2005). Elles sont classées en trois groupes A (8 séquences, dont 4 différentes), B (2 séquences) et C (13 séquences, dont 5 différentes) suivant leur degré de similarité de séquence. Le groupe C est divisé en trois sous-groupes C1 (3 séquences), C2 (1 séquence) et C3 (9 séquences) (figure 24).



**Figure 24 :** Arbre représentant le degré de similarité entre les séquences des domaines TP de PBP1a de 22 souches cliniques et de la souche R6. Cet arbre a été construit avec le logiciel d'alignement de séquences ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). En raison de la mosaïcité, cette représentation n'a pas de signification phylogénétique.

D'après les valeurs seuils déterminées par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, les souches du groupe A sont sensibles aux  $\beta$ -lactamines (CMI pour la pénicilline G inférieures à  $0,06 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ), celles du groupe B sont intermédiaires (CMI pour la pénicilline G comprises entre  $0,12$  et  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) et celles du groupe C sont résistantes (CMI pour la pénicilline G supérieures à  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ).

Un membre de chaque groupe a été choisi pour l'étude détaillée du rôle de PBP1a dans le phénomène de résistance. Les séquences choisies pour les groupes A, B, C1, C2 et C3 sont respectivement celles des souches R6, 5259, 5204, 5245 et 4790.

## I.2 Comparaison des séquences des différents groupes

L'alignement multiple des cinq séquences de domaines TP des souches choisies est représenté dans la figure 25.

La séquence R6 est représentative du groupe A de séquences de souches sensibles. C'est la référence pour l'interprétation des mutations.

Les séquences 4790, 5204 et 5245 font partie du groupe C. Elles sont très proches et présentent respectivement 41, 42 et 48 substitutions par rapport à la séquence R6. Elles contiennent toutes les trois les mutations T371A et T(574)SQF→NTGY précédemment décrites comme importantes pour le phénomène de résistance (en jaune dans la figure 25) (Smith et al., 1998; Smith et al., 2003). Seul un groupe de 6 acides aminés à la fin du domaine TP (entre les résidus 628 et 641) différencie les séquences 5204 et 5245. Dans la séquence 5204, ces 6 résidus sont identiques à ceux trouvés dans la séquence R6. Les séquences 4790 et 5245 diffèrent par un groupe de 10 résidus dans la région 495-570.

La séquence 5259 contient au total 36 substitutions dans le domaine TP. Celles-ci sont caractéristiques du groupe B et diffèrent des mutations présentes dans les séquences du groupe C. On note l'absence des mutations T371A et T(574)SQF→NTGY. 25 substitutions sont tout de même communes aux groupes B et C. Ceci suggère l'existence de plusieurs mécanismes de diminution d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines qui peuvent être cumulés (groupe C).

R6	SASNYPAYMDNYLKEVINQVEEETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNTDEYVAYP	323
5259	SVNSYPAYMDNYLKEVIDQVEQETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNSDQYVSYP	
4790	SASNYPAYMDNYLKEVINQVEQETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNSDQYVSYP	
5204	SASNYPAYMDNYLKEVINQVEQETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNSDQYVSYP	
5245	SASNYPAYMDNYLKEVINQVEQETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNSDQYVSYP	
	*	
R6	DDELQVASTIVDVSNGKVIAQLGARHQSSNVSFGINQAVETNRDWGSTMKPIITDYAPALE	383
5259	DDDLQVASTVVDVSNGKVIAQLGARHQASNVSFGTINQAVETNRDWGSTMKPIITDYAPAIE	
4790	DDDLQVASTVVDVSNGKVIAQLGARHQASNVSFGTINQAVETNRDWGSAMKPIITDYAPAIE	
5204	DDDLQVASTVVDVSNGKVIAQLGARHQASNVSFGTINQAVETNRDWGSAMKPIITDYAPAIE	
5245	DDDLQVASTVVDVSNGKVIAQLGARHQASNVSFGTINQAVETNRDWGSAMKPIITDYAPAIE	
R6	YGVYESTATIVHDEPYNYPGTNTPVYNWDRGYFGNITLQYALQQSRNVPAVETLNKVGLN	443
5259	YGVYDSTATMVNDIPYNYPGTSTPVYNWDRAYFGNITLQYALQQSRNVPAVETLNKVGLD	
4790	YGVYDSTATMVNDIPYNYPGTSTPVYNWDRAYFGNITLQYALQQSRNVTAVETLNKVGLD	
5204	YGVYDSTATMVNDIPYNYPGTSTPVYNWDRAYFGNITLQYALQQSRNVTAVETLNKVGLD	
5245	YGVYDSTATMVNDIPYNYPGTSTPVYNWDRAYFGNITLQYALQQSRNVTAVETLNKVGLD	
R6	RAKTFLNGLGIDYPSIHYSNAISSNTTESDKKYGASSEKMAAAAYAAFANGGTYYKPMYIH	503
5259	RAKNFLNGLGIDYDPMHYSNAISSNTTESNKQYGASSEKMAAAAYAAFANGGIYHKPMYIN	
4790	RAKTFLNGLGIDYPSMHYANAISSNTTESNKQYGASSEKMAAAAYAAFANGGTYYKPMYIH	
5204	RAKTFLNGLGIDYPSMHYANAISSNTTESNKQYGASSEKMAAAAYAAFANGGIYHKPMYIN	
5245	RAKTFLNGLGIDYPSMHYANAISSNTTESNKQYGASSEKMAAAAYAAFANGGIYHKPMYIN	
R6	KVVFSDGSEKEFSNVGTRAMKETTAYMMTDMMKTVLSYGTGRNAYLAWLPQAGKTGTSNY	563
5259	KIVFSDGSEKEFS DAGTRAMKETTAYMMTEMMKTVLSYGTGRNAYLAWLPQAGKTGTSNY	
4790	KVVFSDGSKKEFSNVGTRAMKETTAYMMTDMMKTVLTYGTGRGAYLPWLPQAGKTGTSNY	
5204	KVVFSDGSKKEFS DVGTRAMKETTAYMMTEMMKTVLAYGTGRGAYLPWLAQAGKTGTSNY	
5245	KVVFSDGSKKEFS DVGTRAMKETTAYMMTEMMKTVLAYGTGRGAYLPWLAQAGKTGTSNY	
R6	TDEEIEENHIKTSQFVAPDELFAGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPLVGNGLTVAAKVYRSMMT	623
5259	TDEEIEENHIKTSQFVAPDELFAGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPLVGNGLTVAAKVYRSMMT	
4790	TDEEVENHIKNTGYVAPDEMFGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPIVGDGFLVAAKVYRSMIT	
5204	TDDEIEKHIKNTGYVAPDEMFGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPIVGDGFLVAAKVYRSMIT	
5245	TDDEIEKHIKNTGYVAPDEMFGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPIVGDGFLVAAKVYRSMIT	
R6	YLSEGSNPEDWNIPEGLYRNGEFVFKNGARS	654
5259	YLSEGSNPEDWNIPEGLFRNGAFVFTNAARS	
4790	YLSEDPEDWTMPDGLFRNGEFVFKNGARP	
5204	YLSEGSNPEDWNIPEGLYRNGEFVFKNGARS	
5245	YLSEDPEDWTMPDGLFRNGEFVFKNGARS	

**Figure 25 : Alignement multiple des séquences des domaines TP des souches R6, 5259, 4790, 5204 et 5245.** Les trois motifs catalytiques sont encadrés. Les acides aminés substitués par rapport à la séquence de R6 sont grisés. Les deux mutations précédemment décrites dans le cadre de la résistance sont marquées en jaune. La sérine 370 active est identifiée par un astérisque.

## I.3 Caractérisation d'une PBP1a de chaque groupe

### I.3.1 Caractérisation fonctionnelle

Les efficacités d'acylation pour les cinq PBP1a\*-GST des souches R6, 5259, 4790, 5204 et 5245 ont été déterminées (tableau 4).

PBP1a*-GST	$k_2/K$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	
	Céfotaxime	Pénicilline G
R6	11000 ± 700	69200 ± 14750
5259	4000 ± 550	8640 ± 570
4790	700 ± 10	820 ± 160
5204	480 ± 7	430 ± 110
5245	440 ± 40	420 ± 90

**Tableau 4 : Efficacités d'acylation pour le céfotaxime et la pénicilline G de PBP1a\*-GST de cinq souches de *S. pneumoniae*.**

Les réactions ont été réalisées dans un tampon 10 mM sodium phosphate pH 7, 0,2 M KCl à 37°C. Les valeurs sont données avec les erreurs standards calculées à partir de deux expériences indépendantes d'au moins 5 mesures de  $k_{app}$  chacune.

Les protéines des souches cliniques ont des  $k_2/K$  diminués de facteur 3 à 25 pour le céfotaxime et 8 à 165 pour la pénicilline G. Ainsi, les modifications des PBP1a étudiées ont un effet plus important sur la réaction avec la pénicilline G. La classification des souches selon les valeurs de  $k_2/K$  est cependant la même pour la pénicilline G et le céfotaxime. Parmi les souches sélectionnées, il n'y en a donc pas ayant acquis un mécanisme de résistance impliquant une PBP1a ayant une affinité spécifiquement affaiblie à une des deux classes de  $\beta$ -lactamines.

Les efficacités d'acylation de 5204-PBP1a\*-GST et de 5245-PBP1a\*-GST ne sont pas significativement différentes. Etant donné que la séquence de 5245-PBP1a\*-GST a uniquement 6 mutations supplémentaires par rapport à 5204-PBP1a\*-GST, les substitutions G628D, S629T, N630H, N635T, I636M et Y641F n'ont pas d'effet sur la diminution de l'efficacité d'acylation de PBP1a pour le céfotaxime et la pénicilline G.

Les  $k_2/K$  de 5245-PBP1a\*-GST pour le céfotaxime et la pénicilline G sont respectivement 1,6 et 2 fois plus faibles que ceux de 4790-PBP1a\*-GST. En admettant que les mutations divergentes de ces deux souches en dehors du domaine TP n'ont pas de rôle dans la diminution de l'efficacité d'acylation, les 10 mutations de la région 495-570 présentes dans

5245-PBP1a\* et absentes dans 4790-PBP1a\* sont responsables de la faible différence de  $k_2/K$  observée.

### I.3.2 Caractérisation phénotypique

Pour pouvoir observer l'effet des gènes *pbp1a*\* modifiés sur la résistance, les différents gènes mutés ont été co-transformés avec 5204-*pbp2x*\*. L'influence des mutations des PBP1a des 5 souches étudiées sur la résistance des bactéries est directement corrélée avec celle sur l'efficacité d'acylation (tableau 5). Ainsi, les PBP1a ayant les  $k_2/K$  les plus faibles permettent à R6 *S. pneumoniae* d'atteindre les niveaux de résistance les plus forts. Inversement, les PBP1a ayant les efficacités d'acylation les plus fortes provoquent les CMI les plus faibles.

<i>pbp1a</i> transformée	CMI ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
R6	0,25
5259	0,38
4790	0,75
5204	1
5245	1

**Tableau 5 : CMI de *S. pneumoniae* R6 co-transformée avec le gène 5204-*pbp2x*\* et différents gènes de *pbp1a*\* pour le céfotaxime.** La CMI de *S. pneumoniae* R6 est inférieure à  $0,016 \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

## II Rôle des mutations T371A et T(574)SQF→NTGY

Dans ce paragraphe, une étude des mutations T371A et T(574)SQF→NTGY de PBP1a est décrite. Ces deux groupes de mutations ont été mis en évidence par Smith et al. en mesurant les CMI de *S. pneumoniae* R6 transformées avec des gènes de *pbp1a* d'une souche résistante (3191) desquels ces mutations avaient été revertées une à une ou par groupes vers les acides aminés codés par R6-*pbp1a*. Pour voir l'effet des mutations de PBP1a, les bactéries avaient préalablement été transformées avec des gènes *pbp2x* et *pbp2b* mosaïques de la souche résistante 3191 (Smith et al., 1998; Smith et al., 2003).

Dans notre cas, six PBP1a\*-GST mutées ont été créées. Il s'agit des protéines R6-PBP1a\*-GST et 5204-PBP1a\*-GST qui ont été mutées au niveau de deux positions 371 et 574-577 (tableau 6).

		371	574-577
R6- PBP1a*- GST	1	T→A	
	2		TSQF→NTGY
	3	T→A	TSQF→NTGY
5204- PBP1a*- GST	4	A→T	
	5		NTGY→TSQF
	6	A→T	NTGY→TSQF

**Tableau 6 : Mutagenèse dirigée de R6-PBP1a\*-GST et 5204-PBP1a\*GST.**

La première ligne indique les positions des mutations. Les résidus à gauche de la flèche sont les acides aminés à muter et ceux à droite les acides aminés intégrés à leur place. Les mutants 1 à 3 et 4 à 6 sont respectivement des variants de R6-PBP1a\*-GST et de 5204-PBP1a\*-GST.

L'effet des mutations sur le niveau de résistance des pneumocoques et sur l'efficacité d'acylation de PBP1a pour le céfotaxime et la pénicilline G dans le contexte de la séquence de R6 et de la séquence de la souche clinique résistante 5204 a été analysé et quantifié.

## II.1 Rôle des mutations *in vitro*

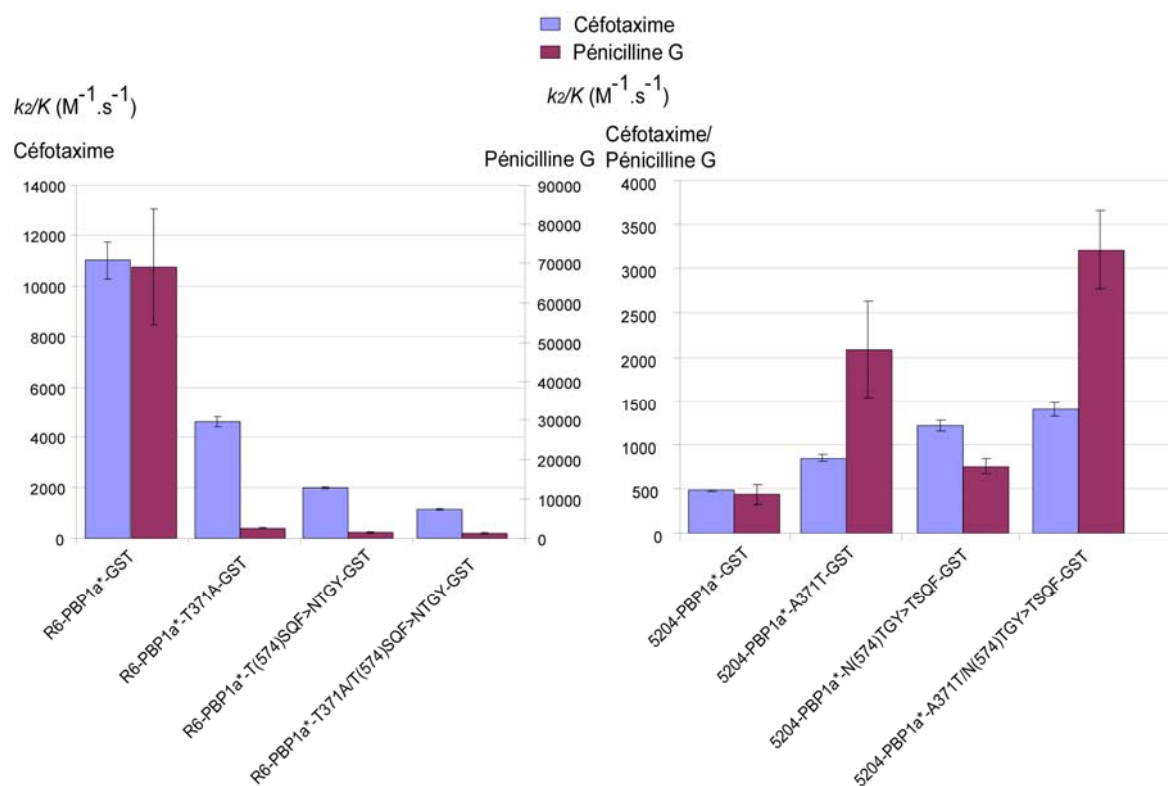
Les efficacités d'acylation des six PBP1a\*-GST mutées ont été déterminées et comparées à celles des PBP1a\*-GST des souches R6 et 5204 (tableau 7).

R6-PBP1a*-GST	$k_2/K$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	
	Céfotaxime	Pénicilline G
sauvage	11000 ± 700	69200 ± 14750
T371A	4600 ± 210	2640 ± 150
T(574)SQF→NTGY	1995 ± 40	1420 ± 210
T371A / T(574)SQF→NTGY	1140 ± 30	1330 ± 145
<b>5204-PBP1a*-GST</b>		
sauvage	480 ± 7	430 ± 110
A371T	850 ± 30	2080 ± 550
N(574)TGY→TSQF	1210 ± 60	750 ± 90
A371T / N(574)TGY→TSQF	1400 ± 80	3200 ± 440

**Tableau 7 : Efficacités d'acylation de mutants de R6-PBP1a\*-GST et de 5204-PBP1a\*-GST pour le céfotaxime et la pénicilline G.**

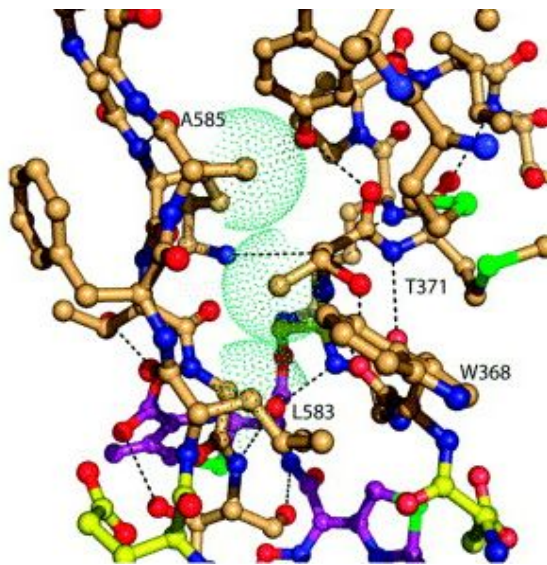
Les réactions ont été réalisées dans un tampon 10 mM sodium phosphate pH 7, 0,2 M KCl à 37°C. Les valeurs sont données avec les erreurs standards calculées à partir de deux expériences indépendantes d'au moins 5 mesures de  $k_{app}$  chacune.

