

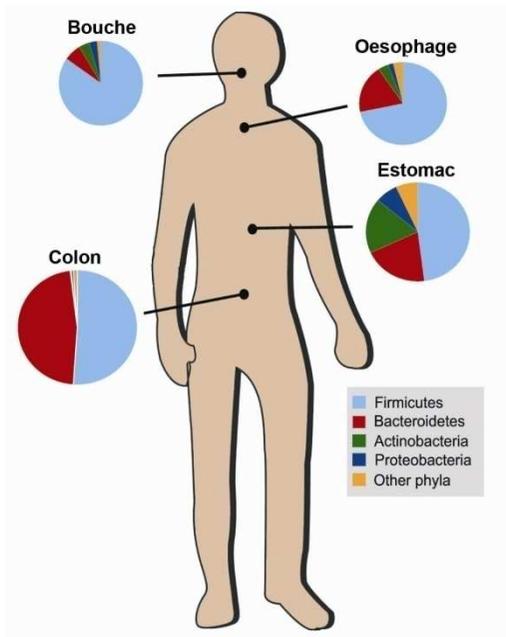


**Nouvelle chimie pour la modification des protéines et  
des ARNs :  
Des enzymes radicalaires impliquées dans les interactions  
bactéries/hôte et la résistance aux antibiotiques**

**Olivier Berteau**  
Institut MICALIS

Une enzyme radical SAM impliquée dans  
les interactions entre les bactéries  
commensales et l'Homme ?

# L'Homme est naturellement colonisé par des bactéries



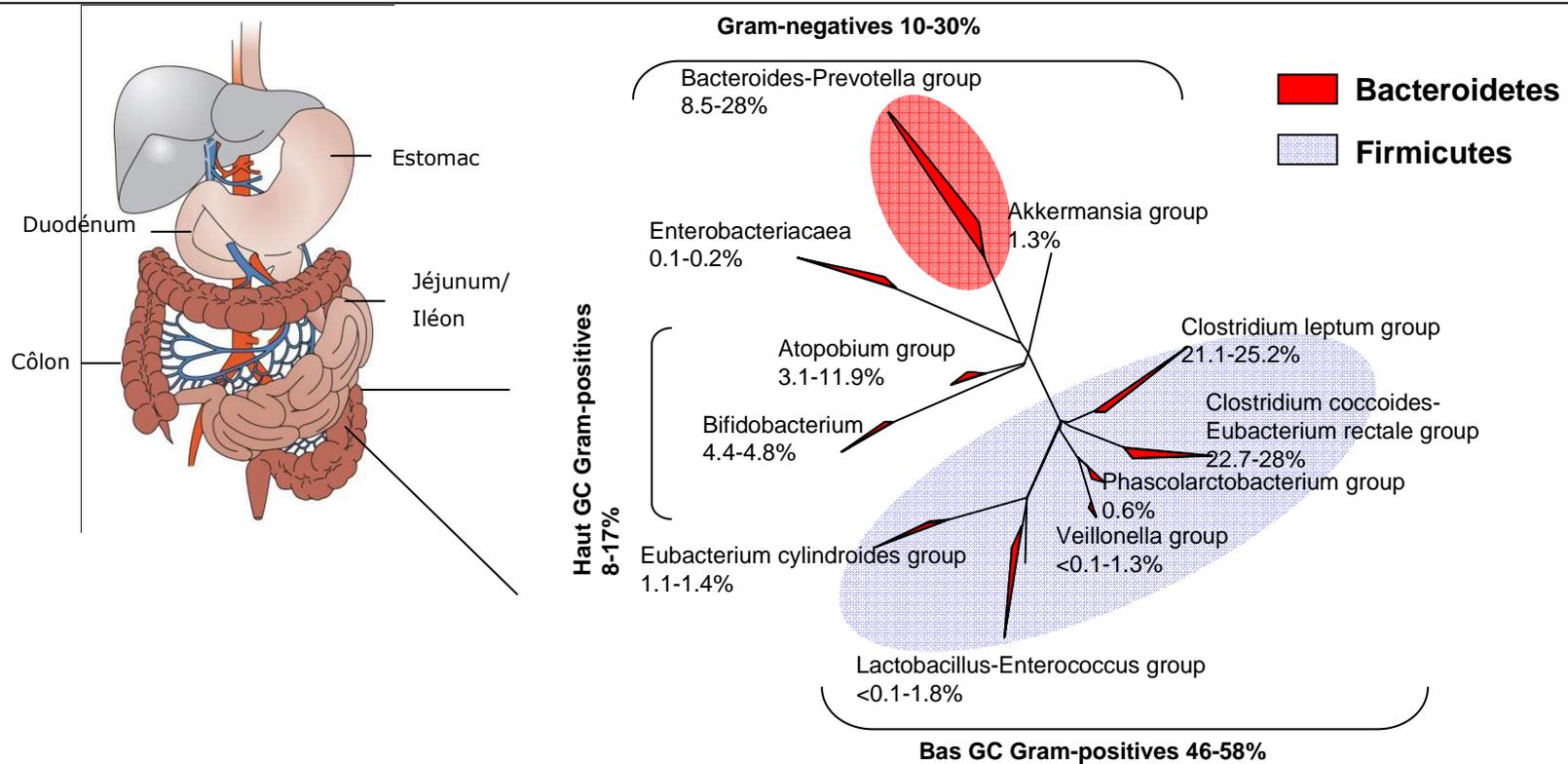
D'après Dethlefsen et al., 2007

**Des bactéries présentes sur tous les épithélia (peau, bouche, tube digestif..)**

**Ces bactéries jouent de nombreux rôles dans la physiologie humaine (production de vitamines, maturation du système immunitaire, rôle dans les pathologies humaines ?...)**

**Quelles sont les bases moléculaires de l'adaptation de ces bactéries à leur hôte ?**

# ...en particulier au niveau du tube digestif



D'après Turnbaugh et al., 2007 Nature;449(7164):804-10

- 10 fois plus de bactéries que de cellules dans le corps humain ( $10^{14}$  bactéries)
- 150 fois plus de gènes que dans le génome humain (Qin et al. 2010 Nature. 2010 Mar 4;464(7285):59-65.)

2 phyla dominants : Firmicutes et Bacteroidetes

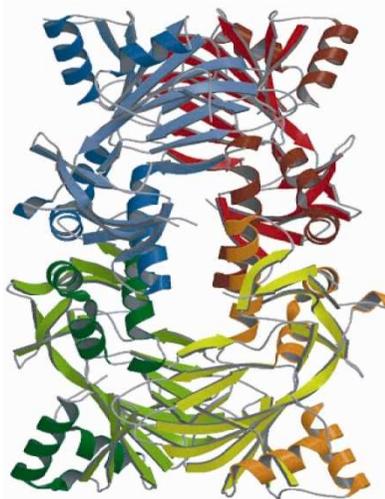
**Comment persistent-ils dans le corps humain ?**

**Quel est leur impact sur l'hôte ?**

# Les sulfatases, un rôle dans l'adaptation des bactéries à l'Homme ?

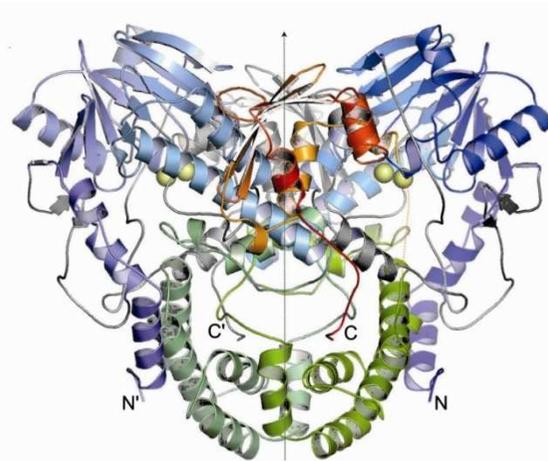
Une famille d'enzymes diverse dans ses mécanismes et ses structures

Fe(II)  $\alpha$ -cétoglutarate-dépendante Dioxygénase



(Müller I. *et al.*, *Biochemistry*. 2004  
Mar 23;43(11):3075-88)

Alkylsulfatase dépendante du zinc



(Hagelueken G. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006  
May 16;103(20):7631-6)

Arylsulfatase



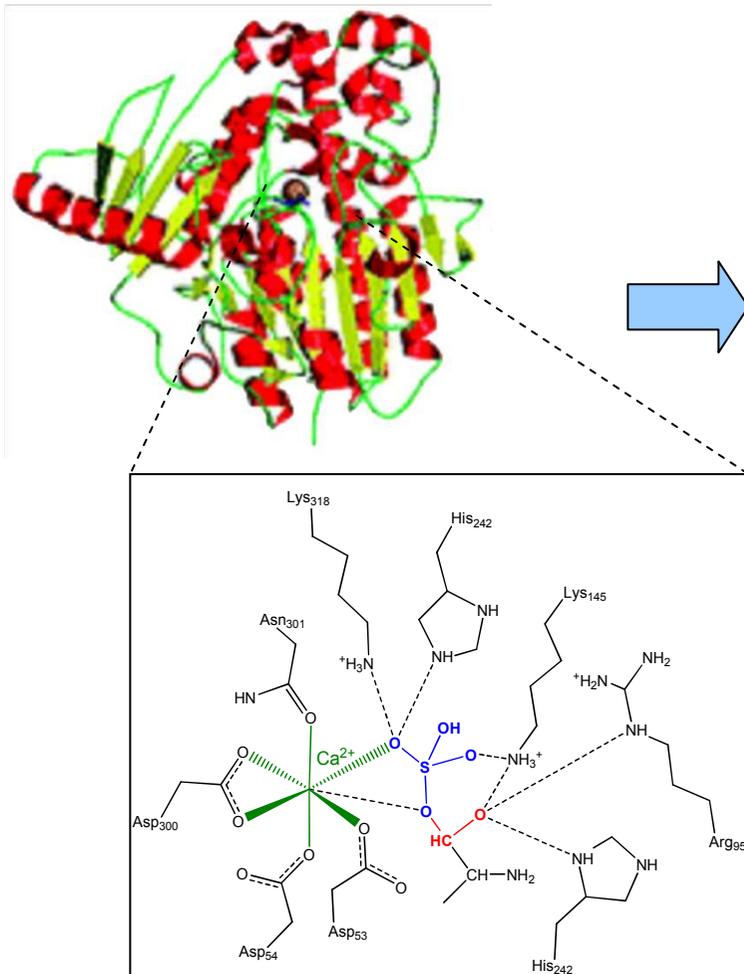
(Boltes I. *et al.*, *Structure*. 2001  
Jun;9(6):483-91)