Pour plus de clarté, les efficacités d'acylation pour les différents mutants de R6-PBP1a\*-GST et 5204-PBP1a\*-GST sont représentées sous forme d'histogramme dans la figure 26.



**Figure 26 :** Représentation graphique des efficacités d'acylation de mutants de R6-PBP1a\*-GST et de 5204-PBP1a\*-GST pour le céfotaxime et la pénicilline G du tableau 7.

La mutation T371A provoque une forte baisse de l'efficacité d'acylation de R6-PBP1a\*-GST. Le  $k_2/K$  de R6-PBP1a\*-T371A-GST est respectivement diminué d'un facteur 2,4 et 26 pour le céfotaxime et la pénicilline G par rapport à celui de R6-PBP1a\*-GST. Inversement, l'efficacité d'acylation de 5204-PBP1a\*-A371T-GST est respectivement 1,8 et 4,8 fois plus importante pour le céfotaxime et la pénicilline G par rapport à celle de 5204-PBP1a\*-GST. La substitution T371A est presque exclusivement présente dans les souches fortement résistantes (Smith et al., 1998). Dans la structure tridimensionnelle du domaine TP de R6-PBP1a, le groupement OH ( $O^{\gamma}$ ) de la T371 établit une liaison hydrogène avec le carbonyle de la chaîne principale du W368 et intervient directement dans la stabilisation de l'hélice  $\alpha_2$  sur laquelle se trouve la S370 active. De plus, le groupement CH<sub>3</sub> ( $C^{\gamma_2}$ ) de la T371 est dans une région hydrophobe de la protéine composée par les chaînes latérales des résidus W368, L583 et A585. La mutation T371A provoque probablement une déstabilisation de cette région hydrophobe et un déplacement de l'hélice  $\alpha_2$  ayant pour conséquence une réorientation de la S370 active (figure 27).



**Figure 27 : Environnement structural de la T371 dans R6-PBP1a.**

Les résidus ayant un caractère hydrophobe sont représentés en beige, les résidus polaires en jaune et le céfotaxime en violet. Les surfaces de Van der Waals des résidus T371, L583 et A585 sont marquées par des points. (Contreras-Martel et al., 2006).

Les substitutions au niveau des résidus 574 à 577 sont toujours mutées en bloc dans les séquences de souches cliniques (Smith et al., 1998; Smith et al., 2003). L'effet de ce groupe de substitutions sur l'efficacité d'acylation est globalement plus important que celui de la mutation T371A. Ainsi, le  $k_2/K$  diminue d'un facteur 5,5 et 49 respectivement pour le céfotaxime et la pénicilline G quand on intègre les mutations T(574)SQF→NTGY dans R6-PBP1a\*-GST. Inversement, les mutations réverses N(574)TGY→TSQF provoquent une augmentation du  $k_2/K$  de 5204-PBP1a\*-GST de facteurs 2,5 et 1,7 respectivement pour le céfotaxime et la pénicilline G. Notons que pour la pénicilline G l'effet de cette réversion est moins important que celui de la réversion en position 371. Le groupe 574-577 se trouve entre les brins  $\beta 3$  et  $\beta 4$ . Le résidu F577 est impliqué dans la formation d'une paroi hydrophobe qui ferme une région allongée de type « tunnel » dans laquelle se trouve le site actif. Les quatre mutations en positions 574-577 changent probablement les caractéristiques de l'entrée du tunnel en modifiant sa polarité. Comme les  $\beta$ -lactamines sont chargées négativement, ce changement de polarité et de topologie de l'entrée du site actif peut affecter la réactivité avec l'antibiotique (Contreras-Martel et al., 2006).

L'effet des deux mutations T371A et T(574)SQF→NTGY sur l'efficacité d'acylation est additif pour les deux antibiotiques testés. L'influence globale des deux mutations peut être quantifiée par le rapport des facteurs de diminution du  $k_2/K$  entre d'une part R6-PBP1a\*-GST et R6-PBP1a\*-T371A/T(574)SQF→NTGY-GST et d'autre part entre R6-PBP1a\*-GST et 5204-PBP1a\*-GST. Ce rapport donne le pourcentage de diminution de l'efficacité d'acylation dû aux deux mutations en question. En appliquant cette formule aux résultats des mesures réalisées, on peut affirmer que les deux mutations T371A et T(574)SQF→NTGY sont



responsables de 42% et 32% de la diminution d'affinité de PBP1a\* pour respectivement le céfotaxime et la pénicilline G. L'effet résiduel est probablement dû à d'autres substitutions. En comparant les mutations préalablement analysées par Smith et al. et celles présentes dans les souches cliniques résistantes 4790, 5204 et 5245, ainsi qu'en tenant compte des mutations exclues du phénomène de résistance par l'analyse des séquences en I.2, il ne reste que les substitutions en positions 462, 512, 611 et 622 qui pourraient expliquer l'effet résiduel sur la résistance. Parmi ces positions, la L611 est particulièrement intéressante car elle est située dans un « hot-spot » de mutations qui englobe la fin de l'hélice  $\alpha 11$  et qui est proche de la boucle entre les brins  $\beta 3$  et  $\beta 4$ .

## II.2 Rôle des mutations *in vivo*

La souche *S. pneumoniae* R6 a été co-transformée avec le gène *pbp2x\** de la souche 5204 et les différents gènes *pbp1a\** mutés. Les valeurs de CMI sont reportées dans le tableau 8.

	CMI ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
<b>R6-<i>pbp1a*</i></b>	
sauvage	0.25
T371A	nt
T(574)SQF→NTGY	nt
T371A / T(574)SQF→NTGY	0.38
<b>5204-<i>pbp1a*</i></b>	
sauvage	1
A371T	0.5
N(574)TGY→TSQF	0.75
A371T / N(574)TGY→TSQF	0.5

**Tableau 8 : CMI de *S. pneumoniae* R6 co-transformée avec le gène 5204-*pbp2x\** et différents gènes de *pbp1a\** pour le céfotaxime.** nt : aucun transformant ayant une CMI plus élevée que les transformants ayant intégré 5204-*pbp2x\** seul n'a pu être isolé. La CMI de *S. pneumoniae* R6 est inférieure à 0,016  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

L'introduction des mutations T371A ou T(574)SQF→NTGY seule dans R6-PBP1a *in vivo* n'a pas conféré de niveau de résistance assez élevé pour permettre une sélection. Par contre la combinaison de ces deux mutations permet au pneumocoque d'atteindre une CMI de 0,38.

Les mutations réverses A371T et N(574)TGY→TSQF dans 5204-PBP1a induisent une augmentation de la sensibilité des pneumocoques au céfotaxime respectivement d'un facteur 2 et 1,3. Contrairement aux efficacités d'acylation, l'effet sur la résistance de la mutation A371T (CMI=0,5 µg.ml<sup>-1</sup>) est plus important que celui de la mutation N(574)TGY→TSQF (CMI=0,75 µg.ml<sup>-1</sup>). Ceci est probablement dû au fait que *in vivo*, il y a d'autres facteurs tels que les interactions avec d'autres protéines qui influent sur le niveau de résistance observé. De plus, les différences d'effets sur l'acylation et la résistance sont très faibles. La combinaison des deux mutations A371T et N(574)TGY→TSQF dans 5204-PBP1a provoque une diminution de la CMI de 1 à 0,5 µg.ml<sup>-1</sup>. Ce niveau est le même que celui atteint avec la mutation A371T seule. Mais en raison du manque de précision de la lecture des bandelettes E-tests utilisées pour les mesures, un effet additif faible n'est pas exclu.

### III Rôle des mutations de PBP1a externes au domaine TP

Il a toujours été assumé que les mutations en dehors du domaine TP ne jouent pas de rôle dans la diminution de l'efficacité d'acylation. En alignant la séquence du domaine TP des souches 4790 et 5245, on observe que seul un groupe de 10 mutations entre les résidus 495 et 570 et le dernier acide aminé du domaine TP les différencie (figure 28). Les acides aminés de la région 495 à 570 dans la souche 4790 sont identiques à ceux de la souche sensible R6.

4790	SASNYPAYMDNYLKEVINQVEQETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNSDQYVSYP	324
5245	SASNYPAYMDNYLKEVINQVEQETGYNLLTTGMDVYTNVDQEAQKHLWDIYNSDQYVSYP	
4790	DDDLQVASTVVDVSNQKVIQALGARHQASNVSFQGTNQAVETNRDWGSAMKPIITDYAPAI E	384
5245	DDDLQVASTVVDVSNQKVIQALGARHQASNVSFQGTNQAVETNRDWGSAMKPIITDYAPAI E	
4790	YGVYDSTATMVNDIPYNYPGTSTPVYNWDRAYFGNITLQYALQQSRNVTAVETLNKVGLD	444
5245	YGVYDSTATMVNDIPYNYPGTSTPVYNWDRAYFGNITLQYALQQSRNVTAVETLNKVGLD	
4790	RAKTFLNGLGIDYPSMHYANAISNTTESNKQYGASSEKMAAAAYAAFANGGIYHKPMYIN	504
5245	RAKTFXNGLGIDYPSMHYANAISNTTESNKQYGASSEKMAAAAYAAFANGGTYYKPMYIH	
4790	KVVFSDGSKKEFS <u>DVGTRAMKETTAYMMTEMMKTVLAYGTGRGAYLPWLAQAGKTGTSNY</u>	564
5245	<u>KVVFSDGSKKEFSNVGTRAMKETTAYMMTDMMKTVLTYGTGRGAYLPWLPQAGKTGTSNY</u>	
4790	<u>TDDEIEKHIKNTGYVAPDEMFGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPIVGDGFLVAAKVYRSMIT</u>	624
5245	<u>TDEEVENHIKNTGYVAPDEMFGYTRKYSMAVWTGYSNRLTPIVGDGFLVAAKVYRSMIT</u>	
4790	YLSedthpedwtmpdglfrngefvfknGARP	655
5245	YLSedthpedwtmpdglfrngefvfknGARS	

**Figure 28 : Alignement des séquences des domaines TP des souches 4790 et 5245.**

Les différences entre les séquences sont grisées. La partie du domaine TP de 5245 qui a été intégrée dans le domaine TP de 4790 est soulignée.

En effectuant un échange de la région 495-570 entre 5245-PBP1a\*-GST et 4790-PBP1a\*-GST, nous avons créé une protéine hybride swap4790-PBP1a\*-GST qui a un domaine TP strictement identique à 5245-PBP1a\*-GST excepté pour la position 355. Entre swap4790-PBP1a\*-GST et 5245-PBP1a\*-GST, il y a 14 positions différentes en dehors du domaine TP, dont 4 se trouvent sur le domaine GT allant du résidu 37 à 263 et 10 sur le domaine C-terminal allant de l'acide aminé 656 à 719 (figure 29). L'étude de swap4790-PBP1a\*-GST nous a permis de déterminer le rôle des mutations externes au domaine TP.

R6	SLSESKLVASTSSKIYDNKNQLIADLGSERRVNAQANDIPTDLVKAIIVSIEDHRFFDHRG	97
4790	NLSESKLVATTSSKIYDNKNQLIADLGSERRVNAQANDIPTDLVKAIIVSIEDHRFFDHRG	
5245	SLSESKLVASTSSKIYDNKNQLIADLGSERRVDAQANDIPTDLVKAIIVSIEDHRFFDHRG	
R6	IDTIRILGAFLRNLQSNLQGGSAALTQQLIKLTYFSTSTSDQTISRKAQEAWLAIQLEQK	157
4790	IDSIRILGAFLRNLQSNLQGGSTLTQQLIKLTYFSTSTSDQTISRKAQEAWLAIQLEQK	
5245	IDSIRILGAFLRNLQSNLQGGESTLTQQLIKLTYFSTSTSDQTISRKAQEAWLAIQLEQK	
R6	ATKQEILTYIYINKVYMSNGNYGMQTAAQNYGKDLNLSLPQLALLAGMPQAPNQYDPYS	217
4790	ATKQEILTYIYINKVYMSNGNYGMQTAAQNYGKDLNLSLPQLALLAGMPQAPNQYDPYS	
5245	ATKQEILTYIYINKVYMSNGNYGMQTAAQNYGKDLNLSLPQLALLAGMPQAPNQYDPYS	
R6	HPEAAQDRRNLVLSEMKNQGYISAEQYEKAVNTPITDGLQSLK-----TP-----TWSSP	659
4790	HPEAAQDRRNLVLSEMKNQGYISAEQYEKAVNTPITDGLQSLK-----TP-----TWTEP	
5245	HPEAAQDRRNLVLSEMKNQGYISAEQYEKAVNTPITDGLQSLK-----TP-----TWNSP	
R6	APQQPPSTESSSSSSDSSTSQSSSTTPSTNNSTTTNPNNTQQSNTTPDQQNQNPQPAQP	719
4790	STQQSSTAESSSSSSDSSTSQSSSTTPSTNNSTTTNPNNTQQSNTTPDQQNQNPQPAQP	
5245	APQQPPSTESSSSSSDSSTSQSSSTTPSTNNSTTTNPNNTQQSNTTPDQQNQNPQPAQP	

**Figure 29 : Alignement des régions externes aux domaines TP de R6-PBP1a\*, 4790-PBP1a\* et 5245-PBP1a\*.** L'alignement recouvre toute la zone clonée (résidu 37 à 719). La zone identifiée par des tirets et marquée TP représente le domaine TP. Les différences entre les séquences des deux souches résistantes 4790 et 5245 sont grisées.

L'efficacité d'acylation de swap4790-PBP1a\*-GST pour le céfotaxime et la pénicilline G est respectivement de  $405 \pm 62 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et de  $440 \pm 90 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles de la protéine 5245-PBP1a\*-GST ( $440 \pm 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $420 \pm 90 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour respectivement le céfotaxime et la pénicilline G)

La CMI de *S. pneumoniae* R6 co-transformé avec 5204-*pbp2x\** et swap4790-*pbp1a\** est de  $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ce qui est équivalent à celle obtenue après co-transformation avec 5204-*pbp2x\** et 5245-*pbp1a\**.

De ces observations, on peut conclure que les 14 mutations en dehors du domaine TP ne sont pas impliquées dans le phénomène de résistance de *S. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

## **Conclusions et Perspectives**

PBP2x et PBP1a sont deux protéines majeures de la résistance de *S. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines. Dans les souches cliniques résistantes ces protéines ont des dizaines de substitutions d'acides aminés dans leur domaine TP, dont très probablement seulement quelques-unes sont impliquées dans les mécanismes moléculaires de la résistance. Le travail présenté dans ce manuscrit avait pour but de comprendre les détails moléculaires des mécanismes de résistance médiés par PBP2x et PBP1a. Dans cette optique, les mutations pertinentes de PBP2x et PBP1a ont d'abord été identifiées et ensuite leurs rôles dans la résistance ont été caractérisés de manière plus détaillée au niveau phénotypique et biochimique.

### **I Apport de l'automatisation à l'étude du phénomène de résistance**

Pour l'identification des substitutions impliquées dans le phénomène de diminution d'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines, une méthode automatisée permettant de générer et de caractériser facilement un grand nombre de mutants a été mise en place. Ainsi, une collection d'une soixantaine de mutants de 5204-PBP2x ou de R6-PBP2x a été créée. Etant donné qu'une étude exhaustive des mutations de PBP1a avait déjà été réalisée par Smith et al. (Smith et al., 2003), nous nous sommes restreints à PBP2x pour cette étape. Puisque le nombre de mutants réalisés est relativement faible, la méthode automatisée haut-débit n'a pas été utilisée à son potentiel maximal. Mais les protocoles automatisés maintenant disponibles au laboratoire ne sont pas pour autant obsolètes. Ils pourront d'une part être réutilisés pour faire des études analogues sur des PBP2x et des PBP1a de nouvelles souches cliniques résistantes ou sur PBP2b sur lequel nous disposons de peu d'informations biochimiques pour l'instant (Pagliero et al., 2004), et d'autre part pour la réalisation d'autres projets de mutagenèse dirigée à haut-débit. Cet outil permet en effet de réaliser des études exhaustives de nombreuses mutations d'une protéine pour par exemple comprendre des mécanismes réactionnels ou identifier des régions d'interactions. Il constitue une alternative intéressante

aux autres techniques haut-débit actuellement disponibles tels que la mutagenèse par PCR (Wu et al., 2005) ou la mutagenèse massive (Saboulard et al., 2005).