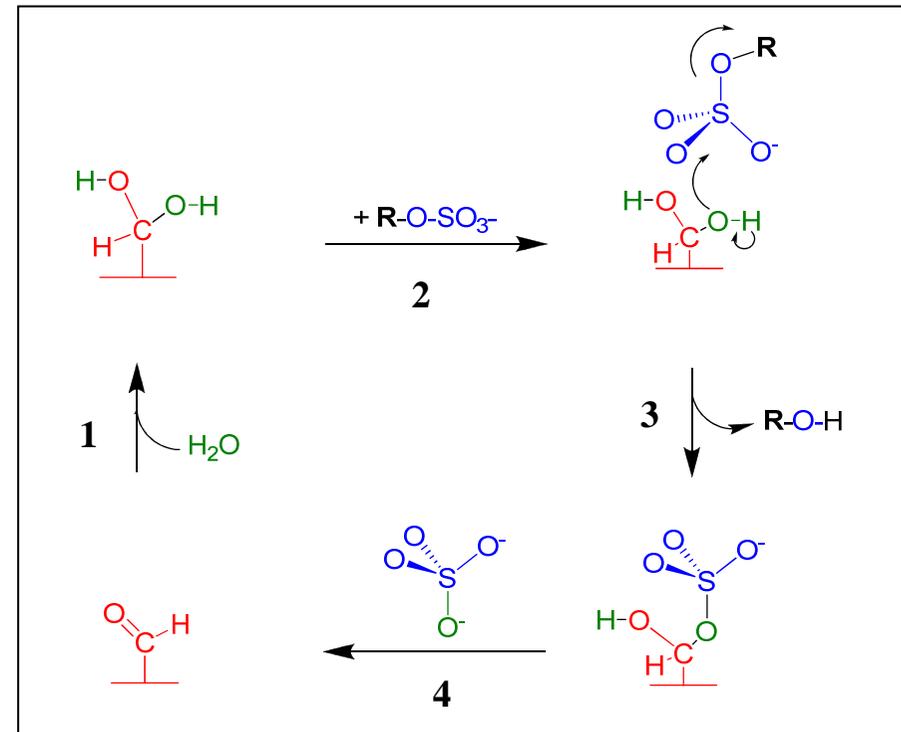
**Les arylsulfatases, une famille d'enzymes très répandue des bactéries à l'Homme**

# Un acide aminé modifié dans le site actif des sulfatases

## Structure de la sulfatase de *P. aeruginosa*



## Mécanisme proposé pour les sulfatases



(D'après Lukatela *et al.*, 1998 Biochemistry 17;37(11):3654-64)

⇒  **$\text{C}_\alpha$ -formylglycine**

# Génération de la C $\alpha$ -formylglycine chez les bactéries et l'Homme

Une séquence consensus cible :

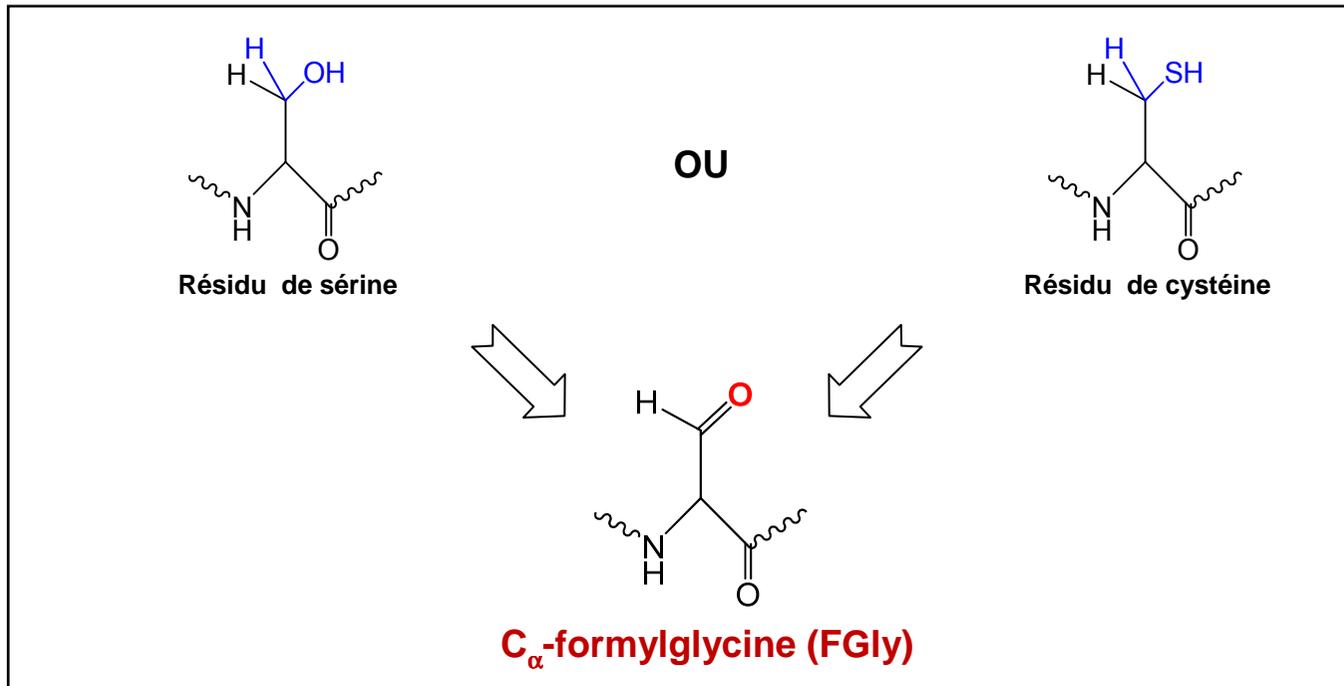
Chez les procaryotes

Cys-type sulfatases : **CxPxR**

Ser-type sulfatases : **SxPxR**

Chez les eucaryotes

Cys-type sulfatases : **CxPxR**



# Génération de la C $\alpha$ -formylglycine chez les bactéries et l'Homme

Plusieurs systèmes de maturation : **FGE** & **AtsB**

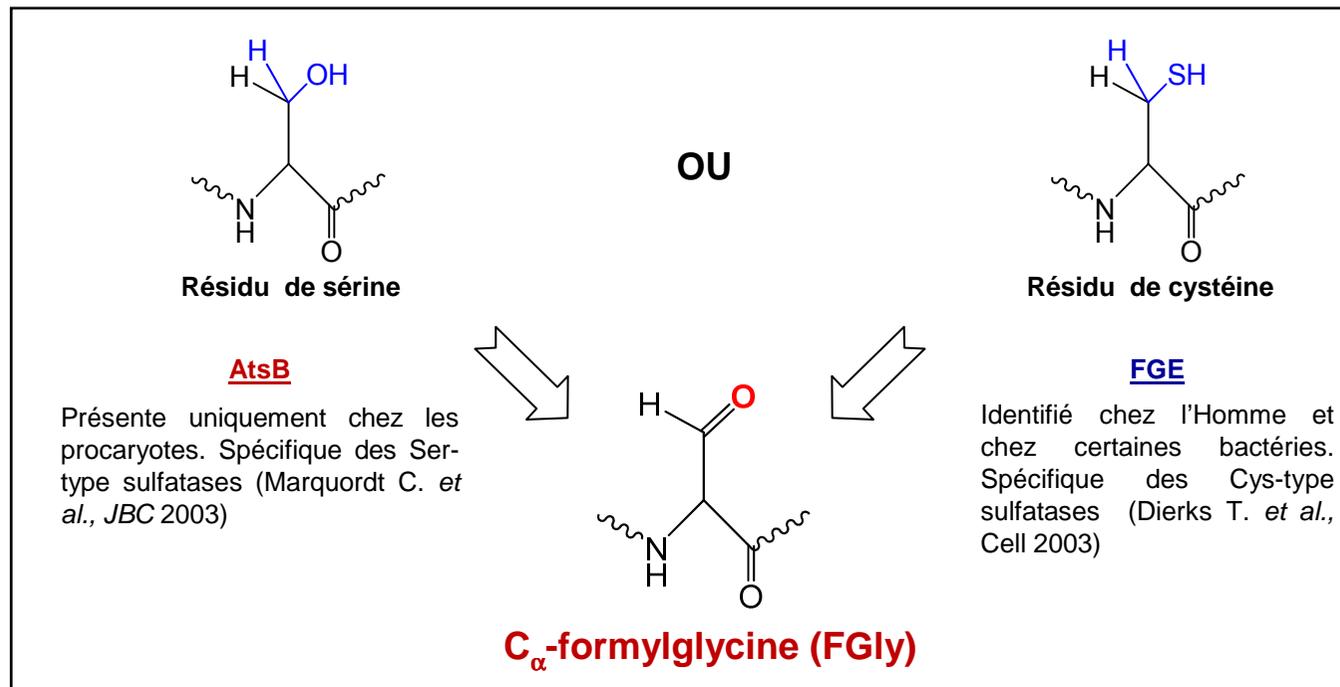
## Chez les procaryotes

Cys-type sulfatases : **CxPxR**

Ser-type sulfatases : **SxPxR**

## Chez les eucaryotes

Cys-type sulfatases : **CxPxR**



**Comment sont maturées les «Cys-type» sulfatases chez les bactéries ?**

**Quel est le mécanisme de l'enzyme AtsB ?**

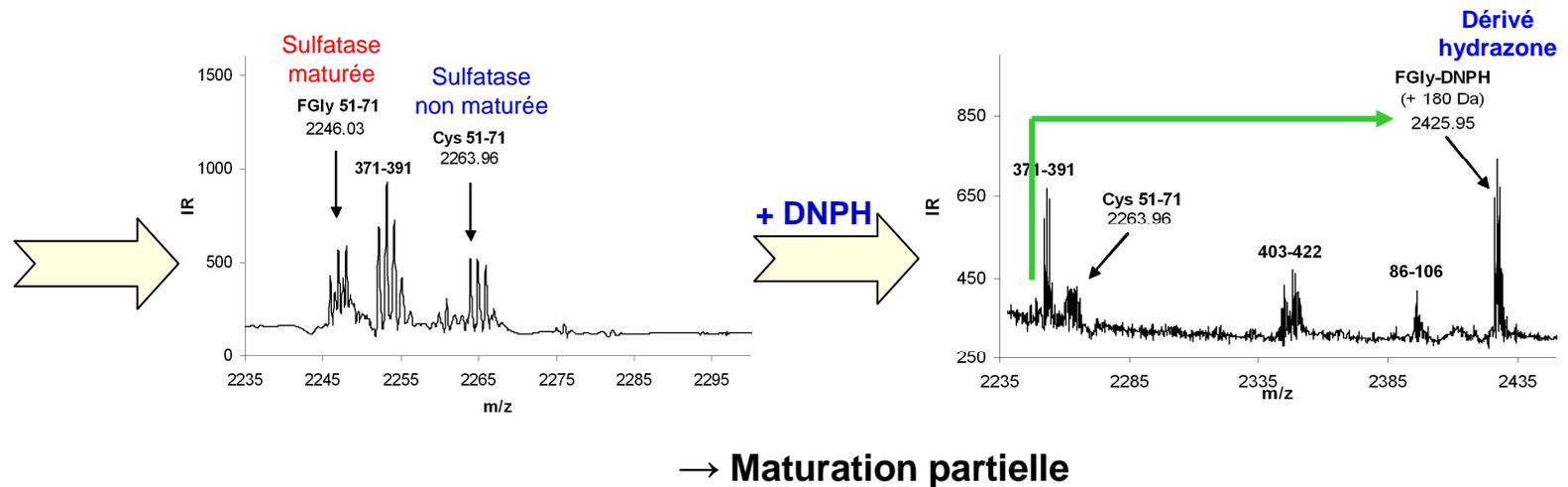


# Chez la bactérie pathogène *Clostridium perfringens*

## Clonage et expression de la sulfatase



## Analyse par spectrométrie de masse

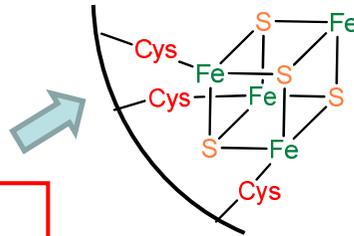


⇒ La sulfatase de *C. perfringens* exprimée chez *E. coli* est active

L'enzyme AtsB de *C. perfringens* est-elle responsable de sa maturation ?