L'inconvénient de cette méthode est la nécessité que la réaction permettant de quantifier l'influence des mutations soit associée à un changement de fluorescence intrinsèque de la protéine ou qu'on dispose d'un test fonctionnel adapté au haut-débit. Dans le cas de PBP2b par exemple, il n'y a pas de changement de fluorescence intrinsèque lié à la réaction avec une  $\beta$ -lactamine. Dans ce cas il faudrait donc inventer un nouveau test fonctionnel. Ce goulot d'étranglement est commun à de nombreuses approches de criblage à haut-débit. La prérogative pour pouvoir faire une étude exhaustive de manière efficace est de disposer d'un test fonctionnel simple, précis et reproductible à la sortie de la chaîne de création des protéines mutées.

## II Deux types de mécanismes de résistance peuvent être combinés

Suite aux résultats de Chesnel et al. (Chesnel, 2003) il a été proposé qu'il existe deux types de mécanismes moléculaires de résistance aux  $\beta$ -lactamines. Le premier correspond à celui qui implique des mutations agissant directement sur la réactivité de la sérine active et le second à celui mettant en jeu des phénomènes de changements conformationnels des PBPs défavorisant l'entrée de l'antibiotique dans le site actif ou indirectement sa liaison avec la sérine active. En comparant les séquences de PBP2x de différentes souches cliniques résistantes, il a été proposé que les séquences des souches cliniques résistantes peuvent être classées en deux groupes. Le premier groupe correspond aux séquences ayant la mutation T338A qui agit directement sur la réactivité de la sérine active et le second groupe est celui ayant la mutation Q552E, dont la présence provoque une diminution d'accessibilité du site actif. Même si, dans des cas rares, les mutations T338A et Q552E sont présentes dans la même séquence, ce résultat indique que l'une ou l'autre des stratégies a été sélectionnée chez le pneumocoque suite à une pression de sélection par les  $\beta$ -lactamines.

Dans ce travail, suite à l'utilisation d'une méthode haut-débit automatisée de mutagenèse, d'expression, de purification et de caractérisation d'enzymes, quatre nouvelles mutations importantes pour la diminution d'affinité de PBP2x pour les  $\beta$ -lactamines ont été identifiées. Ces quatre substitutions, ainsi que deux mutations de PBP1a identifiées par Smith et al. ont été caractérisées de manière détaillée au niveau biochimique et phénotypique. Il s'agit des

mutations I371T, R384G, M400T et N605T pour PBP2x et des mutations T371A et T(574)SQF→NTGY pour PBP1a.

I371T et R384G sont impliquées dans la mobilité d'une boucle structurale de PBP2x. Cette mobilité est le signe d'une déstabilisation de la région 364-395 qui défavorise probablement l'interaction non-covalente de la protéine avec l'antibiotique et/ou affecte la réactivité de la sérine active 337 par un remodelage du site actif dû à la proximité du second motif catalytique S(395)SN. Ce nouveau mécanisme peut être combiné avec les deux autres mécanismes de résistance cités plus haut. Ceci est indiqué par le fait que, dans les séquences de souches cliniques, la mutation R384G peut être associée à T338A ou à Q552E.

Pour résumer, nous pouvons maintenant identifier trois mécanismes de diminution d'affinité de PBP2x par les  $\beta$ -lactamines. Le premier caractérisé par la substitution T338A, et accessoirement M339F, affecterait principalement la réactivité de la sérine active. Le second, caractérisé par la substitution Q552E affecterait l'accessibilité du site actif. Ces deux mécanismes sont principalement distribués dans des souches distinctes. Le troisième mécanisme caractérisé par la substitution R384G ( et accessoirement I371T) affecte la stabilité d'une boucle bordant le site actif et est distribué dans les deux familles correspondant aux deux premiers mécanismes cités ci-dessus.

Dans PBP1a, la mutation T371A semble impliquée dans une réorientation de la sérine active, alors que les mutations T(574)SQF→NTGY affectent probablement l'entrée de l'antibiotique dans le site actif. Dans les souches ayant les deux mutations dans PBP1a, les deux types de mécanismes seraient donc combinés.

### III Généralisation des mécanismes moléculaires de résistance

Les mutations de PBP2x et PBP1a nouvellement identifiées ont été découvertes en analysant toutes les substitutions de souches cliniques particulières. Il s'agit des souches résistantes 5204 (CMI de 6,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et 12,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour respectivement la pénicilline G et le céfotaxime) dans le cas de PBP2x (Carapito et al., 2006), 8303 (CMI de 16,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour la pénicilline G) et 3191 (CMI de 16,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et 4,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour respectivement la pénicilline G et le céfotaxime) dans le cas de PBP1a (Smith et al., 1998 ; Smith et al., 2003). Une question légitime qu'on peut se poser est de savoir si les observations faites sur ces mutants sont généralisables à des PBP2x et PBP1a issues d'autres souches cliniques résistantes.

Sur 83 séquences de PBP2x disponibles dans les banques de données publiques, 36 possèdent la mutation I371T, 50 la mutation R384G, 11 la mutation M400T et 34 la mutation N605T. Les CMI de 46 de ces souches pour différents antibiotiques sont disponibles. Excepté dans une souche ayant la mutation R384G, la présence d'au moins une des quatre mutations citées ci-dessus est corrélée avec un phénotype de résistance. Dans le cas de PBP1a, les deux mutations identifiées sont très spécifiques aux souches résistantes. La mutation T371A n'a été observée que dans des souches ayant une CMI supérieure à 2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour la pénicilline G (Smith et al., 1998). La deuxième mutation de PBP1a est le groupe T(574)SQF→NTGY, elle est présente dans tous les isolats cliniques ayant des CMI pour la pénicilline G supérieures à 0,25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (Smith et al., 2003). Les mécanismes moléculaires de résistance impliquant les quatre mutations de PBP2x et les deux mutations de PBP1a sont donc applicables à de nombreuses souches cliniques résistantes.

#### IV Les autres acteurs de la résistance

Bien qu'il soit admis que PBP2x, PBP1a et PBP2b soient les seules PBPs mosaïques et les principaux acteurs de la résistance (Hakenbeck et al., 1999; Chesnel, 2003), il y a très certainement d'autres protéines impliquées dans le phénomène. En effet, le niveau de résistance de la souche sensible R6 transformée avec les gènes mosaïques *pbp1a*, *pbp2b* et *pbp2x* de la souche résistante 3191 (CMI de 16,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et de 4,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour respectivement la pénicilline G et le céfotaxime) est inférieur à celui de la souche clinique d'origine 3191 (Smith et al., 2000).

Il a été démontré que MurM est également codée par des gènes mosaïques (Filipe et al., 2000b) et est impliquée dans l'acquisition de hauts niveaux de résistance aux pénicillines (Smith et al., 2001). MurM est responsable de la synthèse de peptides branchés présents dans le peptidoglycane des souches résistantes (Filipe et al., 2001). L'inactivation de MurM engendre la disparition complète de peptides branchés dans la bactérie et la perte de résistance aux pénicillines (Filipe et al., 2000a). Mais il existe des souches cliniques (4843, 5104 et 5031) ayant des séquences des six PBPs et de MurM identiques avec des CMI différentes (Chesnel et al., 2005). Il y a donc d'autres facteurs en plus des PBPs et de MurM qui interviennent dans la résistance.

La modification de la capsule des bactéries peut être l'un de ces facteurs. Les gènes codant pour PBP2x et PBP1a se situent de part et d'autre du locus *cps* de la biosynthèse capsulaire. Il



a été démontré qu'en acquérant les gènes *pbp2x* et *pbp1a* mosaïques, les bactéries intègrent aussi le locus *cps* de la souche donneuse. Le bloc *pbp2x-cps-pbp1a* (42kb) peut en effet être intégré en une seule étape. Ainsi, en transformant la souche de *S. pneumoniae* sensible TIGR4 avec de l'ADN génomique de la souche GA71 résistante (sérotipe 19F, CMI de 1,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et 1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour respectivement le céfotaxime et la pénicilline G), TIGR4 acquiert la capsule de type 19F et atteint le même niveau de résistance au céfotaxime que la souche originale GA71 (Trzcinski et al., 2004). Les gènes capsulaires ont donc probablement un rôle dans le développement complet de la résistance en influant sur des facteurs morphologiques ou physiologiques tels que la diffusion de petites molécules à travers la paroi.

Dans des mutants de laboratoire, d'autres gènes ont été décrits comme affectant la résistance du pneumocoque aux  $\beta$ -lactamines. Des mutations ponctuelles dans le gène *ciaH* codant pour une histidine kinase ont été sélectionnées par le céfotaxime (Guenzi et al., 1994), alors que des mutants de *cpoA* codant pour une glycosyltransférase potentielle ont été sélectionnés par la pipéracilline (Grebe et al., 1997).

## V Applications potentielles des résultats de cette étude

### V.1 Diagnostique moléculaire

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de compléter le répertoire de mutations de PBPs déterminantes pour la résistance du pneumocoque aux  $\beta$ -lactamines. Ce répertoire pourrait être utilisé pour la conception de méthodes de diagnostic basées sur des analyses de séquences.

### V.2 Le développement de nouveaux antibiotiques

Les informations quant aux mécanismes moléculaires de diminution d'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines issues de ce travail pourraient être utilisées pour concevoir des nouvelles molécules antibactériennes ou améliorer des molécules existantes. Grâce aux hypothèses sur les modifications structurales induites par les mutations, ces molécules pourraient être modifiées chimiquement pour par exemple augmenter le nombre de liaisons

hydrogènes avec les PBPs ou éliminer des oppositions de charges. De plus, l'utilisation du test haut-débit de mesure d'efficacité d'acylation de PBP2x et PBP1a décrit dans la publication n° I permettrait de facilement cribler de nombreux candidats.

Mais avant de développer cette voie, il faut se demander si les PBPs sont toujours des cibles valables pour le développement de nouveaux antibiotiques. Le mécanisme de synthèse du peptidoglycane est unique aux eubactéries et les effets secondaires des  $\beta$ -lactamines sont quasi-absents chez les vertébrés. Les substrats des D,D-transpeptidases contiennent la structure D-Ala-D-Ala et présentent donc des acides aminés de la série D rencontrés uniquement dans le monde bactérien. De plus, leur localisation à la surface extérieure de la membrane plasmique rend ces cibles plus accessibles aux antibiotiques que celles internes à la cellule. Ces arguments justifient de continuer à essayer de développer des antibiotiques dirigés contre les PBPs. Mais les résultats des études cinétiques montrent que les  $\beta$ -lactamines ont un large spectre et peuvent se fixer dans le site actif de différents PBPs. Une conséquence négative des essais d'amélioration de la fixation de l'antibiotique dans le site actif d'une PBP particulière serait la perte de cette largeur de spectre d'action.

La solution du problème pourrait éventuellement être trouvée en essayant de comprendre comment les PBPs mosaïques arrivent à continuer à réagir avec le substrat naturel malgré la similitude du D-Ala-D-Ala et des  $\beta$ -lactamines. L'élucidation de ce phénomène pourrait en effet peut-être nous aider à développer de nouveaux agents antibactériens.

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

1. Acton TB, Gunsalus KC, Xiao R, Ma LC, Aramini J, Baran MC, Chiang YW, Climent T, Cooper B, Denissova NG, Douglas SM, Everett JK, Ho CK, Macapagal D, Rajan PK, Shastry R, Shih LY, Swapna GV, Wilson M, Wu M, Gerstein M, Inouye M, Hunt JF, Montelione GT (2005). "Robotic cloning and Protein Production Platform of the Northeast Structural Genomics Consortium." *Methods Enzymol.* **394**:210-43.
2. Adam, M., C. Damblon, M. Jamin, W. Zorzi, V. Dusart, M. Galleni, A. el Kharroubi, G. Piras, B. G. Spratt, W. Keck and et al. (1991). "Acytransferase activities of the high-molecular-mass essential penicillin-binding proteins." *Biochem J* **279 ( Pt 2)**: 601-4.
3. Ameyama, S., S. Onodera, M. Takahata, S. Minami, N. Maki, K. Endo, H. Goto, H. Suzuki and Y. Oishi (2002). "Mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 Gene (penA) in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(12): 3744-9.
4. Amin, A. A., N. G. Faux, G. Fenalti, G. Williams, A. Bernadou, B. Daglish, K. Keefe, S. Middleton, J. Rae, K. Tetis, R. H. Law, K. F. Fulton, J. Rossjohn, J. C. Whisstock and A. M. Buckle (2006). "Managing and mining protein crystallization data." *Proteins* **62**(1): 4-7.
5. Antignac, A., I. G. Boneca, J. C. Rousselle, A. Namane, J. P. Carlier, J. A. Vazquez, A. Fox, J. M. Alonso and M. K. Taha (2003). "Correlation between alterations of the penicillin-binding protein 2 and modifications of the peptidoglycan structure in *Neisseria meningitidis* with reduced susceptibility to penicillin G." *J Biol Chem* **278**(34): 31529-35.
6. Asahi, Y., Y. Takeuchi and K. Ubukata (1999). "Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1252-5.
7. Aslanidis, C. and P. J. de Jong (1990). "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)." *Nucleic Acids Res* **18**(20): 6069-74.
8. Avery, G., C. McGee and S. Falk (2000). "Implementing LIMS: a "how-to" guide." *Anal Chem* **72**(1): 57A-62A.
9. Barrett, D., C. Leimkuhler, L. Chen, D. Walker, D. Kahne and S. Walker (2005). "Kinetic characterization of the glycosyltransferase module of *Staphylococcus aureus* PBP2." *J Bacteriol* **187**(6): 2215-7.
10. Bertsche, U., E. Breukink, T. Kast and W. Vollmer (2005). "In vitro murein peptidoglycan synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **280**(45): 38096-101.
11. Betton, J. M. (2004). "High throughput cloning and expression strategies for protein production." *Biochimie* **86**(9-10): 601-5.
12. Boettner, M., B. Prinz, C. Holz, U. Stahl and C. Lang (2002). "High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*." *J Biotechnol* **99**(1): 51-62.
13. Boffa, L. C., E. M. Carpaneto and V. G. Allfrey (1995). "Isolation of active genes containing CAG repeats by DNA strand invasion by a peptide nucleic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 1901-5.
14. Bowler, L. D., Q. Y. Zhang, J. Y. Riou and B. G. Spratt (1994). "Interspecies recombination between the penA genes of *Neisseria meningitidis* and commensal

- Neisseria species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation." *J Bacteriol* **176**(2): 333-7.
15. Braslavsky, I., B. Hebert, E. Kartalov and S. R. Quake (2003). "Sequence information can be obtained from single DNA molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3960-4.
  16. Braun, D. C., S. H. Garfield and P. M. Blumberg (2005). "Analysis by fluorescence resonance energy transfer of the interaction between ligands and protein kinase Cdelta in the intact cell." *J Biol Chem* **280**(9): 8164-71.
  17. Braun, P., Y. Hu, B. Shen, A. Halleck, M. Koundinya, E. Harlow and J. LaBaer (2002). "Proteome-scale purification of human proteins from bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2654-9.
  18. Braun, P. and J. LaBaer (2003). "High throughput protein production for functional proteomics." *Trends Biotechnol* **21**(9): 383-8.
  19. Brenner, S., M. Johnson, J. Bridgham, G. Golda, D. H. Lloyd, D. Johnson, S. Luo, S. McCurdy, M. Foy, M. Ewan, R. Roth, D. George, S. Eletr, G. Albrecht, E. Vermaas, S. R. Williams, K. Moon, T. Burcham, M. Pallas, R. B. DuBridge, J. Kirchner, K. Fearon, J. Mao and K. Corcoran (2000). "Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays." *Nat Biotechnol* **18**(6): 630-4.
  20. Burbaum, J. J. and N. H. Sigal (1997). "New technologies for high-throughput screening." *Curr Opin Chem Biol* **1**(1): 72-8.
  21. Burns, M. A., B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo and D. T. Burke (1998). "An integrated nanoliter DNA analysis device." *Science* **282**(5388): 484-7.
  22. Busso, D., R. Kim and S. H. Kim (2003). "Expression of soluble recombinant proteins in a cell-free system using a 96-well format." *J Biochem Biophys Methods* **55**(3): 233-40.
  23. Bussow, K., D. Cahill, W. Nietfeld, D. Bancroft, E. Scherzinger, H. Lehrach and G. Walter (1998). "A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library." *Nucleic Acids Res* **26**(21): 5007-8.
  24. Carapito, R., L. Chesnel, T. Vernet and A. Zapun (2006). "Pneumococcal beta-lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x." *J Biol Chem* **281**(3): 1771-7.
  25. Chain E, F. H., Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG (1940). "Penicilin as a chemotherapeutic agent." *Lancet* **2**: 226.
  26. Chance, M. R., A. R. Bresnick, S. K. Burley, J. S. Jiang, C. D. Lima, A. Sali, S. C. Almo, J. B. Bonanno, J. A. Buglino, S. Boulton, H. Chen, N. Eswar, G. He, R. Huang, V. Ilyin, L. McMahan, U. Pieper, S. Ray, M. Vidal and L. K. Wang (2002). "Structural genomics: a pipeline for providing structures for the biologist." *Protein Sci* **11**(4): 723-38.
  27. Chesnel, L. (2003). "Conséquences structurales et fonctionnelles de mutations ponctuelles chez les "Penicillin-Binding Proteins" mosaïques issues de souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes aux  $\beta$ -lactamines." Thèse de doctorat.
  28. Chesnel, L., R. Carapito, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet and A. Zapun (2005). "Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7): 2895-902.
  29. Chesnel, L., L. Pernot, D. Lemaire, D. Champelovier, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet and A. Zapun (2003). "The structural modifications induced by the M339F

- substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*, further decreases the susceptibility to beta -lactams of resistant strains." *J Biol Chem* **15**: 15.
30. Chesnel, L., A. Zapun, N. Mouz, O. Dideberg and T. Vernet (2002). "Increase of the deacylation rate of PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* by single point mutations mimicking the class A beta-lactamases." *Eur J Biochem* **269**(6): 1678-83.
  31. Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz and S. Fields (1991). "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(21): 9578-82.
  32. Chiu, J., P. E. March, R. Lee and D. Tillett (2004). "Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h." *Nucleic Acids Res* **32**(21): e174.
  33. Christendat, D., A. Yee, A. Dharamsi, Y. Kluger, A. Savchenko, J. R. Cort, V. Booth, C. D. Mackereth, V. Saridakis, I. Ekiel, G. Kozlov, K. L. Maxwell, N. Wu, L. P. McIntosh, K. Gehring, M. A. Kennedy, A. R. Davidson, E. F. Pai, M. Gerstein, A. M. Edwards and C. H. Arrowsmith (2000). "Structural proteomics of an archaeon." *Nat Struct Biol* **7**(10): 903-9.
  34. Coffey, T. J., M. Daniels, L. K. McDougal, C. G. Dowson, F. C. Tenover and B. G. Spratt (1995). "Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(6): 1306-13.
  35. Contreras-Martel, C., V. Job, A. M. Di Guilmi, T. Vernet, O. Dideberg and A. Dessen (2006). "Crystal structure of penicillin-binding protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*." *J Mol Biol* **355**(4): 684-96.
  36. Dax, S. (1997). *Antimicrobial Chemotherapeutic Agents*. London, Blackie Academic and Professional.
  37. De Lencastre, H., S. W. Wu, M. G. Pinho, A. M. Ludovice, S. Filipe, S. Gardete, R. Sobral, S. Gill, M. Chung and A. Tomasz (1999). "Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin." *Microb Drug Resist* **5**(3): 163-75.
  38. Dessen, A., N. Mouz, E. Gordon, J. Hopkins and O. Dideberg (2001). "Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations." *J Biol Chem* **276**(48): 45106-12.
  39. Di Guilmi, A. M., A. Dessen, O. Dideberg and T. Vernet (2003). "Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*." *J Bacteriol* **185**(5): 1650-8.
  40. Di Guilmi, A. M., N. Mouz, J. P. Andrieu, J. Hoskins, S. R. Jaskunas, J. Gagnon, O. Dideberg and T. Vernet (1998). "Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a." *J Bacteriol* **180**(21): 5652-9.
  41. Di Guilmi, A. M., N. Mouz, Y. Petillot, E. Forest, O. Dideberg and T. Vernet (2000). "Deacylation kinetics analysis of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2x mutants resistant to beta-lactam antibiotics using electrospray ionization- mass spectrometry." *Anal Biochem* **284**(2): 240-6.
  42. Dovichi, N. J. (1997). "DNA sequencing by capillary electrophoresis." *Electrophoresis* **18**(12-13): 2393-9.
  43. Dowson, C. G., T. J. Coffey and B. G. Spratt (1994). "Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics." *Trends Microbiol* **2**(10): 361-6.

44. Dowson, C. G., A. Hutchison, J. A. Brannigan, R. C. George, D. Hansman, J. Linares, A. Tomasz, J. M. Smith and B. G. Spratt (1989). "Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8842-6.
45. Fang, K. T. Y. Z. J. W. D. B. S. W. X. (2006). "The mechanism of action of ramoplanin and enduracidin." *Mol. BioSyst.* **2**(1): 69-76.
46. Felton, M. J. (2003). "Liquid handling: dispensing reliability." *Anal Chem* **75**(17): 397A-399A.
47. Ferroni, A. and P. Berche (2001). "Alterations to penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X amongst penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F from the nasopharyngeal flora of children." *J Med Microbiol* **50**(9): 828-32.
48. Filipe, S. R., M. G. Pinho and A. Tomasz (2000a). "Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in *Streptococcus pneumoniae*." *J Biol Chem* **275**(36): 27768-74.
49. Filipe, S. R., E. Severina and A. Tomasz (2000b). "Distribution of the mosaic structured murM genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*." *J Bacteriol* **182**(23): 6798-805.
50. Filipe, S. R., E. Severina and A. Tomasz (2001). "Functional analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM reveals the region responsible for its specificity in the synthesis of branched cell wall peptides." *J Biol Chem* **276**(43): 39618-28.
51. Fleming, A. (1980). "Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* 10:226-236, 1929." *Rev Infect Dis* **2**(1): 129-39.
52. Fodor, S. P. A. e. a. (1995). *Array of oligonucleotides on a solid substrate*. USA.
53. Fontana, R., M. Aldegheri, M. Ligozzi, H. Lopez, A. Sucari and G. Satta (1994). "Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*." *Antimicrob Agents Chemother* **38**(9): 1980-3.
54. Fontana, R., R. Cerini, P. Longoni, A. Grossato and P. Canepari (1983). "Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin." *J Bacteriol* **155**(3): 1343-50.
55. Fontana, R., A. Grossato, L. Rossi, Y. R. Cheng and G. Satta (1985). "Transition from resistance to hypersusceptibility to beta-lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin." *Antimicrob Agents Chemother* **28**(5): 678-83.
56. Fraipont, C., F. Sapunarić, A. Zervosen, G. Auger, B. Devreese, T. Lioux, D. Blanot, D. Mengin-Lecreulx, P. Herdewijn, J. Van Beeumen, J. M. Frere and M. Nguyen-Disteche (2006). "Glycosyl Transferase Activity of the *Escherichia coli* Penicillin-Binding Protein 1b: Specificity Profile for the Substrate." *Biochemistry* **45**(12): 4007-4013.
57. Frere, J. M., J. M. Ghuysen and M. Iwatsubo (1975). "Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and beta-lactam antibiotics. A choice of models." *Eur J Biochem* **57**(2): 343-51.
58. Frere, J. M., B. Joris, O. Dideberg, P. Charlier and J. M. Ghuysen (1988). "Penicillin-recognizing enzymes." *Biochem Soc Trans* **16**(6): 934-8.
59. Fuad, N., J. M. Frere, J. M. Ghuysen, C. Duez and M. Iwatsubo (1976). "Mode of interaction between beta-lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase--transpeptidase from *Streptomyces* R39." *Biochem J* **155**(3): 623-9.

60. Fukui, S., T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson and W. Chai (2002). "Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions." *Nat Biotechnol* **20**(10): 1011-7.
61. Garcia-Bustos, J. F., B. T. Chait and A. Tomasz (1987). "Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan." *J Biol Chem* **262**(32): 15400-5.
62. Ghuysen, J. M. (1968). "Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism." *Bacteriol Rev* **32**(4 Pt 2): 425-64.
63. Ghuysen, J. M. (1994). "Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases." *Trends Microbiol* **2**(10): 372-80.
64. Giebel, L. B. and R. A. Spritz (1990). "Site-directed mutagenesis using a double-stranded DNA fragment as a PCR primer." *Nucleic Acids Res* **18**(16): 4947.
65. Gilbert, M. and J. S. Albala (2002). "Accelerating code to function: sizing up the protein production line." *Curr Opin Chem Biol* **6**(1): 102-5.
66. Goffin, C. and J. M. Ghuysen (1998). "Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4): 1079-93.
67. Gordon, E. M., N; Vernet, T; Dideberg, O. (1999). "Structural insights into antibiotic-target interactions." Ed Harwood Academic Publishers.
68. Graves-Woodward, K. and R. F. Pratt (1998). "Reaction of soluble penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with beta-lactams and acyclic substrates: kinetics in homogeneous solution." *Biochem J* **332** ( Pt 3): 755-61.
69. Grebe, T. and R. Hakenbeck (1996). "Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(4): 829-34.
70. Grebe, T., J. Paik and R. Hakenbeck (1997). "A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase." *J Bacteriol* **179**(10): 3342-9.
71. Guenzi, E., A. M. Gasc, M. A. Sicard and R. Hakenbeck (1994). "A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*." *Mol Microbiol* **12**(3): 505-15.
72. Hackbarth, C. J., T. Kocagoz, S. Kocagoz and H. F. Chambers (1995). "Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(1): 103-6.
73. Hakenbeck, R., K. Kaminski, A. Konig, M. van der Linden, J. Paik, P. Reichmann and D. Zahner (1999). "Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*." *Microb Drug Resist* **5**(2): 91-9.
74. Hakenbeck, R. and M. Kohiyama (1982). "Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*." *Eur J Biochem* **127**(2): 231-6.
75. Hakenbeck, R., C. Martin, C. Dowson and T. Grebe (1994). "Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants." *J Bacteriol* **176**(17): 5574-7.
76. Hakenbeck, R., M. Tarpay and A. Tomasz (1980). "Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **17**(3): 364-71.
77. Hakenbeck, R., S. Tornette and N. F. Adkinson (1987). "Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*." *J Gen Microbiol* **133**(Pt 3): 755-60.
78. Hammarstrom, M., N. Hellgren, S. van Den Berg, H. Berglund and T. Hard (2002). "Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*." *Protein Sci* **11**(2): 313-21.



79. Hartman, B. J. and A. Tomasz (1984). "Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* **158**(2): 513-6.
80. Haukanes, B. I. and C. Kvam (1993). "Application of magnetic beads in bioassays." *Biotechnology (N Y)* **11**(1): 60-3.
81. Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy and D. A. Morrison (1995). "An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11140-4.
82. Heiring, C. and Y. A. Muller (2001). "Folding screening assayed by proteolysis: application to various cysteine deletion mutants of vascular endothelial growth factor." *Protein Eng* **14**(3): 183-8.
83. Holtje, J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 181-203.
84. Holz, C., O. Hesse, N. Bolotina, U. Stahl and C. Lang (2002). "A micro-scale process for high-throughput expression of cDNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Protein Expr Purif* **25**(3): 372-8.
85. Hong, J. W. and S. R. Quake (2003). "Integrated nanoliter systems." *Nat Biotechnol* **21**(10): 1179-83.
86. Hoskins, J., P. Matsushima, D. L. Mullen, J. Tang, G. Zhao, T. I. Meier, T. I. Nicas and S. R. Jaskunas (1999). "Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*." *J Bacteriol* **181**(20): 6552-5.
87. Howbrook, D. N., A. M. van der Valk, M. C. O'Shaughnessy, D. K. Sarker, S. C. Baker and A. W. Lloyd (2003). "Developments in microarray technologies." *Drug Discov Today* **8**(14): 642-51.
88. Hsieh, H. B., J. Fitch, D. White, F. Torres, J. Roy, R. Matusiak, B. Krivacic, B. Kowalski, R. Bruce and S. Elrod (2004). "Ultra-high-throughput microarray generation and liquid dispensing using multiple disposable piezoelectric ejectors." *J Biomol Screen* **9**(2): 85-94.
89. Innis (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, Academic Press, Inc.: 60-66.
90. Ishino, F., W. Park, S. Tomioka, S. Tamaki, I. Takase, K. Kunugita, H. Matsuzawa, S. Asoh, T. Ohta, B. G. Spratt and et al. (1986). "Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein." *J Biol Chem* **261**(15): 7024-31.
91. Jamin, M., M. Adam, C. Damblon, L. Christiaens and J. M. Frere (1991). "Accumulation of acyl-enzyme in DD-peptidase-catalysed reactions with analogues of peptide substrates." *Biochem J* **280** ( Pt 2): 499-506.
92. Jamin, M., C. Damblon, S. Millier, R. Hakenbeck and J. M. Frere (1993a). "Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with beta-lactams." *Biochem J* **292** ( Pt 3): 735-41.
93. Jamin, M., R. Hakenbeck and J. M. Frere (1993b). "Penicillin binding protein 2x as a major contributor to intrinsic beta-lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*." *FEBS Lett* **331**(1-2): 101-4.
94. Johnson, M. (2002). "Converting a protease assay to a caliper(R) format labchip system." *JALA*(7): 62.
95. Joris, B., J. M. Ghuysen, G. Dive, A. Renard, O. Dideberg, P. Charlier, J. M. Frere, J. A. Kelly, J. C. Boyington, P. C. Moews and et al. (1988). "The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family." *Biochem J* **250**(2): 313-24.

96. Kammann, M., J. Laufs, J. Schell and B. Gronenborn (1989). "Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR)." *Nucleic Acids Res* **17**(13): 5404.
97. Ke, S. H. and E. L. Madison (1997). "Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method." *Nucleic Acids Res* **25**(16): 3371-2.
98. Kell, C. M., U. K. Sharma, C. G. Dowson, C. Town, T. S. Balganesh and B. G. Spratt (1993). "Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*." *FEMS Microbiol Lett* **106**(2): 171-5.
99. Kenseth, J. R., Y. He, D. Tallman, H. M. Pang and S. J. Coldiron (2004). "Techniques for high-throughput characterization of peptides, oligonucleotides and catalysis efficiency." *Curr Opin Chem Biol* **8**(3): 327-33.
100. Khan, J., J. S. Wei, M. Ringner, L. H. Saal, M. Ladanyi, F. Westermann, F. Berthold, M. Schwab, C. R. Antonescu, C. Peterson and P. S. Meltzer (2001). "Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks." *Nat Med* **7**(6): 673-9.
101. Kigawa, T., T. Yabuki, Y. Yoshida, M. Tsutsui, Y. Ito, T. Shibata and S. Yokoyama (1999). "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins." *FEBS Lett* **442**(1): 15-9.
102. Klare, I., A. C. Rodloff, J. Wagner, W. Witte and R. Hakenbeck (1992). "Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*." *Antimicrob Agents Chemother* **36**(4): 783-7.
103. Knaust, R. K. and P. Nordlund (2001). "Screening for soluble expression of recombinant proteins in a 96-well format." *Anal Biochem* **297**(1): 79-85.
104. Komminoth, P. and A. A. Long (1993). "In-situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **64**(2): 67-73.
105. Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nat Med* **4**(7): 844-7.
106. Krauss, J., M. van der Linden, T. Grebe and R. Hakenbeck (1996). "Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*." *Microb Drug Resist* **2**(2): 183-6.
107. Kuil, M. E., E. R. Bodenstaff, F. J. Hoedemaeker and J. P. Abrahams (2002). "Protein nano-crystallogenesis." *Enzyme Microb Technol* **30**(3): 262-5.
108. Kunkel, T. A., K. Bebenek and J. McClary (1991). "Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA." *Methods Enzymol* **204**: 125-39.
109. Laible, G., B. G. Spratt and R. Hakenbeck (1991). "Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*." *Mol Microbiol* **5**(8): 1993-2002.
110. Lehrach, H. B., D; Maier, E (1997). "Robotics, Computing, and Biology: an Interdisciplinary Approach to the Analysis of Complex Genomes." *Interdisciplinary science reviews* **22**(1): 37.
111. Lesley, S. A. (2001). "High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world." *Protein Expr Purif* **22**(2): 159-64.
112. Lesley, S. A., J. Graziano, C. Y. Cho, M. W. Knuth and H. E. Klock (2002a). "Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein." *Protein Eng* **15**(2): 153-60.
113. Lesley, S. A., P. Kuhn, A. Godzik, A. M. Deacon, I. Mathews, A. Kreuzsch, G. Spraggon, H. E. Klock, D. McMullan, T. Shin, J. Vincent, A. Robb, L. S. Brinen, M. D. Miller, T. M. McPhillips, M. A. Miller, D. Scheibe, J. M. Canaves, C. Guda, L.

- Jaroszewski, T. L. Selby, M. A. Elsliger, J. Wooley, S. S. Taylor, K. O. Hodgson, I. A. Wilson, P. G. Schultz and R. C. Stevens (2002b). "Structural genomics of the *Thermotoga maritima* proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11664-9.
114. Li, M., Z. G. Su and J. C. Janson (2004). "In vitro protein refolding by chromatographic procedures." *Protein Expr Purif* **33**(1): 1-10.
115. Lim, D. and N. C. Strynadka (2002). "Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Nat Struct Biol* **9**(11): 870-6.
116. Lin, C. T., P. A. Moore, D. L. Auberry, E. V. Landorf, T. Peppler, K. D. Victry, F. R. Collart and V. Kery (2005a). "Automated purification of recombinant proteins: Combining high-throughput with high yield." *Protein Expr Purif*.
117. Lin, L., J. Seehra and M. L. Stahl (2005b). "High-throughput identification of refolding conditions for LXRbeta without a functional assay." *Protein Expr Purif*.
118. Liu, B., S. Li and J. Hu (2004). "Technological advances in high-throughput screening." *Am J Pharmacogenomics* **4**(4): 263-76.
119. Liu, Q., M. Z. Li, D. Leibham, D. Cortez and S. J. Elledge (1998). "The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes." *Curr Biol* **8**(24): 1300-9.
120. Liu, Q., M. Z. Li, D. Liu and S. J. Elledge (2000). "Rapid construction of recombinant DNA by the univector plasmid-fusion system." *Methods Enzymol* **328**: 530-49.
121. Lu, W. P., E. Kincaid, Y. Sun and M. D. Bauer (2001). "Kinetics of beta-lactam interactions with penicillin-susceptible and -resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Involvement of acylation and deacylation in beta-lactam resistance." *J Biol Chem* **276**(34): 31494-501.
122. Lu, W. P., Y. Sun, M. D. Bauer, S. Paule, P. M. Koenigs and W. G. Kraft (1999). "Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with beta-lactams using electrospray mass spectrometry." *Biochemistry* **38**(20): 6537-46.
123. MacBeath, G. and S. L. Schreiber (2000). "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination." *Science* **289**(5485): 1760-3.
124. Marsischky, G. and J. LaBaer (2004). "Many paths to many clones: a comparative look at high-throughput cloning methods." *Genome Res* **14**(10B): 2020-8.
125. Maugein, J. C., J. Weber, M. (2006). "Observatoires régionaux du pneumocoque: surveillance des sérotypes et de la résistance aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées en France, 2003." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* **1**.
126. Maurer, M., R. Molidor, A. Sturn, J. Hartler, H. Hackl, G. Stocker, A. Prokesch, M. Scheideler and Z. Trajanoski (2005). "MARS: microarray analysis, retrieval, and storage system." *BMC Bioinformatics* **6**(1): 101.
127. Maxwell, K. L., D. Bona, C. Liu, C. H. Arrowsmith and A. M. Edwards (2003). "Refolding out of guanidine hydrochloride is an effective approach for high-throughput structural studies of small proteins." *Protein Sci* **12**(9): 2073-80.
128. Michael, S. F. (1994). "Mutagenesis by incorporation of a phosphorylated oligo during PCR amplification." *Biotechniques* **16**(3): 410-2.
129. Mikaelian, I. and A. Sergeant (1992). "A general and fast method to generate multiple site directed mutations." *Nucleic Acids Res* **20**(2): 376.
130. Mitra, R. D., J. Shendure, J. Olejnik, O. Edyta Krzymanska and G. M. Church (2003). "Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies." *Anal Biochem* **320**(1): 55-65.