# Séquence protéique d'anSME<sub>cpe</sub>



**Motif 1 :**  
**C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>2</sub>-C**

MPPLSLLIKPASSG**C**NL**K**C**T**Y**C**FYHSLSDNRNVKSYGIMRDEVLESMVKRVLNEADGHC  
SFAFQGGEPILAGLEFFERLMELQQRKHNYKNLKIYNSLQTNGLIDESWAKFLSENKFL  
VGLSMDGPKEIHNLNRKDCCGLDTFSKVERAAELFKKYKVEFNILCVVTSNTARHVNKI  
YRYFKEKDFKFLQFINCLDPLYEEKGKYNYSCLKPQDYTKFLKNLFDLWYEDFLNGNRVS  
IRYFDGLLETILLGKSS**S**CGMNGT**C**TCQFVVESDGSVYP**C**DFYVLDKWRLGNIQDMTMK  
ELFETNKNHEFIKSSFKVHEE**C**KK**C**KWFKL**C**KGG**C**RRCRDSKEDSDLELNYY**C**QSYKEF  
FEYAFPRLINVANNIK

**Motif 2 :**  
**C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>14</sub>-C**

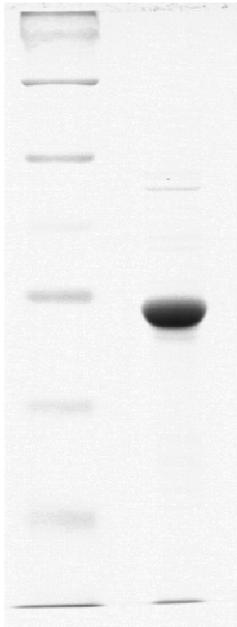
**Motif 3:**  
**C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>17</sub>-C**

⇒ **Le motif “radical SAM”**

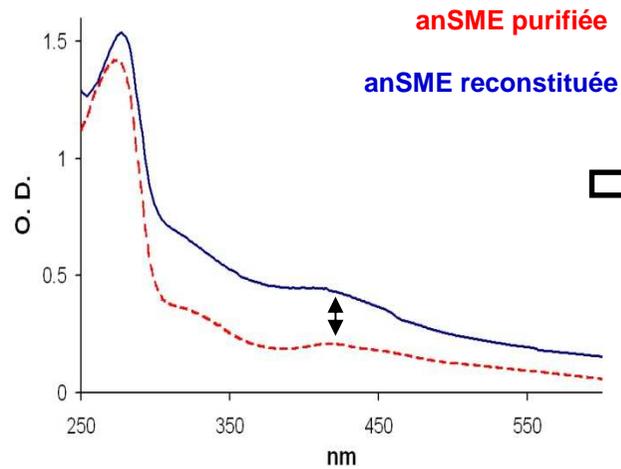
⇒ **Deux autres motifs conservés dans cette famille d'enzymes**

# Caractérisation biochimique d'anSME<sub>cpe</sub>

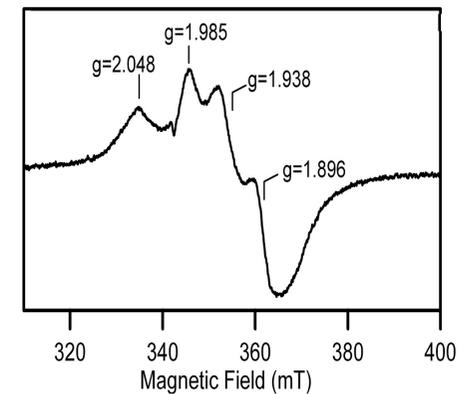
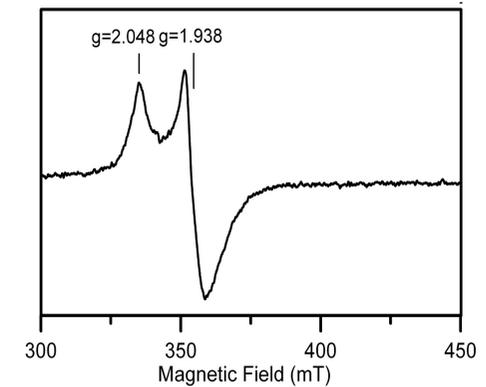
## Purification



## Spectre UV-visible

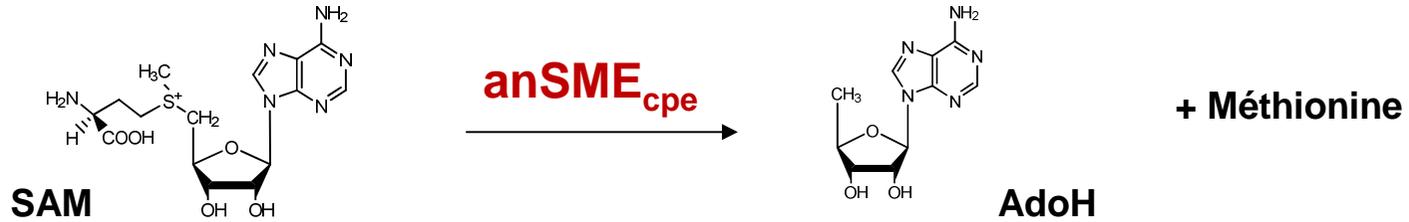


## Spectre RPE d'anSME

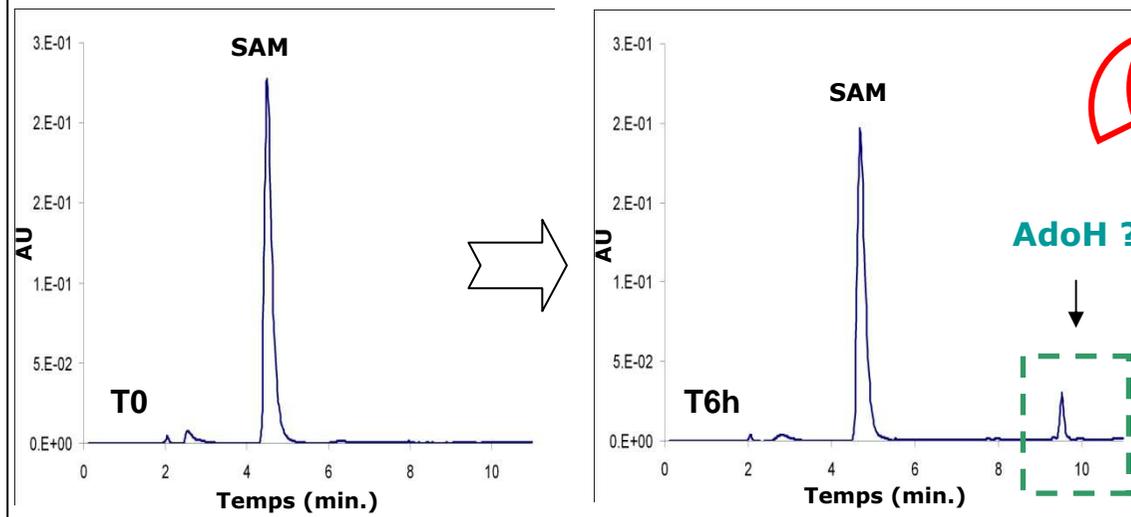


⇒ Trois centres [4Fe-4S] présents dans l'enzyme dont un centre « radical SAM »

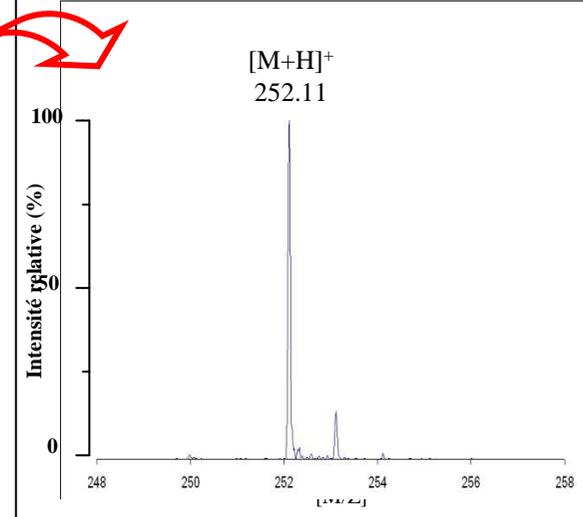
# Caractérisation biochimique d'anSME<sub>cpe</sub>



## Analyse par chromatographie HPLC



## Analyse par MALDI-TOF MS

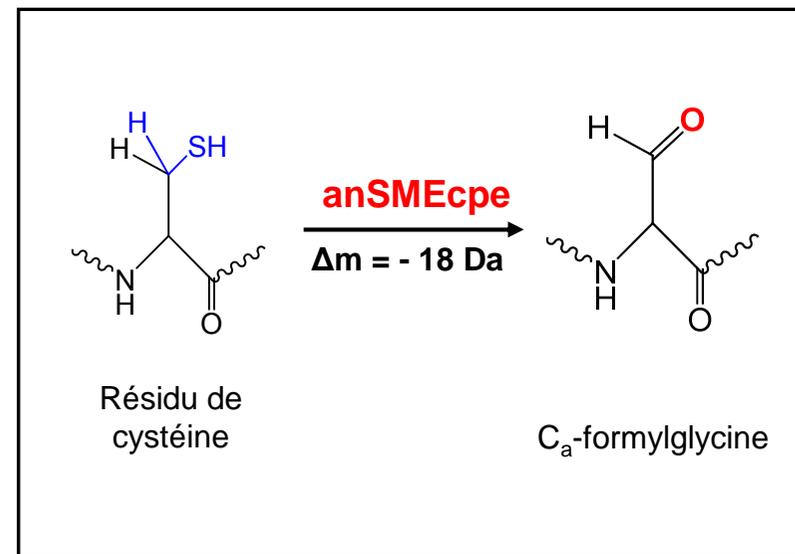
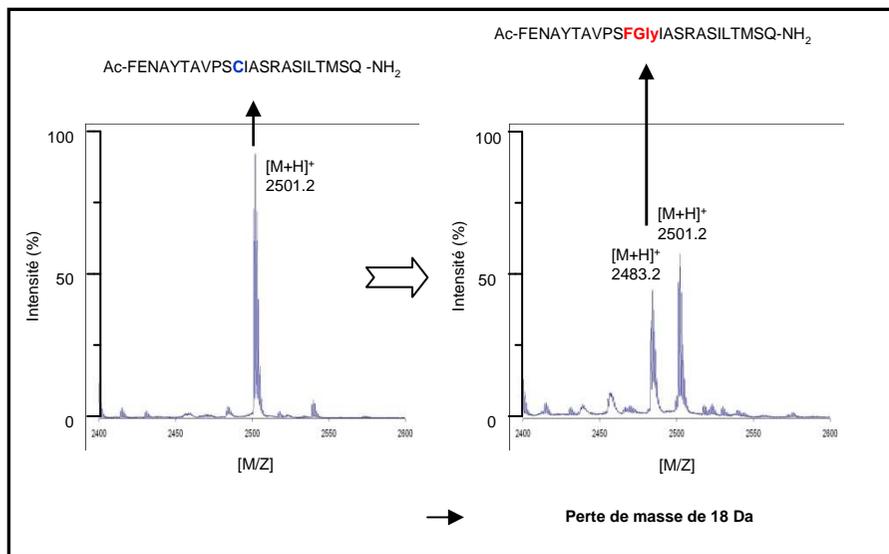


⇒ AnSME clive la SAM en 5'- deoxyadénosine

# Caractérisation biochimique d'anSME<sub>cpe</sub>

Choix d'un peptide de 23 acides aminés :

- Correspondant à la séquence de la sulfatase de *C. perfringens*
- Contenant le résidu de cystéine à maturer (motif : **C**xAxR)

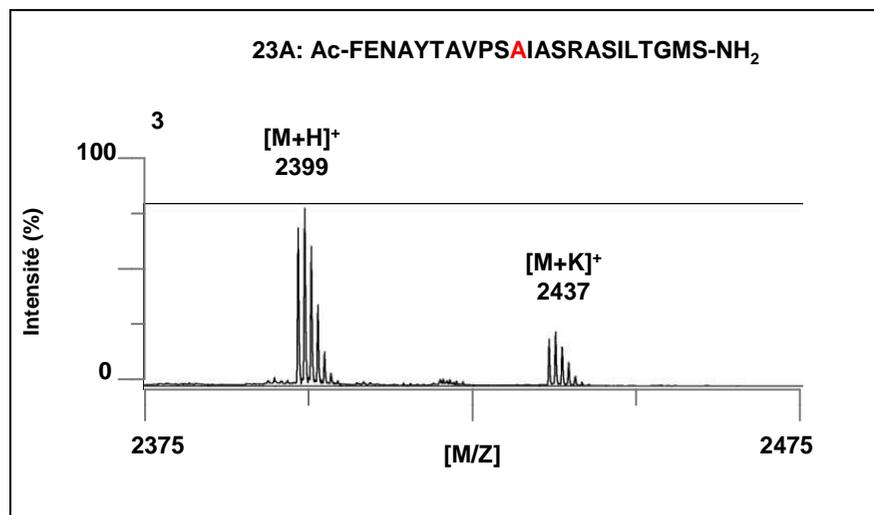
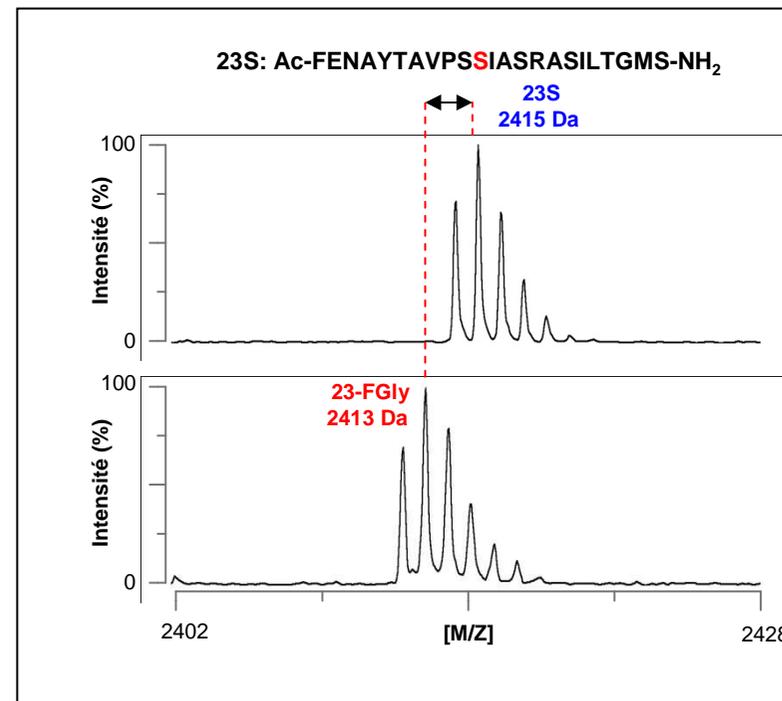
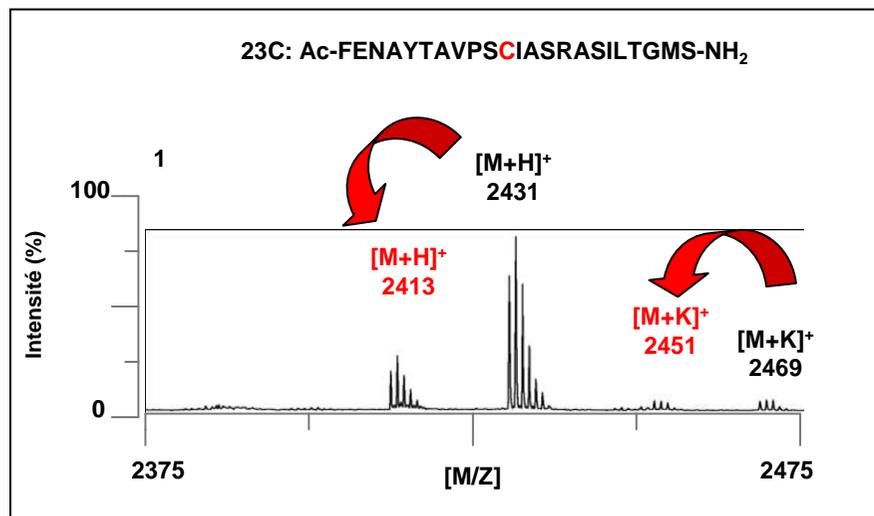


⇒ **Formation de la C<sub>α</sub>-formylglycine *in vitro* sur un peptide substrat**

**Cette enzyme est-elle spécifique du résidu cystéine ?**

**Comment catalyse-t-elle en conditions anaérobies l'oxydation d'une cystéine ?**

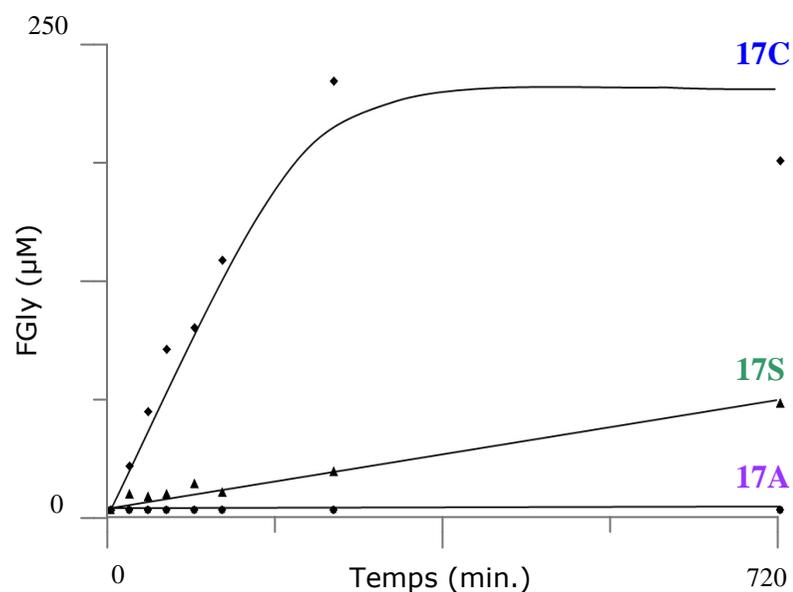
# Caractérisation biochimique d'anSME<sub>cpe</sub>



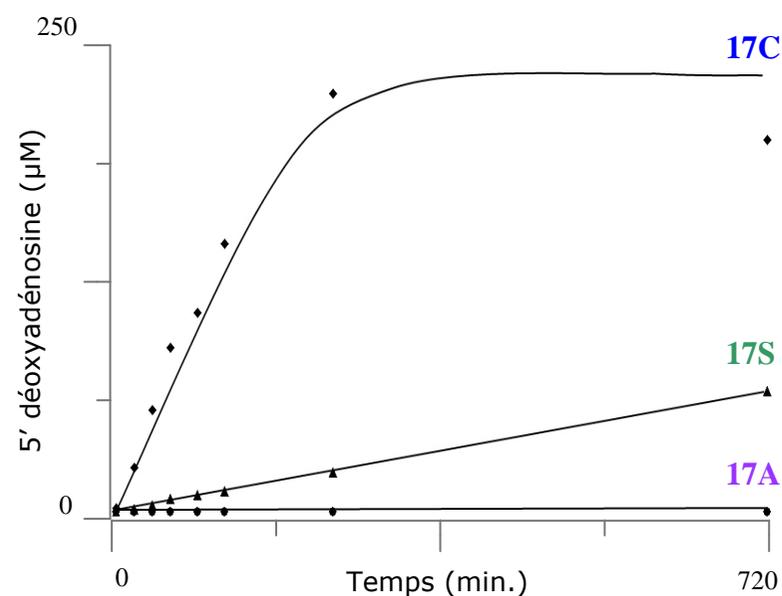
**Les anSMEs catalysent l'oxydation des résidus cystéine et sérine !**