131. Moreland, N., R. Ashton, H. M. Baker, I. Ivanovic, S. Patterson, V. L. Arcus, E. N. Baker and J. S. Lott (2005). "A flexible and economical medium-throughput strategy for protein production and crystallization." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**(Pt 10): 1378-85.
132. Morlot, C., A. Zapun, O. Dideberg and T. Vernet (2003). "Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle." *Mol Microbiol* **50**(3): 845-55.
133. Mouz, N., A. M. Di Guilmi, E. Gordon, R. Hakenbeck, O. Dideberg and T. Vernet (1999). "Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics." *J Biol Chem* **274**(27): 19175-80.
134. Mouz, N., E. Gordon, A. M. Di Guilmi, I. Petit, Y. Petillot, Y. Dupont, R. Hakenbeck, T. Vernet and O. Dideberg (1998). "Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in Gram-positive bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13403-6.
135. Mueller, U., L. Nyarsik, M. Horn, H. Rauth, T. Przewieslik, W. Saenger, H. Lehrach and H. Eickhoff (2001). "Development of a technology for automation and miniaturization of protein crystallization." *J Biotechnol* **85**(1): 7-14.
136. Murby, M., M. Uhlen and S. Stahl (1996). "Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* **7**(2): 129-36.
137. Nagai, K., T. A. Davies, M. R. Jacobs and P. C. Appelbaum (2002). "Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(5): 1273-80.
138. Nelson, D. E. and K. D. Young (2000). "Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **182**(6): 1714-21.
139. Nelson, D. E. and K. D. Young (2001). "Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **183**(10): 3055-64.
140. Nieto, M., H. R. Perkins, J. M. Frere and J. M. Ghuysen (1973). "Fluorescence and circular dichroism studies on the *Streptomyces* R61 DD-carboxypeptidase-transpeptidase. Penicillin binding by the enzyme." *Biochem J* **135**(3): 493-505.
141. Olsvik, O., T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad and M. Uhlen (1994). "Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology." *Clin Microbiol Rev* **7**(1): 43-54.
142. Pagliero, E., L. Chesnel, J. Hopkins, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet and A. M. Di Guilmi (2004). "Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1848-55.
143. Paik, J., I. Kern, R. Lurz and R. Hakenbeck (1999). "Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins." *J Bacteriol* **181**(12): 3852-6.
144. Pares, S., N. Mouz, Y. Petillot, R. Hakenbeck and O. Dideberg (1996). "X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme." *Nat Struct Biol* **3**(3): 284-9.
145. Patton, W. F. (2000). "Making blind robots see: the synergy between fluorescent dyes and imaging devices in automated proteomics." *Biotechniques* **28**(5): 944-8, 950-7.
146. Pernet, L., L. Chesnel, A. Le Gouellec, J. Croize, T. Vernet, O. Dideberg and A. Dessen (2004). "A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*

- exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to beta-lactam antibiotics." *J Biol Chem* **279**(16): 16463-70.
147. Peterson, S., R. T. Cline, H. Tettelin, V. Sharov and D. A. Morrison (2000). "Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays." *J Bacteriol* **182**(21): 6192-202.
  148. Pierre, J., R. Williamson, M. Bornet and L. Gutmann (1990). "Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* with a low affinity for methicillin, cephalothin, and cefamandole." *Antimicrob Agents Chemother* **34**(9): 1691-4.
  149. Pihl, J., M. Karlsson and D. T. Chiu (2005). "Microfluidic technologies in drug discovery." *Drug Discov Today* **10**(20): 1377-83.
  150. Piras, G., D. Raze, A. el Kharroubi, D. Hastir, S. Englebert, J. Coyette and J. M. Ghuysen (1993). "Cloning and sequencing of the low-affinity penicillin-binding protein 3r-encoding gene of *Enterococcus hirae* S185: modular design and structural organization of the protein." *J Bacteriol* **175**(10): 2844-52.
  151. Pisabarro, A. G., R. Prats, D. Vaquez and A. Rodriguez-Tebar (1986). "Activity of penicillin-binding protein 3 from *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **168**(1): 199-206.
  152. Pozzi, G., L. Masala, F. Iannelli, R. Manganeli, L. S. Havarstein, L. Piccoli, D. Simon and D. A. Morrison (1996). "Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone." *J Bacteriol* **178**(20): 6087-90.
  153. Prilusky, J., E. Oueillet, N. Ulryck, A. Pajon, J. Bernauer, I. Krimm, S. Quevillon-Cheruel, N. Leulliot, M. Graille, D. Liger, L. Tresaugues, J. L. Sussman, J. Janin, H. van Tilbeurgh and A. Poupon (2005). "HalX: an open-source LIMS (Laboratory Information Management System) for small- to large-scale laboratories." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**(Pt 6): 671-8.
  154. Reischl, U. and B. Kochanowski (1995). "Quantitative PCR. A survey of the present technology." *Mol Biotechnol* **3**(1): 55-71.
  155. Ren, L., H. Chen and E. A. Sternberg (1994). "Tethered bandshift assay and affinity purification of a new DNA-binding protein." *Biotechniques* **16**(5): 852-5.
  156. Saboulard, D., V. Dugas, M. Jaber, J. Broutin, E. Souteyrand, J. Sylvestre and M. Delcourt (2005). "High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips." *Biotechniques* **39**(3): 363-8.
  157. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  158. Sanchez-Villeda, H., S. Schroeder, M. Polacco, M. McMullen, S. Havermann, G. Davis, I. Vroh-Bi, K. Cone, N. Sharopova, Y. Yim, L. Schultz, N. Duru, T. Musket, K. Houchins, Z. Fang, J. Gardiner and E. Coe (2003). "Development of an integrated laboratory information management system for the maize mapping project." *Bioinformatics* **19**(16): 2022-30.
  159. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
  160. Scanga, F. (1950). "[Acquired resistance of bacteria to penicillin and streptomycin]." *Rend Ist Sup Sanit* **13**(3): 241-338.
  161. Scheich, C., V. Sievert and K. Bussow (2003). "An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography." *BMC Biotechnol* **3**: 12.
  162. Schiffer, G. and J. V. Holtje (1999). "Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **274**(45): 32031-9.

163. Schleifer, K. H. and O. Kandler (1972). "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications." *Bacteriol Rev* **36**(4): 407-77.
164. Schuster, C., B. Dobrinski and R. Hakenbeck (1990). "Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3." *J Bacteriol* **172**(11): 6499-505.
165. Schwartz, B., J. A. Markwalder and Y. Wang (2001). "Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin binding protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*." *J Am Chem Soc* **123**(47): 11638-43.
166. Seidel, M., D. M. Dankbar and G. Gauglitz (2004). "A miniaturized heterogeneous fluorescence immunoassay on gold-coated nano-titer plates." *Anal Bioanal Chem* **379**(7-8): 904-12.
167. Severin, A. and A. Tomasz (1996). "Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*." *J Bacteriol* **178**(1): 168-74.
168. Shih, Y. P., W. M. Kung, J. C. Chen, C. H. Yeh, A. H. Wang and T. F. Wang (2002). "High-throughput screening of soluble recombinant proteins." *Protein Sci* **11**(7): 1714-9.
169. Sifaoui, F., M. D. Kitzis and L. Gutmann (1996). "In vitro selection of one-step mutants of *Streptococcus pneumoniae* resistant to different oral beta-lactam antibiotics is associated with alterations of PBP2x." *Antimicrob Agents Chemother* **40**(1): 152-6.
170. Smailus, D. E., A. Marziali, P. Dextras, M. A. Marra and R. A. Holt (2005). "Simple, robust methods for high-throughput nanoliter-scale DNA sequencing." *Genome Res* **15**(10): 1447-50.
171. Smith, A. M. and K. P. Klugman (1998). "Alterations in PBP 1A essential-for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(6): 1329-33.
172. Smith, A. M. and K. P. Klugman (2000). "Non-Penicillin-Binding protein mediated high-level penicillin and cephalosporin resistance in a Hungarian clone of *Streptococcus pneumoniae*." *Microb Drug Resist* **6**(2): 105-10.
173. Smith, A. M. and K. P. Klugman (2001). "Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(8): 2393-6.
174. Smith, A. M. and K. P. Klugman (2003). "Site-specific mutagenesis analysis of PBP 1A from a penicillin-cephalosporin-resistant pneumococcal isolate." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(1): 387-9.
175. Smith, L. M., J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent and L. E. Hood (1986). "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." *Nature* **321**(6071): 674-9.
176. Spraggon, G., S. A. Lesley, A. Kreuzsch and J. P. Priestle (2002). "Computational analysis of crystallization trials." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 11): 1915-23.
177. Spratt, B. G. (1988). "Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*." *Nature* **332**(6160): 173-6.
178. Spratt, B. G., L. D. Bowler, Q. Y. Zhang, J. Zhou and J. M. Smith (1992). "Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species." *J Mol Evol* **34**(2): 115-25.
179. Spratt, B. G., Q. Y. Zhang, D. M. Jones, A. Hutchison, J. A. Brannigan and C. G. Dowson (1989). "Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8988-92.

180. Stoll, D., M. F. Templin, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer and T. O. Joos (2002). "Protein microarray technology." *Front Biosci* **7**: c13-32.
181. Studier, F. W. (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." *Protein Expr Purif* **41**(1): 207-34.
182. Tabb, D. L., W. H. McDonald and J. R. Yates, 3rd (2002). "DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics." *J Proteome Res* **1**(1): 21-6.
183. Terrak, M., T. K. Ghosh, J. van Heijenoort, J. Van Beeumen, M. Lampilas, J. Aszodi, J. A. Ayala, J. M. Ghuysen and M. Nguyen-Disteche (1999). "The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **34**(2): 350-64.
184. Thomsen, W., J. Frazer and D. Unett (2005). "Functional assays for screening GPCR targets." *Curr Opin Biotechnol* **16**(6): 655-65.
185. Thurow, K. S., N (2006). "Automating analytical processes." *BIOforum Europe* **10**: 33-35.
186. Trzcinski, K., C. M. Thompson and M. Lipsitch (2004). "Single-step capsular transformation and acquisition of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*." *J Bacteriol* **186**(11): 3447-52.
187. Tse, C. and J. Capeau (2003). "[Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]." *Ann Biol Clin (Paris)* **61**(3): 279-93.
188. Turchin, A. and J. F. Lawler, Jr. (1999). "The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis." *Biotechniques* **26**(4): 672-6.
189. Uber, D. C., J. M. Jaklevic, E. H. Theil, A. Lishanskaya and M. R. McNeely (1991). "Application of robotics and image processing to automated colony picking and arraying." *Biotechniques* **11**(5): 642-7.
190. Utsui, Y. and T. Yokota (1985). "Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **28**(3): 397-403.
191. van der Woerd M, Ferree D, Pusey M. (2003). "The promise of macromolecular crystallization in microfluidic chips." *J Struct Biol.* **142**(1):180-7.
192. van den Ent, F. and J. Lowe (2006). "RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids." *J Biochem Biophys Methods.*
193. van Heijenoort, J. (2001). "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." *Glycobiology* **11**(3): 25R-36R.
194. Van Heijenoort, Y., M. Derrien and J. Van Heijenoort (1978). "Polymerization by transglycosylation in the biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K 12 and its inhibition by antibiotics." *FEBS Lett* **89**(1): 141-4.
195. Vincentelli, R., S. Canaan, V. Campanacci, C. Valencia, D. Maurin, F. Frassinetti, L. Scappucini-Calvo, Y. Bourne, C. Cambillau and C. Bignon (2004). "High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies." *Protein Sci* **13**(10): 2782-92.
196. Vincentelli, R., S. Canaan, J. Offant, C. Cambillau and C. Bignon (2005). "Automated expression and solubility screening of His-tagged proteins in 96-well format." *Anal Biochem* **346**(1): 77-84.
197. Vosberg, H. P. (1989). "The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids." *Hum Genet* **83**(1): 1-15.
198. Wallmark (1954). "The production of penicillinase in *Staphylococcus aureus pyogenes* and its relation to penicillin resistance." *Acta Pathol Microbiol Scand.* **34**(2): 182-90.
199. Waugh DS. 2005. "Making the most of affinity tags." *Trends Biotechnol.* **23**(6):316-20.

- 
200. Welzel, P. (2005). "Syntheses around the transglycosylation step in peptidoglycan biosynthesis." *Chem Rev* **105**(12): 4610-60.
  201. Wigley, W. C., R. D. Stidham, N. M. Smith, J. F. Hunt and P. J. Thomas (2001). "Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein." *Nat Biotechnol* **19**(2): 131-6.
  202. Williams, C. (2004). "cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest." *Nat Rev Drug Discov* **3**(2): 125-35.
  203. Wu, W., Z. Jia, P. Liu, Z. Xie and Q. Wei (2005). "A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis." *Nucleic Acids Res* **33**(13): e110.
  204. Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. Muyrers and A. F. Stewart (1998). "A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*." *Nat Genet* **20**(2): 123-8.
  205. Zhao, G., T. I. Meier, J. Hoskins and K. A. McAllister (2000). "Identification and characterization of the penicillin-binding protein 2a of *Streptococcus pneumoniae* and its possible role in resistance to beta-lactam antibiotics." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(6): 1745-8.
  206. Zheng, L., U. Baumann and J. L. Reymond (2004). "An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol." *Nucleic Acids Res* **32**(14): e115.
  207. Zigelboim, S. and A. Tomasz (1980). "Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **17**(3): 434-42.



# ANNEXES

## **Annexes**

### **I Publication n°III**

#### **Des domaines de liaison à la pénicilline identiques dans des souches cliniques ayant des niveaux de résistance différents pour les $\beta$ -lactamines.**

Chesnel L, Carapito R, Croize J, Dideberg O, Vernet T, Zapun A. Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul;49(7):2895-902.

# Identical Penicillin-Binding Domains in Penicillin-Binding Proteins of *Streptococcus pneumoniae* Clinical Isolates with Different Levels of $\beta$ -Lactam Resistance

Laurent Chesnel,<sup>1†</sup> Raphaël Carapito,<sup>1</sup> Jacques Croizé,<sup>3</sup> Otto Dideberg,<sup>2</sup> Thierry Vernet,<sup>1\*</sup> and André Zapun<sup>1</sup>

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules<sup>1</sup> and Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire,<sup>2</sup> Institut de Biologie Structurale (CEA/CNRS UMR 5075/UJF), Grenoble, France, and Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France<sup>3</sup>

Received 14 October 2004/Returned for modification 27 November 2004/Accepted 3 March 2005

**We have sequenced the penicillin-binding domains of the complete repertoire of penicillin-binding proteins and MurM from 22 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that span a wide range of  $\beta$ -lactam resistance levels. Evidence of mosaicism was found in the genes encoding PBP 1a, PBP 2b, PBP 2x, MurM, and, possibly, PBP 2a. Five isolates were found to have identical PBP and MurM sequences, even though the MICs for penicillin G ranged from 0.25 to 2.0 mg/liter. When the sequences encoding PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x from one of these isolates were used to transform laboratory strain R6, the resulting strain had a resistance level higher than that of the less resistant isolates carrying that PBP set but lower than that of the most resistant isolates carrying that PBP set. This result demonstrates that if the R6 strain is arbitrarily defined as the standard genotype, some wild genetic backgrounds can either increase or decrease the PBP-based resistance phenotype.**

The mounting rates of resistance of *Streptococcus pneumoniae* to antibiotics is an important concern, as this human pathogen is responsible for serious diseases, such as otitis, pneumonia, meningitis, and bacteremia. In clinical isolates, resistance to  $\beta$ -lactams is mostly due to the expression of modified penicillin-binding proteins (PBPs), the targets of the  $\beta$ -lactams, with reduced affinities for the antibiotics (3). The low-affinity PBPs are the products of mosaic genes that result from multiple events of homologous recombination with genes from other strains or closely related species (3). The presence of a functional *murM* gene (also called *fibA*), which is involved in the synthesis of an alternative physiological substrate for the PBPs, is required for the expression of  $\beta$ -lactam resistance (9, 31). Mosaic *murM* genes can dramatically increase the level of resistance due to low-affinity PBPs (9, 28).