# Caractérisation biochimique d'anSME<sub>cpe</sub>

## Formation de C $\alpha$ -formylglycine

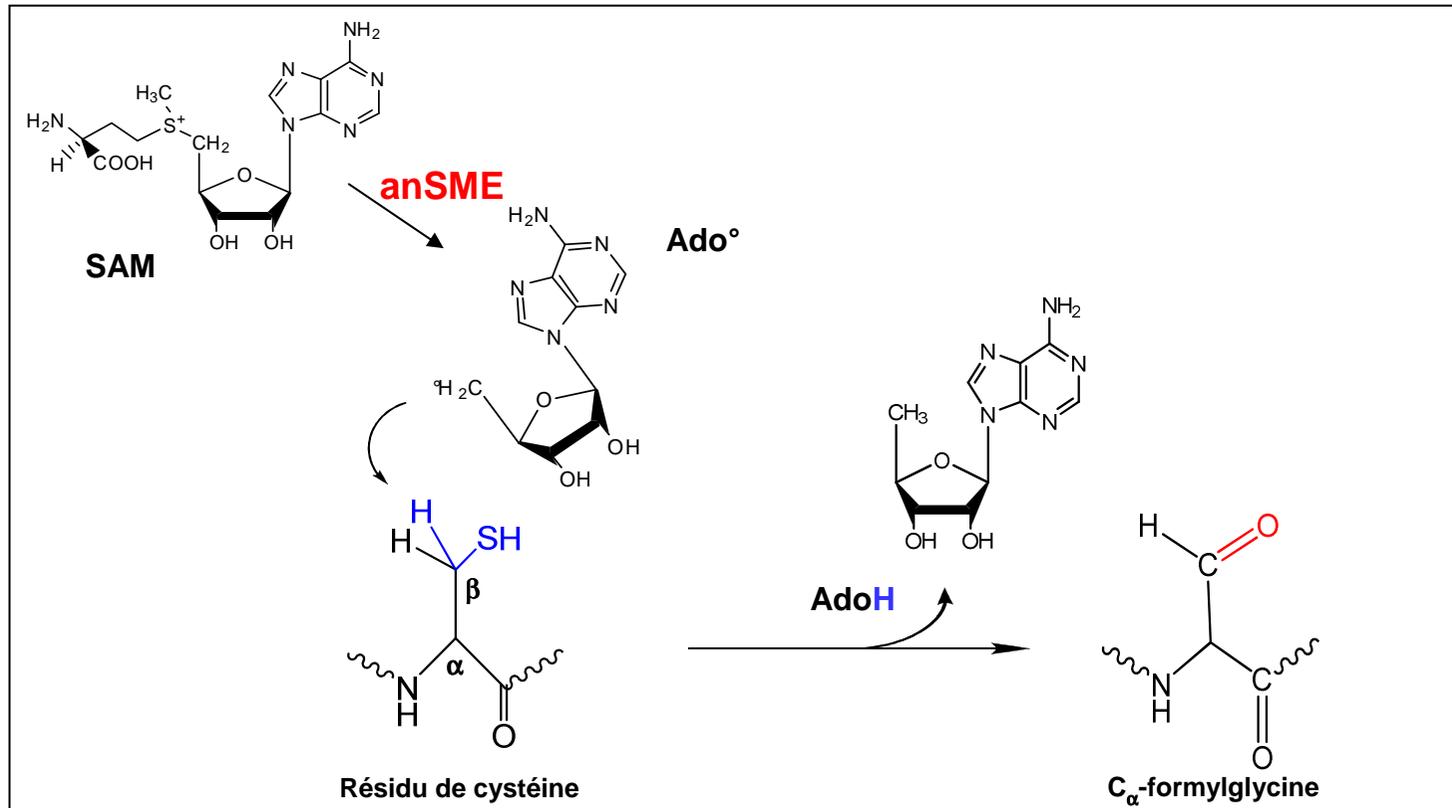


## Formation de 5'-déoxyadénosine

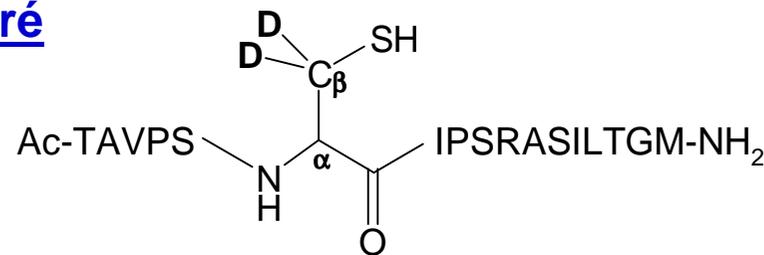


- Maturation plus efficace du 17C que du 17S
- 1 mole de SAM consommée par mole de produit formé
- Inhibition totale en présence du peptide 17A

# Cible du radical 5'-deoxyadénosyle



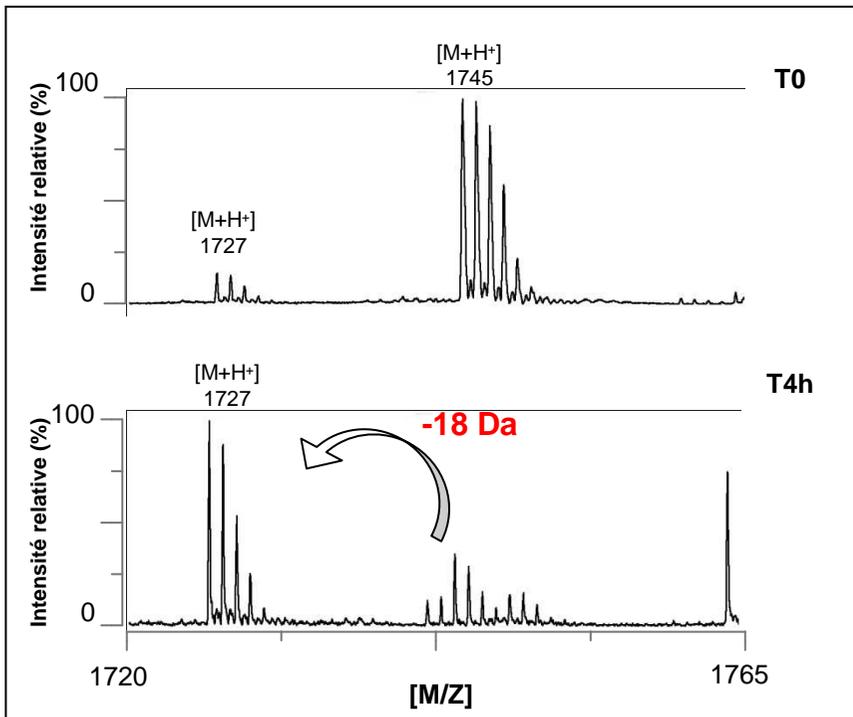
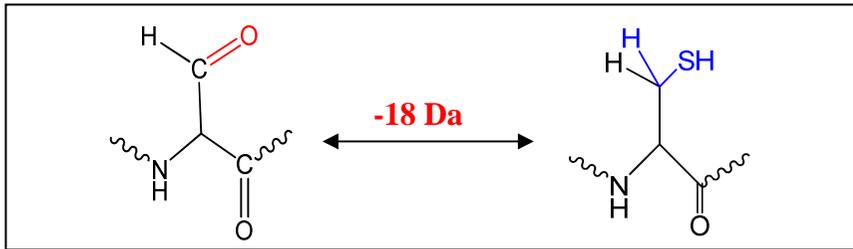
## Substrat deutéré



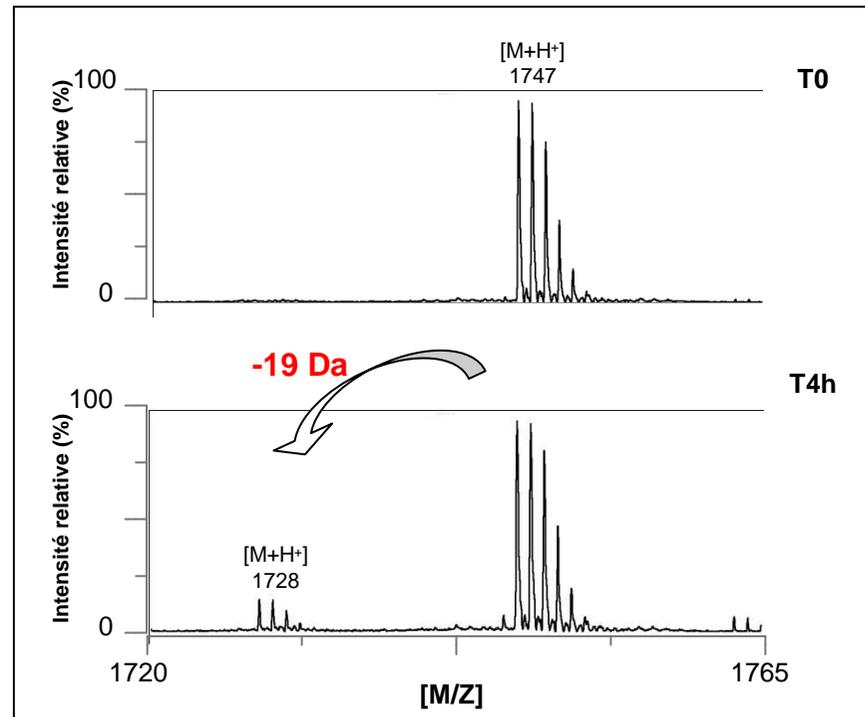
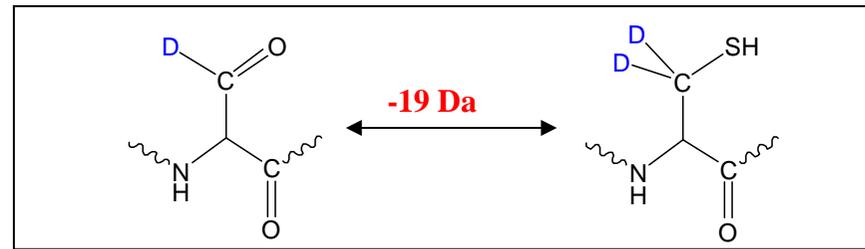
**Formation de 5'-deoxyadénosine deutérée ?**

# Cible du radical 5'-deoxyadénosyle

## En présence d'un peptide non marqué



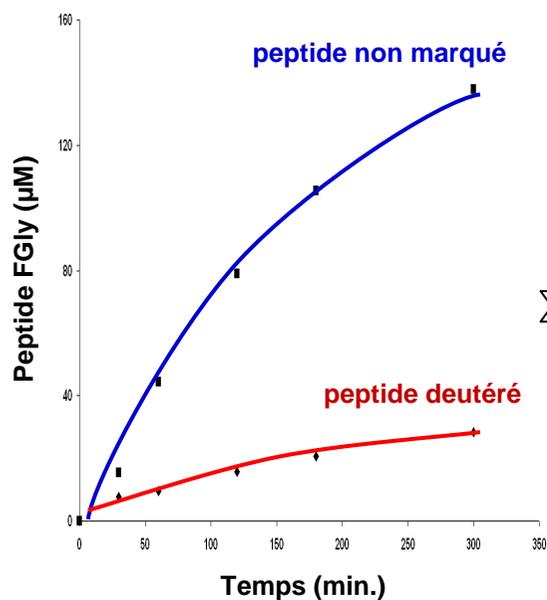
## En présence d'un peptide deutéré



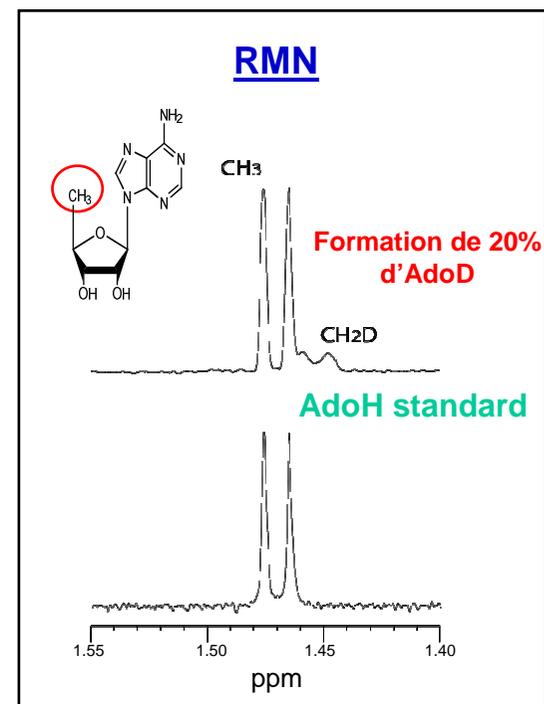
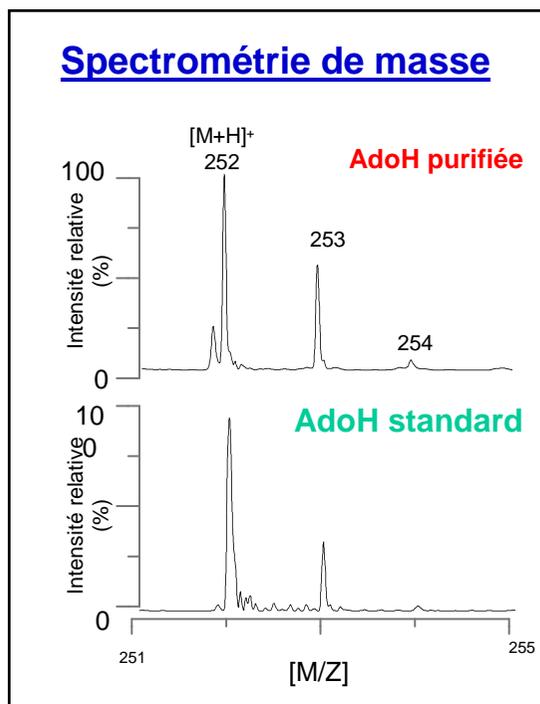
➡ **Maturation du peptide deutéré**