*S. pneumoniae* has five high-molecular-weight PBPs, three of which (PBP 2x, PBP 2b, and PBP 1a) are definitely involved in  $\beta$ -lactam resistance (23), and one low-molecular-weight PBP. A laboratory experiment showed that the five high-molecular-weight PBPs were modified upon transfer of high-level resistance from *Streptococcus mitis* to *S. pneumoniae* (13). Other works have suggested a role for PBP 2a (26, 27) and the low-molecular-weight PBP, PBP 3 (17), in  $\beta$ -lactam resistance. These findings raised the possibility that previously undetected variability in all the *pbp* genes may account for the wide range of levels of resistance to  $\beta$ -lactams.

On the basis of the premise that knowledge of the sequence

of MurM and all the PBPs might be sufficient to predict the level of  $\beta$ -lactam resistance, we sequenced *murM* and the region coding the penicillin-binding domain of the six PBPs from 22 isolates of *S. pneumoniae*. Five isolates were found to have very different MICs for  $\beta$ -lactams, even though they had the same six penicillin-binding domains and MurM. This demonstrates that other genes modulate significantly the resistance provided by the low-affinity PBPs. By transferring to the susceptible R6 strain the three mosaic *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* sequences, which are identical in the five isolates that differ in  $\beta$ -lactam resistance, we generated a strain with a resistance level inferior to that of the most resistant originating isolate but higher than that of the less resistant isolate.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** The 22 *S. pneumoniae* isolates for this study were isolated at the University Hospital in Grenoble, France, between 1997 and 2000. They were chosen from a collection of more than 500 isolates, based on the hospital record of their antibiotic susceptibilities measured at the time of their isolation. The isolates were chosen to exhibit a series of penicillin MICs as complete as possible between highly susceptible and highly resistant. Two isolates were included because of their unusually high levels of resistance to amoxicillin. Clones were reisolated on Columbia agar (Becton Dickinson) plates with 5% sheep blood incubated at 37°C in an atmosphere supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Liquid cultures were in glucose buffered broth (Diagnostic Pasteur) at 37°C.

**Antibiotic susceptibility and typing.** Susceptibilities were determined with Etest strips (AB Biodisk) on Mueller-Hinton agar plates supplemented with 5% horse blood. Serogroups were determined by a latex agglutination test (kindly provided by bioMérieux). Multilocus sequence typing (MLST) was performed by the standard procedure (7), and the results were deposited in the *S. pneumoniae* MLST database (<http://spneumoniae.mlst.net/>).

**Gene amplification and sequencing.** Genomic DNA was prepared with a High Pure PCR Template preparation kit from Roche. The region coding the transpeptidase domain of each PBP was amplified by PCR with the pairs of primers given in Table 1 by using the VENT polymerase (New England Biolabs). The PCR products were sequenced either directly by using the amplification

\* Corresponding author. Mailing address: Institut de Biologie Structurale, 41 rue Jules Horowitz 38027, Grenoble, France. Phone: 33 4 38 78 96 81. Fax: 33 4 38 78 54 94. E-mail: thierry.vernet@ibs.fr.

† Present address: Section of Microbial Pathogenesis, Yale University School of Medicine, New Haven, CT.

TABLE 1. Oligonucleotides used for PCR amplification of *pbp* and *murM* gene fragments

Gene fragment	Primer <sup>a</sup>	Sequence (5'→3')
<i>pbp1a-pbd<sup>b</sup></i>	5'-PBP1a1	CCCTATTCACATCCAGAAGC
	5'-PBP1a2	CATCTCTGCTGAACAGTATG
	3'-PBP1a1	CTGTGAAGTTGAACTATCTGATG
	3'-PBP1a2	CTGATGATGAGCTTGAACCTTC
<i>pbp1a-ecd<sup>c</sup></i>	PBP1aUP	GGGGATCCAGCAAGGCTCCTAGCCTATCCG
	PBP1aDN	CCGCTCGAGCGGTTATGGTTGTGCTGGTTGAGG
<i>pbp1b-pbd</i>	5'-PBP1b1	GTTGACTGTTCCCTCAAGCAGC
	5'-PBP1b2	CTTACTCTCCTTATGAAAACTACTGG
	3'-PBP1b1	GAGCTGGATGGAGTTGGTAG
<i>pbp2a-pbd</i>	5'-PBP2a1	GATTGAATAGTTTCTCGAACCAC
	5'-PBP2a2	CGACAAGCTAGGCTTGC
	3'-PBP2a1	GGTTGCAGCAGGATATATTG
	3'-PBP2a2	GATAAAAAACCAAGAAACCGAAGC
<i>pbp2b-pbd</i>	5'-PBP2b1	ACCTTACAAGGAAACGCTCGG
	5'-PBP2b2	GAAATCCATCTGGATAAAATATGG
	3'-PBP2b1	CGTCTTAATCCCGATACCTGG
	3'-PBP2b2	CATCCCAATCGTATAAAAAGGCC
<i>pbp2b-ecd</i>	PBP2bUP	CGCGGATCCCAGGTTTTGAACAAGGATTTTTACGAAAAAAGCTA
	PBP2bDN	CCGCTCGAGAGCATAATTTCTTTCTAATTCATTGGATGGTATTTTTG
<i>pbp2x-pbd</i>	5'-PBP2x1	GGGACAGACGGCATTATTACCTATG
	3'-PBP2x1	GGTGAAATATCCTTGATGCTAGGC
<i>pbp2x-ecd</i>	PBP2xUP	CGGGATCCGGGACAGGCACTCGC
	PBP2xDN	TCCCCGGGTTAGTCTCCTAAAGTTAATTTAAT
<i>pbp3</i>	5'-PBP3	ATGAAAAAATATTTTTAACTTTG
	3'-PBP3	AGTTGGATAAAATTTGATTTTATAC
<i>murM</i>	5'-MurM	CTTTCTATGTTTTTTCTTAATGTTTTACGG
	3'-MurM	ATGTACCGTTATCAAATTGGC

<sup>a</sup> Depending on the isolates, alternative pairs of primers were sometimes used to obtain proper amplification.

<sup>b</sup> PCR fragments used for sequencing the penicillin-binding domain (*pbd*).

<sup>c</sup> PCR fragments used for cloning the complete extracellular domain (*ecd*).

primers or following insertion into pCRscript (Stratagene). Sequencing was performed by GenomeExpress (Grenoble, France).

**Transformation.** The gene fragments encoding the extracellular domains of PBP 1a (residues 37 to 719), PBP 2b (residues 35 to 683), and PBP 2x (residues 49 to 750) were PCR amplified from isolate 5031 with the primers given in Table 1 and cloned as BamHI-XhoI or BamHI-SmaI (PBP 2x) digests into pGex-4T1.

The nonencapsulated *S. pneumoniae* R6 strain was used as the recipient for genetic triple transformation. Bacteria were grown in C medium supplemented with 0.18% albumin (8%, boiled) to the onset of the exponential phase. Aliquots were stored in 20% glycerol at -80°C until they were used. About 50 ng of each plasmid DNA was added to 100 µl of competent cells (thawed on ice and diluted 10-fold in C medium with 0.18% albumin). After incubation for 30 min at 30°C and 120 min at 37°C, the cells were plated on Columbia blood agar enriched with 6% horse blood containing concentrations of cefotaxime ranging from 0 to 0.3 µg · ml<sup>-1</sup>.

**Immunoblotting.** Pneumococci were harvested at an optical density at 600 nm of 0.4. The cells were lysed by resuspension in a 1/100 volume of CellLytic BII buffer (Sigma) supplemented with lysozyme (1 kU/ml; Sigma) and RQ1 DNase (80 U/ml; Promega) on ice for an hour. The total protein content was determined by the bicinchoninic acid assay (Uptima), with bovine serum albumin used as a standard. Samples containing 10 µg proteins were analyzed by gel electrophoresis and immunoblotting with rabbit antisera against PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x (19). The immunoblots were revealed with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The EMBL accession numbers for the new sequences are AJ698085 to AJ698090 and AJ698959 for PBP 2x, AJ842012 to AJ842018 for PBP 2b, AJ842019 to AJ842021 for PBP 1b, AJ842755

to AJ842758 for PBP 2a, AJ842759 and AJ842760 for PBP 3, and AJ842957 to AJ842961 for MurM.

## RESULTS

The sequences of the penicillin-binding domains of the six PBPs and MurM of the 22 *S. pneumoniae* isolates of the small collection that we chose were determined, with a few exceptions. The sequences of PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x exhibited mosaicism in all the isolates with reduced susceptibilities to β-lactams. The MurM sequence showed mosaicism in two isolates. For PBP 1a, PBP 2b, PBP 2x, and MurM, the amino acid sequences were aligned and clustered with the CLUSTAL W program. Sequences that differed from each other by at most 10 residues were grouped together. These groups of similar sequences are designated by capital letters and are further divided into subgroups of sequences that were identical or that differed by a single substitution. These subgroups are designated by Arabic numerals, with primes used to indicate various single substitutions (Table 2). No evidence of mosaicism was found for PBP 1b and PBP 3, although minor differences were found in a few sequences. PBP 2a sequences had only a few

TABLE 2. Characteristics of the strains and their PBP and MurM sequence types<sup>a</sup>

Strain	Yr	Source	Serogroup	MIC (µg/ml)				Sequence type <sup>b</sup>						
				PenG	AMX	CTX	CRO	1a	1b	2a	2b	2x	3	MurM
5204	1999	Sputum	14	6.0	6.0	12.0	3.0	C3	A5	A3	D1	C3	A1	A1
5268	2000	Blood	14	3.0	4.0	4.0	2.0	C3	A5	A3	D1'	C3	A1	A1
<b>4843</b>	<b>1997</b>	<b>Trachea</b>	<b>23</b>	<b>2.0</b>	<b>1.5</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>C1</b>	<b>A3</b>	<b>A6</b>	<b>C1</b>	<b>C1</b>	<b>A1</b>	<b>A1</b>
<b>4790</b>	<b>1996</b>	<b>Blood</b>	<b>23</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>C1</b>	<b>A3</b>	<b>A6</b>	<b>C1</b>	<b>C1</b>	<b>A1</b>	<b>A1</b>
5062	1999	Trachea	14	1.5	3.0	2.0	1.0	C3	A5	A3	ND	ND	A1	A1
5245	2000	Sputum	6	1.5	3.0	0.75	0.75	C2	A1	A4	E1	C2	A1	C1
5180	1999	Sputum	15	1.5	1.0	2.0	1.0	C1	A3	A6	C1	C1'	A1	A1
4883	1997	Blood	9	1.0	1.5	0.75	0.75	C1	A3	A3	C1	C1	A1	B1
5047	1999	Nose swab	9	0.75	0.50	2.0	0.50	C1	A4	A3	C1	C1	A1	A1
<b>5104</b>	<b>1999</b>	<b>Sputum</b>	<b>23</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>0.75</b>	<b>0.50</b>	<b>C1</b>	<b>A3</b>	<b>A6</b>	<b>C1</b>	<b>C1</b>	<b>A1</b>	<b>A1</b>
<b>4935</b>	<b>1998</b>	<b>Blood</b>	<b>3</b>	<b>0.50</b>	<b>0.25</b>	<b>0.38</b>	<b>0.25</b>	<b>C1</b>	<b>A3</b>	<b>A6</b>	<b>C1</b>	<b>C1</b>	<b>A1</b>	<b>A1</b>
5024	1999	Bronchus	15	0.25	0.094	0.38	0.38	A1	A2	ND	F1	A5	A1	A1
<b>5031</b>	<b>1999</b>	<b>Bronchus</b>	<b>23</b>	<b>0.25</b>	<b>0.19</b>	<b>0.19</b>	<b>0.125</b>	<b>C1</b>	<b>A3</b>	<b>A6</b>	<b>C1</b>	<b>C1</b>	<b>A1</b>	<b>A1</b>
5259	2000	Trachea	15	0.19	0.023	0.094	0.064	B1	A3	A5	B1	B1	A2	A2
4816	1997	CSF	15	0.094	<0.016	0.064	0.032	B1	A3	A5	B1	B1	A2	A2
5023	1999	Blood	3	0.064	0.032	0.032	0.047	A1''	A1	A1	A3	A3	A1	A1
4942	1998	Blood	6	0.047	0.064	0.032	0.047	A1	A3	A7	B2	A4	A1	A1
5084	1999	Eye swab	ND	0.023	<0.016	<0.016	<0.016	A1	ND	A8	A1'	A1'	A1	A1'
5074	1999	Blood	23	0.016	<0.016	<0.016	<0.016	A1''	A3	A2	A1	A1	A1	A1
4910	1998	Pleural liquid	19	<0.016	<0.016	<0.016	0.016	A1''	A1	A7	A1''	A1	A1	A1
5075	1999	Blood	6	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	C1	A3	A9	A1	A1	A1	A2
5223	2000	Bronchus	6	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	A1'	A1	A4	A2	A2	A1	A1
R6				<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	A1	A1	A1	A1	A1	A1	A1
<b>R6<sup>5031</sup></b>				<b>1.0</b>	<b>0.75</b>	<b>0.75</b>	<b>0.5</b>	<b>C1</b>	<b>A3</b>	<b>A6</b>	<b>C1</b>	<b>C1</b>	<b>A1</b>	<b>A1</b>

<sup>a</sup> Data for isolates with identical sequences are highlighted in boldface. Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; ND, not determined; PenG, penicillin G; AMX, amoxicillin; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxome.

<sup>b</sup> For PBP1a, PBP 2b, PBP 2x, and MurM, sequences that differed from each other by at most 10 residues are grouped under a capital letter, sequences that differed by at most a single residue are grouped under a single number, and primes denote single substitutions. For PBP 1b, PBP 2a, and PBP 3, each sequence that differs at a single position is designated by a number.

substitutions, but one sequence showed a pattern consistent with a possible mosaicism. The sequences of PBP 1b, PBP 2a, and PBP 3 that differed by even a single amino acid were assigned to different subgroups (Table 2).

The sequences are briefly described below, and Table 3 provides a list of the Uniprot database accession numbers, which will allow access to either the new sequences or sequences that are identical to those encountered in this study.

**PBP 1a.** Seven different sequences of the penicillin-binding domain of PBP 1a (residues 264 to 654) were found in our

study, only one of which was new. All the sequences had the E388D substitution with respect to the R6 PBP 1a sequence. In fact, R6 PBP 1a is the only publicly available sequence with a glutamate in position 388.

Seven isolates, including six of the seven most susceptible isolates and one isolate with an intermediate level of resistance, had type A1 sequences that were nearly identical to that of PBP 1a from R6. A second group consisted of type B1 sequences from isolates 5259 and 4816, which had 33 substitutions compared to the R6 sequence. The strains with B-type

TABLE 3. Uniprot accession numbers of the sequences determined in this study<sup>a</sup>

PBP 1a		PBP 1b		PBP 2a		PBP 2b		PBP 2x		PBP 3		MurM	
Group	Accession no.	Group	Accession no.	Group	Accession no.	Group	Accession no.	Group	Accession no.	Group	Accession no.	Group	Accession no.
A1	<b>Q5ZFP6</b>	A1	Q7CRA4	A1	Q8DNB6	A1	P10524	A1	P59676	A1	Q75Y43	A1	<b>Q5ZFT4</b>
A1'	Q75YN0	A2	<b>Q5ZGA4</b>	A2	<b>Q5ZG20</b>	A1'	<b>Q5ZGA8</b>	A1'	<b>Q6ZXX2</b>	A2	<b>Q5ZG15</b>	A1'	<b>Q5ZFT3</b>
A1''	Q04707	A3	Q75YK0	A3	Q97NL3	A1''	Q54532	A2	<b>Q6ZXX9</b>			A2	<b>Q5ZFT0</b>
B1	Q9RET8	A4	<b>Q5ZGA3</b>	A4	Q75YF1	A2	<b>Q5ZGB0</b>	A3	Q8G8S1			B1	<b>Q5ZFT2</b>
C1	Q54946	A5	<b>Q5ZGA2</b>	A5	Q75YE4	A3	Q8G819	A4	<b>Q6ZXX1</b>			C1	<b>Q5ZFT1</b>
C2	Q9RET6			A6	<b>Q5ZG19</b>	B1	Q9RES3	A5	<b>Q6ZXX0</b>				
C3	Q9RET4			A7	Q75YD8	B2	<b>Q5ZGA9</b>	B1	Q9R315				
				A8	<b>Q5ZG17</b>	C1	Q9RES0	C1	Q9RES9				
				A9	<b>Q5ZG18</b>	D1	<b>Q5ZGA5</b>	C1'	<b>Q6ZXX4</b>				
						D1'	<b>Q5ZGA6</b>	C2	<b>Q6ZXX3</b>				
						E1	<b>Q5ZGA7</b>	C3	Q83XA7				
						F1	<b>Q5ZGB1</b>						

<sup>a</sup> New sequences are in boldface type. For sequences that were already present in the database, the identity is complete for the fragments that we sequenced, i.e., PBP 1a (residues 264 to 654), PBP 1b (residues 310 to 752), PBP 2a (residues 301 to 431), PBP 2b (residues 313 to 680), PBP 2x (residues 266 to 616), PBP 3 (residues 25 to 297), and MurM (residues 21 to 386).

PBP 1a sequences exhibited an intermediate level of resistance. A group of four adjacent substitutions in positions 574 to 577 (TSQF to NTGY) characterized the sequences of group C, which originated from isolates with intermediate to high levels of resistance. These substitutions are known to be major determinants of  $\beta$ -lactam resistance (29). Sequences from subgroups C2 and C3 differed from C1 sequences by nine additional common substitutions scattered between positions 495 and 570. Finally, the three sequences that formed subgroup C3 lacked seven mutations in the C terminus of the penicillin-binding domain that were present in the single C2 sequence. The two most resistant isolates from our collection had C3 sequences.

A surprising finding was the presence of a mosaic PBP 1a of type C1 in a susceptible isolate (isolate 5075). As a mosaic PBP 1a does not confer resistance in the absence of low-affinity PBP 2x or PBP 2b, it is difficult to imagine that it was acquired on its own in the absence of a selective advantage. A more likely scenario is that an ancestor of isolate 5075 was resistant and had low-affinity PBP 2x and PBP 2b but that it reverted to a susceptible phenotype by acquiring again high-affinity PBP 2x and PBP 2b. If this hypothesis is correct, it implies a fitness cost of the low-affinity PBPs in the absence of selective pressure.

**PBP 2b.** Twelve different sequences of the penicillin-binding domain of PBP 2b (residues 313 to 680) were found in our collection of 22 isolates, including seven new ones. PBP 2b showed the greatest complexity of mosaicism. Consequently, the PBP 2b sequences fell into six different groups, according to our classification scheme.

Six of the seven most susceptible isolates had group A PBP 2b sequences, identical or nearly identical (subgroup A1) or very similar (subgroups A2 and A3) to that of the PBP 2b sequence from the R6 reference strain. The singly represented type A3 sequence had six substitutions, five of which were also found in other sequence groups, including T446A (see below). These mutations may be related to the low resistance level of isolate 5023, which harbors sequence type A3. Group B sequences were found in three isolates with reduced susceptibilities or low levels of resistance. Sequences B1 and B2 differed from the R6 sequence by 15 and 17 substitutions, respectively, that were well spread over the entire penicillin-binding domain. Eight isolates with intermediate and high levels of resistance contained the PBP 2b C1 sequence, which was characterized by 13 substitutions, including 11 in the second quarter of the sequenced domain (residues 412 to 489). The two isolates with the highest levels of resistance had PBP 2b D1 sequences, which had 42 and 43 substitutions, respectively, including 8 that are common to sequence type C1 and 11 that are also found in the type B1 sequence. Finally, sequence types E1 and F1 most resembled sequence type D1 but were sufficiently different to define their own groups. Sequence type E1 had 29 substitutions, 25 of which were also found in sequence type D1. Sequence type F1 had 38 mutations, 15 of which were common to sequence type D1.

Substitution T446A was found in all sequences except A1 and A2, and its effect on the affinity of PBP 2b for  $\beta$ -lactams has been well characterized (24). Substitution E476G was also present in all sequences except A1 and A2. The same sequences also have a threonine-to-serine or -alanine mutation in position 489. These substitutions in positions 476 and 489

are therefore potentially important determinants of  $\beta$ -lactam resistance.

**PBP 2x.** Eleven different sequences of the PBP 2x penicillin-binding domain (residues 266 to 616) were found among the 22 sequences determined. Six of these sequences were not present in public databases. Three groups could be identified.

Group A contained sequences that were very similar to that from the reference susceptible strain R6, including three that were identical (subgroup A1). The other group A sequences had 9 or 10 substitutions in comparison with the R6 sequence. As expected, all sequences in group A originated from the most susceptible isolates, with the exception of isolate 5024. Note that sequence types A3 (isolate 5023) and A4 (isolate 4942) contained the T338A mutation, although they differed from the R6 sequence by only 9 and 10 scattered substitutions, respectively. The mutation at position 338, next to the active-site Ser337, is a major determinant of resistance (21); and isolates 5023 and 4942 exhibited slightly reduced susceptibilities. The threonine in position 338 is replaced by a proline in sequence type A5 from isolate 5024, which had an intermediate level of resistance. This T338P substitution has already been reported in four PBP 2x sequences that have a limited number of other mutations in the penicillin-binding domain, like sequence type A5. A single sequence found in two isolates with an intermediate level of resistance (isolates 5259 and 4816) constituted group B1. This penicillin-binding domain sequence differed from that of R6 at 23 positions. Sequence type B1 lacked the T338A substitution but was characterized by the Q552E mutation, which typifies a second family of sequences. Based on the crystal structure of PBP 2x from isolate 5259, it has been proposed that the mechanism of affinity reduction for  $\beta$ -lactams in PBP 2x sequences that have the Q552E substitution is distinct from that of sequences with a mutation in position 338 (20, 25). The T338A substitution is found in the three sequences of group C, which differed from the R6 PBP 2x penicillin-binding domain by 39 to 41 mutations. Group C PBP 2x was found in isolates with intermediate to high levels of  $\beta$ -lactam resistance. Eight isolates harbored the type C1 sequence, including isolate 4790. PBP 2x from isolate 4790 has been characterized enzymatically in detail, and the crystal structure of the very similar PBP 2x from strain Sp328 has been determined (5). The Sp328 PBP 2x sequence differed from the 4790 PBP 2x sequence at only two positions in the penicillin-binding domain. Sequence type C2 differed from type C1 by the absence of the A346S and A347S substitutions, which are often associated with the T338A substitution. Sequence type C3 was present in isolates 5204 and 5268, which exhibited the greatest resistance in our collection. The C3 penicillin-binding domain is characterized by the M339F and M400T substitutions. The role of the active-site M339F mutation in decreasing the reactivity of PBP 2x for  $\beta$ -lactams has been extensively studied enzymatically and structurally (2).

**PBP 1b.** Five different sequences of PBP 1b (residues 310 to 752) were represented in our collection of isolates, including three new ones. All sequences were very similar to that from strain R6, including sequence A1, which was identical to that from strain R6 and which was found in four isolates. Isolate 5024 has a unique PBP 1b sequence with the two substitutions R526S and M527L. Sequence type A3, found in 11 isolates, was characterized by the N531K substitution. Sequence type

TABLE 4. Differences between three PBP 2a sequences suggestive of mosaicism

PBP 2a type	Location	Sequence difference for the following amino acid position, mutated nucleotide(s) <sup>a</sup>						
		354, 1061	372, 1116	425, 1273	496, 1488	586, 1756/1758	598, 1794	656, 1966
A7	Amino acid Codon	I ATA	A GCT	G GGC	V GTT	I ATT	F TTT	S TCA
A8	Amino acid Codon	T ACA	A GCC	S AGC	V GTC	I ATT	F TTT	S TCA
A3	Amino acid Codon	T ACA	A GCC	S AGC	V GTC	V GTC	F TTC	P CCA

<sup>a</sup> Boldface indicates the sequence difference.

A4 is like sequence type A3 but with an additional A575V substitution. Sequence type A5 is like sequence type A3 but with an additional G436C substitution and originates from the most resistant isolates, isolates 5204, 5268, and 5062. Only the latter mutation appears to be correlated with the resistance of the isolates that carry it. However, this correlation may simply result from the clonal origins of isolates 5204, 5268, and 5062.

**PBP 2a.** Nine different sequences of the PBP 2a penicillin-binding domain (residues 301 to 431) were found in our collection of clinical isolates, including four new sequences. The sequence from only one isolate was identical to that of PBP 2a from the susceptible laboratory strain R6 (sequence type A1); the other isolates contained up to five mutations (sequence type A9). Five of the 8 most resistant isolates of our collection had the G425S mutation (sequence type A3), and 6 of the 13 most resistant isolates had the D440N substitution (sequence type A4). PBP 2a sequence types A3 and A4 were thus found in 11 of the 13 isolates with the highest level of  $\beta$ -lactam resistance. At this stage, it is not possible to determine, without experimental testing, whether these mutations are neutral and simply reflect the lineage of the resistant isolates or if they were selected and contribute to the resistance phenotype.

A possible mosaicism was detected. Sequence type A8 from susceptible isolate 5084 had four amino acid substitutions compared to the R6 sequence. The G425S and S461A substitutions were also found in sequence type A3, whereas T354I, S461A, V586I, and P656S were also found in sequence type A7. Further examination of the nucleotide sequences of groups A8, A3, and A7 revealed that the first half of the sequence encoding the penicillin-binding domain is identical between groups A8 and A3, whereas the second half is identical between groups A8 and A7. Table 4 shows the positions that are not identical between the three sequences. Although there were too few differences from which a definitive conclusion could be drawn, the differences are consistent with an event of homologous recombination that occurred between nucleotides 1489 and 1755. This is somewhat surprising, as sequence type A8 was found in a susceptible isolate.

**PBP 3.** Most isolates from our collection had a PBP 3 penicillin-binding domain (residues 25 to 297) that was identical to that of strain R6 (sequence type A1). The single point mutation G215R defines sequence type A2, which was found in two isolates and which is new.

**MurM.** As some mosaic alleles of *murM* are known to increase resistance to  $\beta$ -lactams, we also sequenced the region that encodes MurM residues 21 to 386 (of 406 residues) from

all isolates in our collection. The sequences were classified by use of the same scheme used to classify PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x. The group A sequences did not exhibit mosaicism and were all very similar to MurM from reference strain R6, differing at least at two positions (sequence type A1) and at most by five substitutions (sequence type A2; isolates 5075 and 4816). Only isolates 4883 and 5245 had mosaic MurMs (sequence types B1 and C1, respectively), with 18 and 50 substitutions over the sequenced region, respectively, compared to the R6 reference sequence. Six substitutions were common to the B1 and C1 MurM sequence types. The publicly available sequence most similar to that of sequence type C1 was from strain 149193, although they differed at 24 positions (25). The sequence most similar to that of sequence type B1 was from strain TX7, with 14 differences (7). It is noteworthy that isolates 4883 and 5245 are not extremely resistant, despite their mosaic MurM sequences.

**Global analysis.** Regarding the distribution of the sequences among the isolates of our collection, it appears that the various alleles are not randomly associated. Table 2 shows that the resistant isolates have one of the following combinations of alleles for PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x, respectively: C3-D1-C3, C1-C1-C1, C2-E1-C2, A1-F1-A5, or B1-B1-B1. Note that a given allele for one of the three mosaic PBPs was never found to be associated with more than one allele of the two other mosaic PBPs. These associations certainly reflect the history of the emergence and the spread of resistant strains. However, some functional relationships related to possible protein-protein interactions cannot be excluded.

When the resistance levels and the sequences are considered, the first observation that can be made is that isolates 5031, 4935, 5104, 4790, and 4843 have identical penicillin-binding domains (the C1-C1-C1 combination) and MurM proteins, although they display significantly different levels of  $\beta$ -lactam resistance. MLST analysis revealed that they have the same sequence type as the reference global clone Spain 23F-1 (strain ATCC 700669). The MICs for penicillin G in these five isolates range from 0.25 to 2.0  $\mu$ g/ml and from 0.19 to 2.0  $\mu$ g/ml for cefotaxime. Isolate 5180 also had PBPs identical to those of clone Spain 23F-1, with the exception of a L600S substitution in PBP 2x.

Isolates 5259 and 4816 also had identical penicillin-binding domains and MurM proteins, but the 5259 isolate exhibited slightly greater resistance. All the PBPs of the two most resistant isolates, isolates 5204 and 5268, had nearly identical sequences. Although the PBP 2b sequences of these two isolates

belonged to the same subgroup, they nevertheless differed at a single position. Isolate 5204 had an additional K371Q mutation in PBP 2b. We cannot exclude the possibility that the higher level of resistance of isolate 5204 results from this minor difference.

**Transfer of resistance to R6.** It is generally reported that the transfer of the mosaic genes for PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x from a resistant strain to susceptible strain R6 confers the resistance of the originating strain to the recipient strain (1, 22, 28). More recently, the additional transfer of mosaic *murM* alleles was found to be required to express in R6 the full resistance of the original clinical isolate (9, 28). The finding that five isolates with identical penicillin-binding domains and MurM proteins exhibit very different levels of  $\beta$ -lactam resistance calls these tenets into question. To clarify the matter, we decided to measure the level of resistance provided to the R6 recipient strain by transfer of the three mosaic genes for PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x that are present in our five isolates with different resistance levels.

We chose the least resistant isolate, isolate 5031, as the donating strain. Complete genes encoding the three mosaic PBPs were cloned and transformed simultaneously into R6 cells. Resistant clones were selected on cefotaxime. The levels of resistance of three independent transformed clones were measured and were found to exceed that of originating isolate 5031 for all antibiotics tested. The three clones had the same MICs, which were about threefold higher than that of the originating isolate. The data in Table 2 show that the level of resistance of the transformed R6<sup>5031</sup> strains is intermediate between those of isolate 5031 and isolate 4843, the least and most resistant isolates, respectively, of our five isolates with identical penicillin-binding domains.

Insertion of the mosaic *pbp* genes was checked in the three independent clones by sequencing following PCR amplification of the fragment encoding the penicillin-binding domain. The complete penicillin-binding domain of PBP 1a from isolate 5031 had been introduced. The first two substitutions, Q281L and D311N, of the penicillin-binding domain of PBP 2x were missing from the three transformed clones. The first E333G mutation in the penicillin-binding domain of PBP 2b was also missing from one of the selected clones. These are indications that these substitutions are not important determinants of  $\beta$ -lactam resistance.

**PBP expression levels.** The expression levels of PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x in strains R6, R6<sup>5031</sup>, 5031, 4935, 5104, 4790, and 4883 were compared by immunoblotting (Fig. 1). No significant differences that could be correlated with the resistance level were observed. The R6 and R6<sup>5031</sup> strains appeared to express slightly more PBP 1a and possibly more PBP 2x than the wild strains. The electrophoretic mobility of PBP 1a from the wild resistant strains appeared to be slightly increased compared to those of the PBP 1a proteins from strains R6 and R6<sup>5031</sup>. This variation, already noted in early studies (18), is presumably due to differences in amino acid compositions, as the proteins have the same size.

## DISCUSSION

The main finding from our study is that *S. pneumoniae* clinical isolates with identical penicillin-binding domains for the

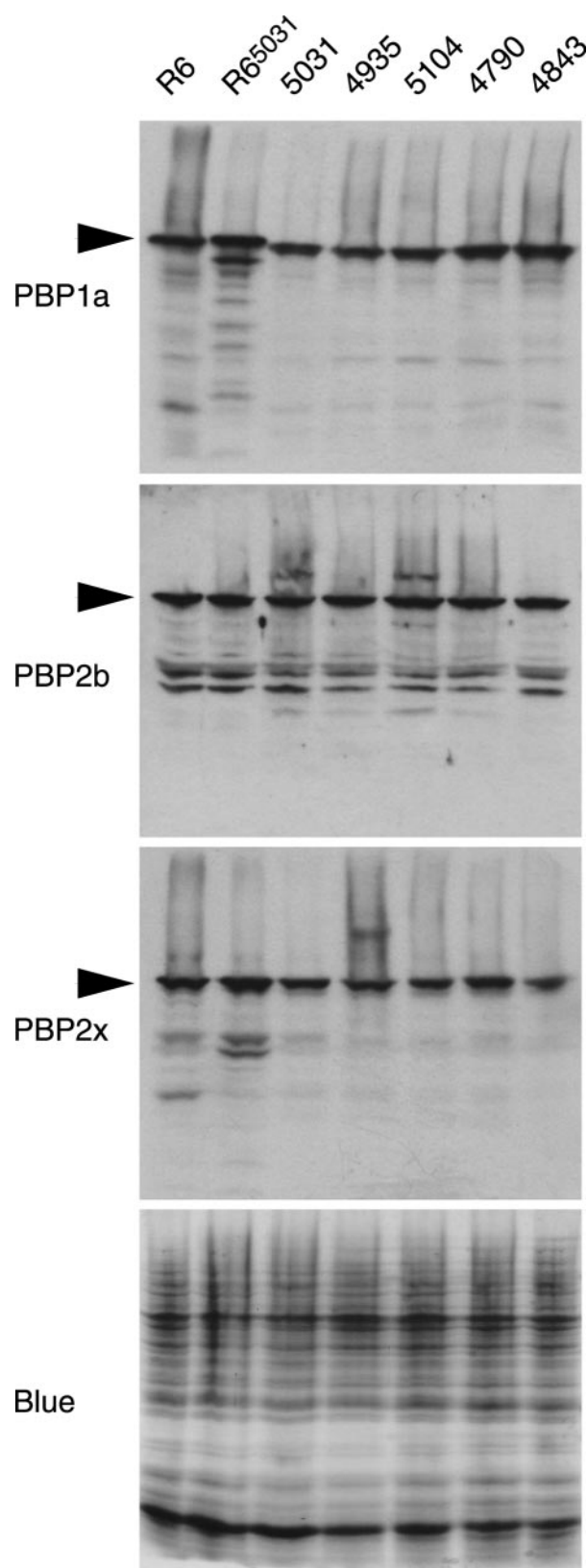


FIG. 1. Comparison by immunoblotting of the expression of PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x in strains R6, R6<sup>5031</sup>, 5031, 4935, 5104, 4790, and 4843. The Coomassie blue-stained gel shows that equivalent amounts of proteins were analyzed for each strain. The intense band at the bottom is the lysosyme added to the lysis buffer.



six PBP<sub>s</sub> and identical MurM proteins can have different levels of  $\beta$ -lactam resistance. The range of MICs for penicillin G and cefotaxime covered by our five isolates with identical PBP<sub>s</sub> and MurM is clinically relevant, as isolate 5031 is "intermediate" and isolate 4883 is "resistant," according to the classification guide lines in use in France (4). Therefore, molecular diagnostic tools based solely on the sequences of the *pbps* and *murM* genes could fail to accurately predict the level of  $\beta$ -lactam resistance of an isolate.