# Cible du radical 5'-deoxyadénosyle

## Formation de peptide-FGly



## Formation de 5'-deoxyadénosine



- ⇒ Effet cinétique isotopique confirmant l'abstraction d'un atome d'hydrogène en C <sub>$\beta$</sub>
- ⇒ Formation de 5'-deoxyadénosine marquée sur le carbone C5'

# Rôles des autres motifs conservés

## anSMEbt

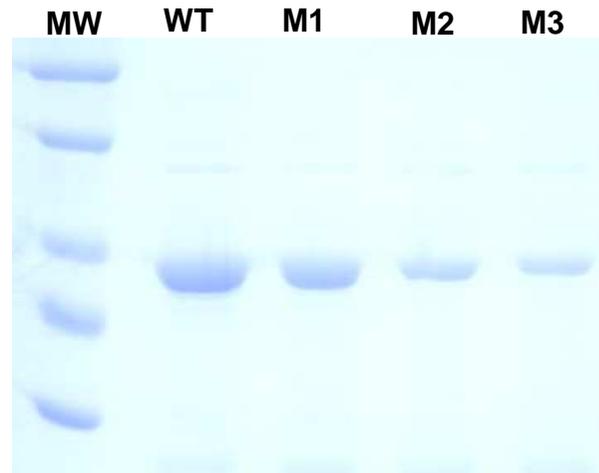
**Mutant 2 :**  
C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>14</sub>-C  
A-X<sub>5</sub>-A-X<sub>14</sub>-C

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMKATTYAPFAKPLYVMVKPVGAVCNLACEYCYYLEKANL  
YKENPKHVMSDELLEKFIIDEYINSQTMPQVLFTWHGGETLMRPLSFYKKAMELQKKYAR  
GRTIDNCIQTNGLTLLTDEWCEFFRENNWLVGVSIDGPQEFHDEYRKNKMGKPSFVKVMQ  
GINLLKKHGVWAMAVVNDFNAEYPLDFYNFFKEIDCHYIQFAPIVERIVSHQDGRHL  
ASLAEGKEGALADFSVSPEQWGNFLCTIFDEWVKEDVGKFFIQIFDSTLANWMGEQPGV  
CTMAKHCGHAGVMEFNGDVVSCDHFVFPYKLGNIYSQTLVEMMHSERQHNFGTMKYQS  
LPTQCKECDLFAENGECPKNRFSRTADGEPGLNYLCYGYQYFQHVAPYMDFMKKELM  
NQQAPANIMKALKDGLKIEY

**Mutant 1 :**  
C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>2</sub>-C  
A-X<sub>3</sub>-A-X<sub>2</sub>-A

**Mutant 3 :**  
C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>18</sub>-C  
A-X<sub>2</sub>-A-X<sub>5</sub>-A-X<sub>3</sub>-C-X<sub>18</sub>-C

## Génération et purification de mutants

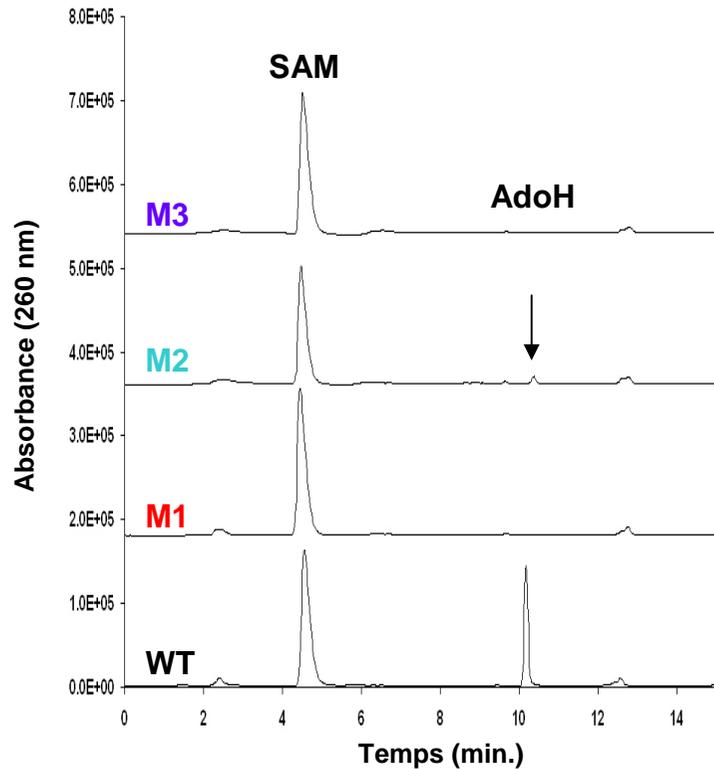


Analyse par électrophorèse SDS-PAGE 12%

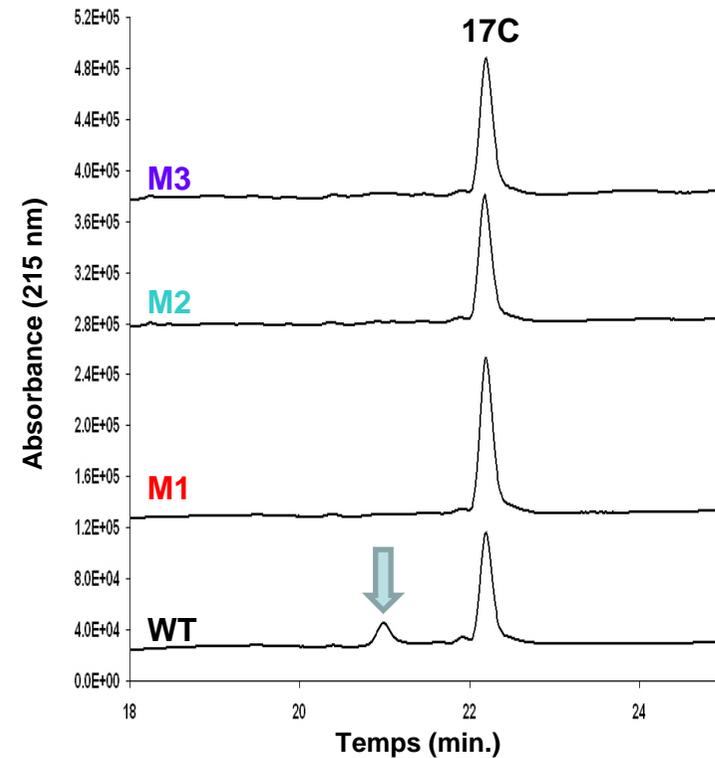
⇒ **Activité enzymatique ?**

# Rôles des autres motifs conservés

## Production de 5'-deoxyadénosine



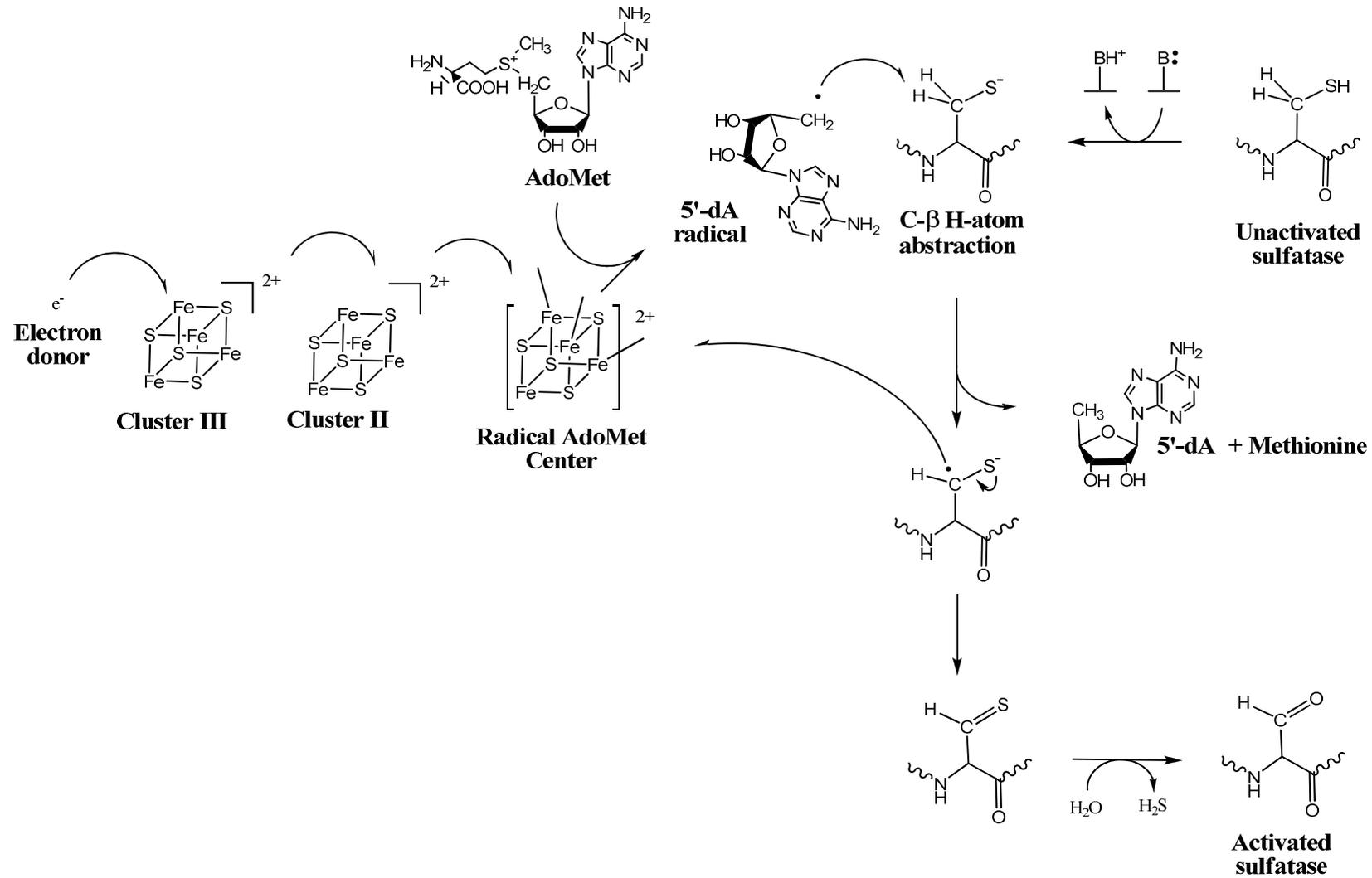
## Formation de peptide-FGly



→ Perte de l'activité de maturation

⇒ Les motifs de cystéine sont essentiels à la réaction de maturation

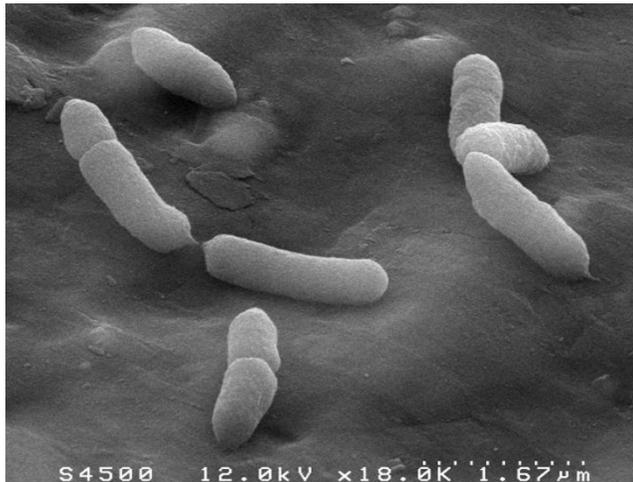
# Le mécanisme des anSMEs



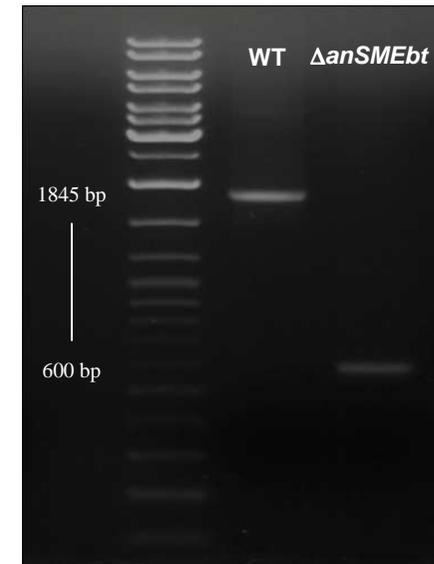
...et les interactions entre les  
bactéries commensales et  
l'Homme ?

# Rôle d'anSMEs dans les interactions bactéries/hôte

Le modèle *Bacteroides thetaiotaomicron* une bactérie commensale majeure de l'Homme



Construction d'une  
souche BT  $\Delta anSMEbt$



Analyse sur gel d'agarose (1%)  
des produits de PCR

## *Bacteroides thetaiotaomicron*

Bactérie à Gram négatif

Anaérobie stricte

6% de toutes les bactéries présentes dans le tube digestif de l'Homme

Genome : **6,26 Mb**

4779 protéines prédites dont:

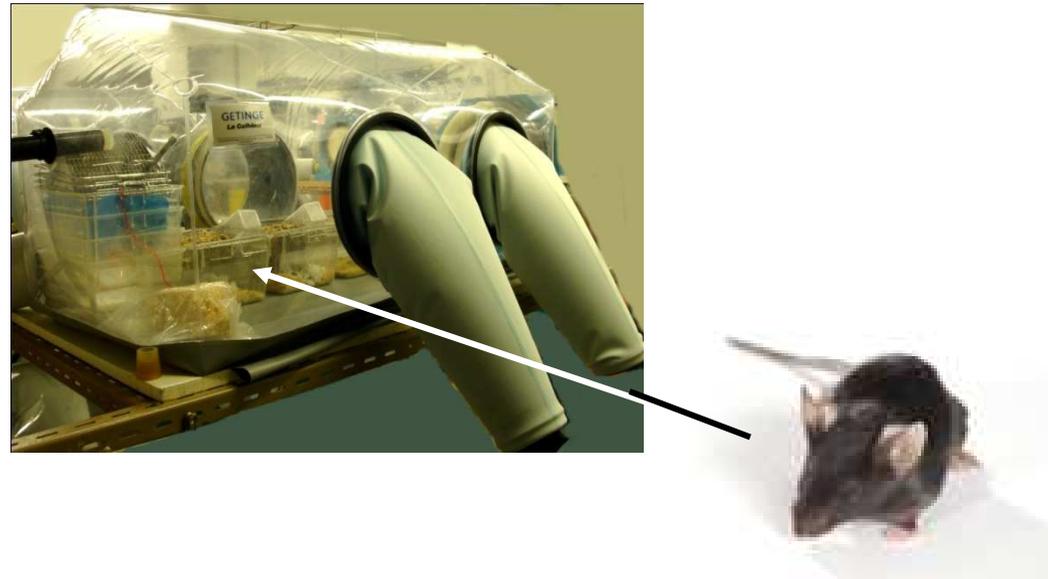
- 163 systèmes associés à la membrane pour lier et importer les glycanes
- **226 glycosidases prédites** (contre 98 dans le génome humain)
- 15 polysaccharide lyases.
- **28 sulfatases** (contre 17 sulfatases dans le génome humain)

# Rôle d'anSMEs dans les interactions bactéries/hôte

## Stratégie :

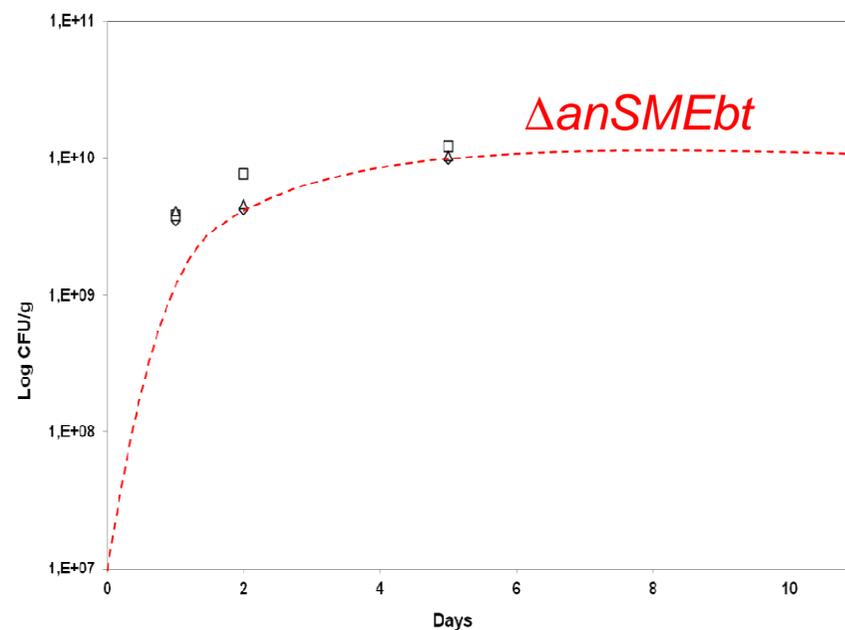
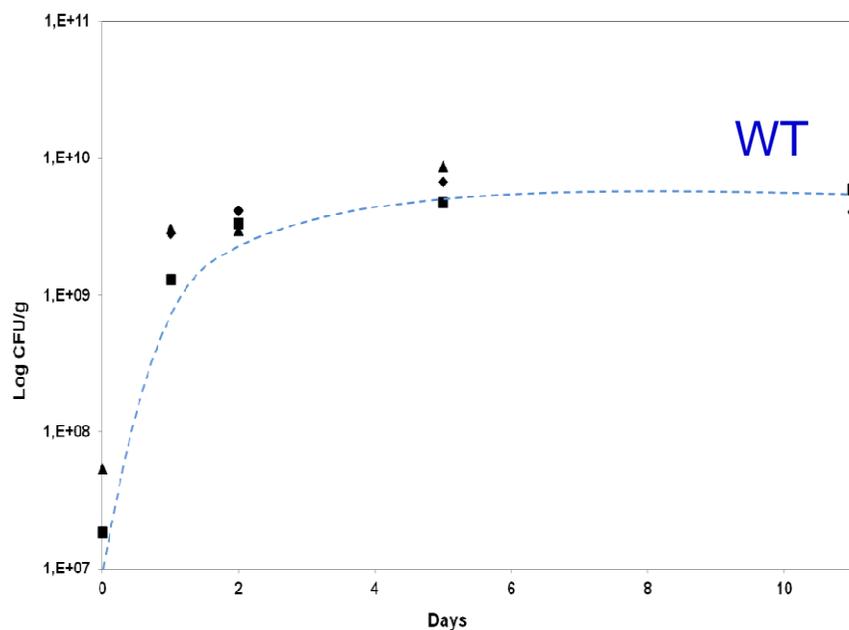
Souris C57BL/6J monoassociées à :

- BT WT
- BT  $\Delta anSME_{bt}$
- BT WT/ BT  $\Delta anSME_{bt}$



- ⇒ Mesurer la colonisation du tractus digestif par BT WT et BT  $\Delta anSME_{bt}$  (qPCR)
- ⇒ Comparer l'implantation des souches BT WT/ BT  $\Delta anSME_{bt}$  dans le tractus digestif par des expériences de compétition
- ⇒ Analyser par transcriptomique l'expression des gènes de BT WT et de BT  $\Delta anSME_{bt}$

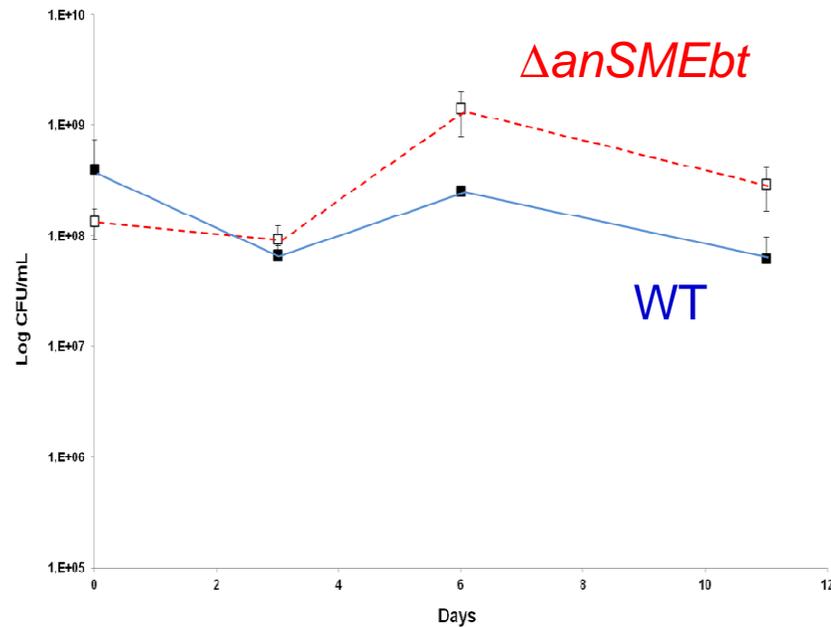
# Colonisation du tube digestif par *B. thetaiotaomicron*