Laboratory strain R6 has generally been considered a standard of susceptibility. Transfer of the relevant genes from a resistant strain to R6 would usually confer to the latter the resistance level of the donor strain (1, 22, 28). When an R6 strain transformed with the *pbp* genes from a clinical strain fails to reach the level of  $\beta$ -lactam resistance of the donor strain, it is assumed that an additional resistance factor is required. In this paper, we report that the transfer of the three mosaic *pbp* genes from a clinical isolate to R6 results in a higher level of resistance than that of the donor strain. This result demonstrates that the genetic background modulates the level of resistance conferred by the PBP<sub>s</sub> and that some wild strains are less prone to resistance than laboratory strain R6. If the R6 genome is defined as the reference background that allows expression of the standard resistance of a given set of mosaic PBP<sub>s</sub>, wild genetic factors not only can increase but also can decrease the resistance level. An experimental example of such a negative factor is given by the null allele of *murM*, which suppresses completely the resistance conferred by the PBP<sub>s</sub> (9).

The nature of the positive or negative factors that modulate the resistance of isolates 5031, 4935, 5104, 4790, 4843, and R6<sup>5031</sup> is a matter of speculation. It must be noted here that the five clinical isolates belong to the same global clone (Spain 23F-1), as determined by MLST. The relative quantification of PBP 1a, PBP 2b, and PBP 2x presented in Fig. 1 rules out variation of expression as a major cause of resistance differences. Although the sequences of the various penicillin-binding domains were identical, we do not know if this identity extends to the other domains of the proteins. We cannot exclude the possibility that substitutions in non-penicillin-binding domains may alter the resistance. It has been suggested that sequence regions outside the active site permit a more or less optimal functioning of the PBP<sub>s</sub>, depending on their compatibility with interacting partners in putative multienzymatic complexes that synthesize the peptidoglycan (2, 10).

The nature of the capsule may conceivably affect the MICs for various antibiotics by altering the diffusion of the small molecules toward the bacterial cell wall. However, isolates 4843, 4790, 5104, and 5031 are of the same serotype, serotype 23. Therefore, their capsules must be very similar, if not identical, and are probably not responsible for modulating the  $\beta$ -lactam resistance.

Besides *murM*, several non-*pbp* genes were found to affect  $\beta$ -lactam resistance. Point mutations in the *ciaH* gene, which encodes a histidine protein kinase, were selected in the laboratory upon selection with cefotaxime (12), whereas *cpoA* mutants (*cpoA* encodes a putative glycosyltransferase) were selected with piperacillin (11).

The above examples are of single genes that influence  $\beta$ -lactam resistance. It is also possible that multiple genes may

subtly affect the MICs for various antibiotics or even that the overall fitness of a strain can modify the level of PBP-based resistance. Therefore, a complete understanding of the resistance mechanism would require the genome-wide comparison of many strains with different or similar resistance profiles, followed by experimental testing through gene transfers. Meanwhile, an imperfect sequence-based method able to rapidly qualify an isolate in the categories susceptible, reduced susceptibility, or likely to be highly resistant (6, 8, 14–16, 30) may already be developed and provide some benefit in clinical settings.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dominique Champelovier and Benoit Gallet for technical assistance, as well as Hervé Duborjal and Jean-François Mouret at GenomeExpress for DNA sequencing.

We acknowledge the use of the pneumococcal MLST database, which is located at Imperial College London and which is funded by the Wellcome Trust. This work was supported by a fellowship to L.C. and a grant from the Région Rhône Alpes and was partially funded by the 6th European Framework Program (COBRA LSHM-CT-2003-503335).

#### REFERENCES

1. Barcus, V. A., K. Ghanekar, M. Yeo, T. J. Coffey, and C. G. Dowson. 1995. Genetics of high-level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**:299–303.
2. Chesnel, L., L. Pernot, D. Lemaire, D. Champelovier, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet, and A. Zapun. 2003. The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* further decreases the susceptibility to beta-lactams of resistant strains. *J. Biol. Chem.* **278**:44448–44456.
3. Coffey, T. J., C. G. Dowson, M. Daniels, and B. G. Spratt. 1995. Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. *Microb. Drug Resist.* **1**:29–34.
4. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2004. Communiqué 2004. Société Française de Microbiologie Janvier 2004. [Online.] <http://www.sfm.asso.fr/doc/casfm/download.php?fichier=Comm2004.pdf>. Accessed 30 September 2004.
5. Dessen, A., N. Mouz, E. Gordon, J. Hopkins, and O. Dideberg. 2001. Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J. Biol. Chem.* **276**:45106–45112.
6. du Plessis, M., A. M. Smith, and K. P. Klugman. 1999. Application of *pbp1A* PCR in identification of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **37**:628–632.
7. Enright, M. C., and B. G. Spratt. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**:3049–3060.
8. Filipe, S. R., E. Severina, and A. Tomasz. 2000. Distribution of the mosaic structured *murM* genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **182**:6798–6805.
9. Filipe, S. R., and A. Tomasz. 2000. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:4891–4896.
10. Grebe, T., and R. Hakenbeck. 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:829–834.
11. Grebe, T., J. Paik, and R. Hakenbeck. 1997. A novel resistance mechanism against beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae* involves CpoA, a putative glycosyltransferase. *J. Bacteriol.* **179**:3342–3349.
12. Guenzi, E., A. M. Gasc, M. A. Sicard, and R. Hakenbeck. 1994. A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **12**:505–515.
13. Hakenbeck, R., A. König, I. Kern, M. van der Linden, W. Keck, D. Billot-Klein, R. Legrand, B. Schoot, and L. Gutmann. 1998. Acquisition of five high-*M*, penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **180**:1831–1840.
14. Ho, P. L., R. C. Wong, F. K. Chow, M. Y. Cheung, S. S. Wong, W. C. Yam, and T. L. Que. 2004. Application of a multiplex *pbp2b* and *pbp2x* PCR for prediction of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:890–891.

15. **Jalal, H., S. Organji, J. Reynolds, D. Bennett, E. O'Mason, Jr., and M. R. Millar.** 1997. Determination of penicillin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* using the polymerase chain reaction. *Mol. Pathol.* **50**:45–50.
16. **Kearns, A. M., C. Graham, D. Burdess, J. Heatherington, and R. Freeman.** 2002. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases. *J. Clin. Microbiol.* **40**:682–684.
17. **Krauss, J., and R. Hakenbeck.** 1997. A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:936–942.
18. **Martin, C., C. Sibold, and R. Hakenbeck.** 1992. Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *EMBO J.* **11**:3831–3836.
19. **Morlot, C., A. Zapun, O. Dideberg, and T. Vernet.** 2003. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* **50**:845–855.
20. **Mouz, N., A. M. Di Guilmi, E. Gordon, R. Hakenbeck, O. Dideberg, and T. Vernet.** 1999. Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J. Biol. Chem.* **274**:19175–19180.
21. **Mouz, N., E. Gordon, A. M. Di Guilmi, I. Petit, Y. Petillot, Y. Dupont, R. Hakenbeck, T. Vernet, and O. Dideberg.** 1998. Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13403–13406.
22. **Munoz, R., C. G. Dowson, M. Daniels, T. J. Coffey, C. Martin, R. Hakenbeck, and B. G. Spratt.** 1992. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **6**:2461–2465.
23. **Nagai, K., T. A. Davies, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum.** 2002. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1273–1280.
24. **Pagliero, E., L. Chesnel, J. Hopkins, J. Croize, O. Dideberg, T. Vernet, and A. M. Di Guilmi.** 2004. Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1848–1855.
25. **Pernot, L., L. Chesnel, A. Le Gouellec, J. Croize, T. Vernet, O. Dideberg, and A. Dessen.** 2004. A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J. Biol. Chem.* **279**:16463–16470.
26. **Reichmann, P., A. Konig, A. Marton, and R. Hakenbeck.** 1996. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **2**:177–181.
27. **Sanbongi, Y., T. Ida, M. Ishikawa, Y. Osaki, H. Kataoka, T. Suzuki, K. Kondo, F. Ohsawa, and M. Yonezawa.** 2004. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2244–2250.
28. **Smith, A. M., and K. P. Klugman.** 2001. Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2393–2396.
29. **Smith, A. M., and K. P. Klugman.** 2003. Site-specific mutagenesis analysis of PBP 1A from a penicillin-cephalosporin-resistant pneumococcal isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:387–389.
30. **Ubukata, K., Y. Asahi, A. Yamane, and M. Konno.** 1996. Combinational detection of autolysin and penicillin-binding protein 2B genes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**:592–596.
31. **Weber, B., K. Ehlert, A. Diehl, P. Reichmann, H. Labischinski, and R. Hakenbeck.** 2000. The fib locus in *Streptococcus pneumoniae* is required for peptidoglycan crosslinking and PBP-mediated beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**:81–85.

## II Séquences des oligonucléotides pour la mutagenèse dirigée de PBP2x et PBP1a

Oligonucléotides	Séquences (5'→3')	Sites de restriction diagnostic
<b>Mutagenèse de 5204-PBP2x</b>		
L281Q	GGATGCCTTTCAAGAAAAAGTTAAAGGTAAGTACATG	MseI
N311D	CAACGACCTACCTTCGATGCAGATACTAAAG	TaqI
S337A	CAAAGTAACTATGAACCCGGGCAGCCTTTAAGGTCATG	AgeI
A338T	GTAECTATGAACCAGGATCGACCTTTAAGGTCATGATGTTAGC	TaqI
A338T/F339M	CAACGACCTACCTTCGATGCAGATACTAAAG	TaqI
S346A	GGTCATGATGTTAGCTGCTTCGATTGATAATAATACCTTCCC	TaqI
S347A	GGTCATGATGTTAGCTAGCGCTATTGATAATAATACCTTCCC	HhaI
S355G	GATAATAATACCTTCCCCGGTGGAGAATACTTCAATAGC	MspI
Y358V	CTTCCCAAGTGGAGAAGTCTTTAATAGCAGTGAATTC	MseI
F364L	CTTCAATAGCAGTGAATTAATAAATAGCGGATGCGACG	MseI
T371I	GCGGATGCGACGATCCGAGATTGGGATGTTAATG	Sau3AI
T382G	GGGATGTTAATGCCGGTTTGACTGGTGGTGGGATGATG	MspI
G384R	GGTTTGACTACCGGTCCGATGATGAC	SmaI
L389T	GTGGGATGATGACGTTCTCACAAGGTTTTCGC	HpyCH4IV
T400M	CAGTAATGTTGGCATGAGTCTACTTG	NlaIII
S401T	CCAGTAATGTTGGAACGACGTTACTTGAACAAAAAATGGG	HpyCH4IV
K417N	GTTGGATTATCTAAATCGATTTAAATTTGGGGTTCC	TaqI
S444N	CTTCCAGCTGATAATATTGTTAATATTGCTCAAAGCTCATTTGGG	MseI
L462I	GTGACACAAACACAAATGATCCGTGCCTTACAGCTATTG	Sau3AI
T486P	GTGCTATTTATGATCCTAACAATCAGTCTG	Sau3AI
N488D	GCTATTTATGATACTAACGATCAGTCTGTACGTAAG	Sau3AI
S490T	GATACTAACAATCAGACTGTCCGGAAGTCACAAAAAGAAATAG	MspI
V491A	GATACTAACAATCAGTCTGCTCGAAAGTCACAAAAAGAAATAG	TaqI
E506D	CTGTTTCCAAAGACGCAGCTAGCACAACTCG	BfaI
T510L	CAAAGAGGCAGCAAGCTTAACTCGAAATCACATG	MseI
N513T	CAGCAAGCACAACTCGTACTCACATGATCTTAGTTG	RsaI
H514N	CACAACTCGAAATAACATGATCCTAGTTGGGACGG	BfaI
I516V	CTCGAAATCACATGGTACTAGTTGGGACGGACC	RsaI
L523V	GTTGGGACGGACCCGGTATATGGAAGTATG	MspI
Y531S	GGAECTATGTATAATCACTCGACAGGAAAGCCAATTATAAC	TaqI
I536T	CACTACACAGGAAAGCCAACGATCACAGTTCCTGGACAAAATG	Sau3AI
I537V	CACAGGAAAGCCGATCGTAACAGTTCCTG	Sau3AI
V546L	GGACAAAATGTAGCTCTTAAATCCGGTACG	AluI
S565L	GGATACTTGGTTGGTTTAAACCAATTATATTTTCTCAG	MseI
N567D	GATACTTGGTTGGTTTCGACCGATTATATTTTCTCAG	TaqI
V572A	CAATTATATTTTCTCAGCTGTTAATATGAATCCTG	MseI
N574S	CAATTATATTTTCTCAGTTGTGTGATGAATCCTGCTGAAAAATCTG	TaqI
N576S	CAGTTGTGAATATGTCTCCAGCTGAAAAATCTG	AluI
F595Y	GCCTGAGCATTATCCGGTATCCAGTTG	MspI
T605N	GAGAATTTGCCAACCCGATCTTGGAGCGGG	Sau3AI
E616D	CTTCAGCTATGAAAGATTCTCTTAATCTTCAATCTCCAG	MseI

**Mutagenèse de R6-****PBP2x**

S337A	CAAAGTAACTATGAGCCCGGGGCCACTATGAAAGTGATG	SmaI
T338A	CATCTCTTTCATAGCGGATCCTGGCTCATAGTTA	BamHI
M339F	GTAAGTATGAGCCAGGTTCCACTTTTAAAGTGATGATGTTGGC	DraI
T338A/M339F	GTAAGTATGAGCCAGGATCCGCTTTTAAAGTGATGATGTTGGC	DraI/BamHI
I371T	GCAGATGCCACGACGCGTGATTGGGACGTTAATG	MluI
R384G	GAAGGATTGACCGGTGGCGGAATGATGACTTTTTC	AgeI
M400T	CAAGTAACGTTGGTACCACCCTCCTTGAG	KpnI
D567N	CTAGTCGGGTAACTAATTATATTTCTCGGCTG	AseI
N605T	CAGTTGGGAGAATTCGCGACTCCTATCTTGGAGCGG	NruI

**Mutagenèse de 5204-****PBP1a**

A371T	CCAATCGTGACTGGGGGTCGACTATGAAACCAATCACC	Sall
N(574)TGY→TSQF	GAAATTGAAAAACACATCAAGACGTCTCAATTTGTAGCTCCAGAT GAAATG	AatII

**Mutagenèse de R6-****PBP1a**

T371A	GTGATCGGTTTCAgAGcTcATCCCCAGTCG	SacI
T(574)SQF→NTGY	GAAAACCACATCAAGAACACTGGATACGTAGCACCTGATGAACTA TTTG	SnaBI

## Résumé

Les Penicillin-Binding Proteins (PBP) sont des enzymes intervenant dans les étapes finales de la synthèse de la paroi bactérienne et sont les cibles des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. Dans les souches cliniques de *Streptococcus pneumoniae* résistantes aux  $\beta$ -lactamines, les PBPs ont de nombreuses mutations qui ont pour effet une diminution d'affinité de ces enzymes pour les antibiotiques. Il y a en moyenne 40 substitutions dans le domaine transpeptidase des deux acteurs majeurs de la résistance PBP2x et PBP1a.

Des études précédentes ont décrit le rôle de quatre mutations de PBP2x et de trois de PBP1a, mais celles-ci ne sont responsables que d'une partie de la résistance. Il n'y a très probablement qu'un nombre restreint de mutations responsables de la perte d'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines ayant pour conséquence une augmentation du niveau de résistance.

Pour identifier toutes les mutations impliquées, une série de protocoles automatisés permettant de faire de la mutagenèse dirigée, de l'expression, de la purification et de la caractérisation fonctionnelle d'enzymes en utilisant des robots de types manipulateurs de liquides ont été développés. L'application de cette méthode nous a permis de réaliser une caractérisation exhaustive de plus de 40 mutations de PBP2x de la souche clinique résistante 5204. Cette étude a abouti à l'identification de toutes les substitutions clés ainsi qu'à l'élucidation d'un nouveau mécanisme moléculaire de baisse d'affinité de PBP2x pour les  $\beta$ -lactamines. De plus, une étude fonctionnelle et phénotypique de la résistance impliquant PBP1a a été réalisée.

Ce travail apporte une vue globale des mécanismes moléculaires de la résistance de *S. pneumoniae* aux  $\beta$ -lactamines impliquant les PBPs en utilisant une méthode exhaustive originale.

## Abstract

Penicillin-Binding Proteins (PBP) are enzymes catalyzing the final steps of the bacterial cell-wall synthesis and are the targets of the  $\beta$ -lactam antibiotics. There are many amino acid substitutions in PBPs of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* resistant to  $\beta$ -lactams, leading to a decrease of the affinity of these enzymes for antibiotics. There are about 40 substitutions in the transpeptidase domain of the two major resistant determinants PBP2x and PBP1a.

Former studies have described the role of four mutations of PBP2x and three of PBP1a. But these mutations explain only a part of the resistance phenomenon. Only a few mutations may be involved in the loss of affinity of PBPs for  $\beta$ -lactam antibiotics leading to an increase of the resistance level.

To identify all the relevant mutations, a set of automated protocols allowing to do site-directed mutagenesis, expression, purification and functional characterization of enzymes using automated liquid-handling systems was developed. An exhaustive characterization of more than 40 mutants of PBP2x of the highly resistant clinical isolate 5204 was performed using this method. All the relevant substitutions were identified and a new molecular resistance mechanism to  $\beta$ -lactams was elucidated. Moreover, a functional and phenotypic study of the resistance involving PBP1a was performed.

This work provides a global view on the molecular mechanisms of the PBP-mediated resistance of *S. pneumoniae* to  $\beta$ -lactams using an original exhaustive method.