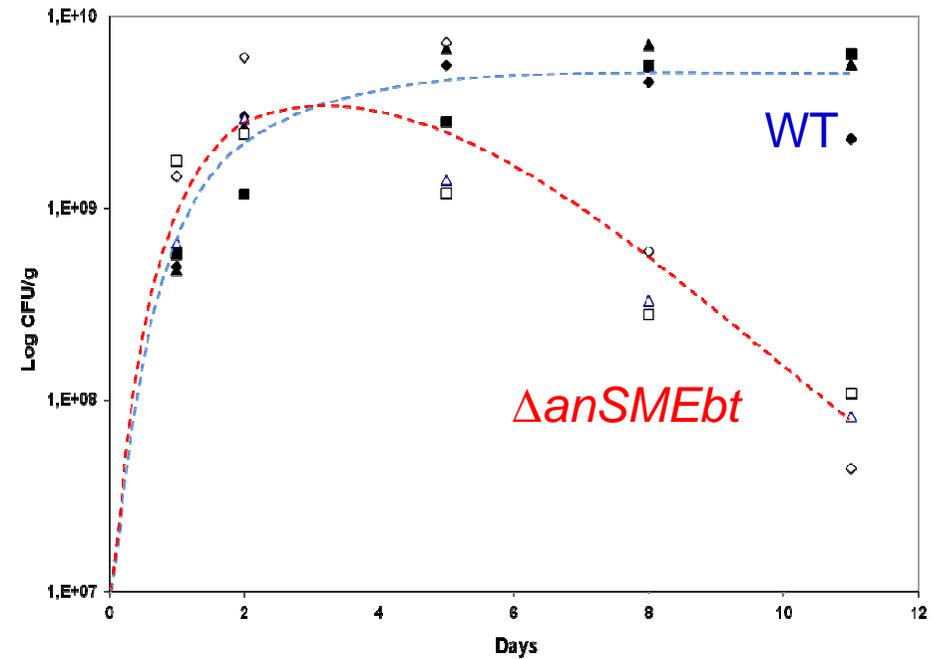
⇒ **In vivo les deux souches s'implantent à des niveaux équivalents  $\sim 10^{10}$**

# Compétition *in vitro* et *in vivo* entre les deux souches

## Compétition *in vitro* en milieu riche



## Compétition *in vivo*

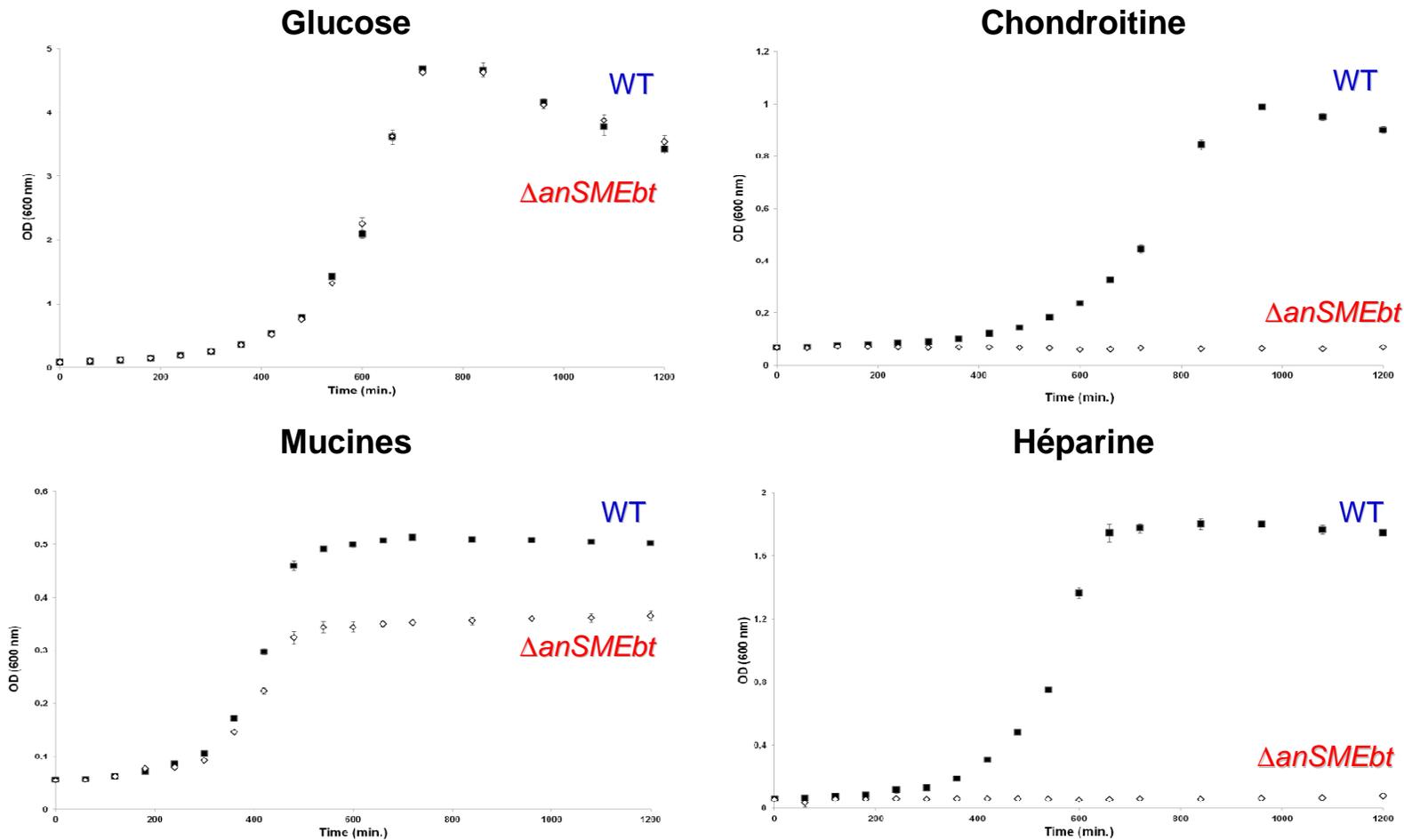


***In vitro*, les deux souches poussent en milieu riche**

***In vivo* la souche inactivée pour le gène anSME est progressivement exclue**

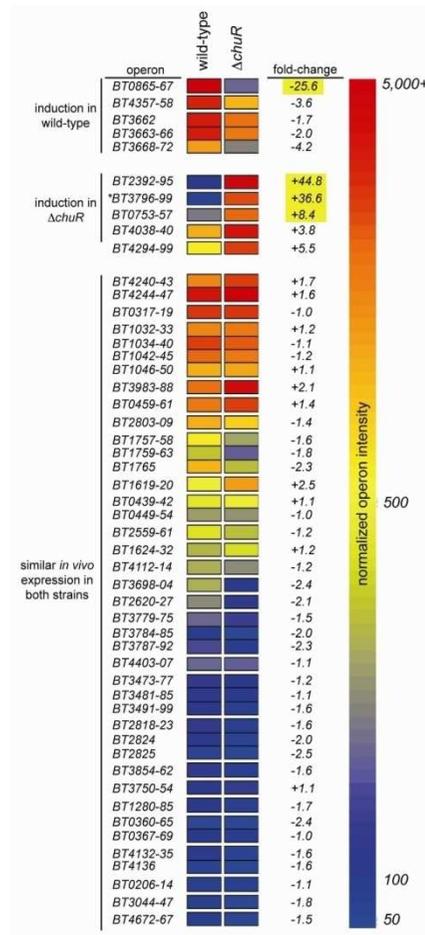
**Pourquoi ?**

# Croissance de *B. theta* avec différentes sources de carbone



⇒ *In vitro* anSME est essentielle pour le métabolisme de sources de carbone sulfaté

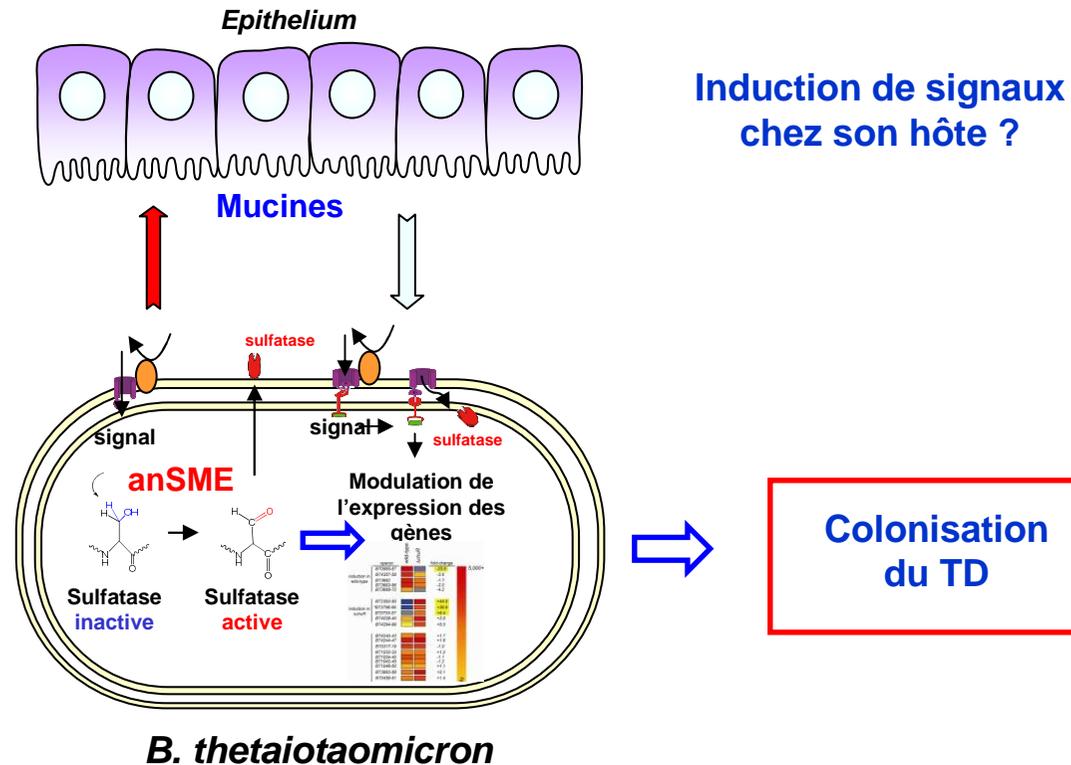
# Analyse par transcriptomique des gènes induits chez la souche sauvage et mutée



⇒ L'absence de gène *anSME* module l'expression de certaines sulfatases

⇒ Le métabolisme *in vivo* des mucines chez *B. thetaiotaomicron* est altéré

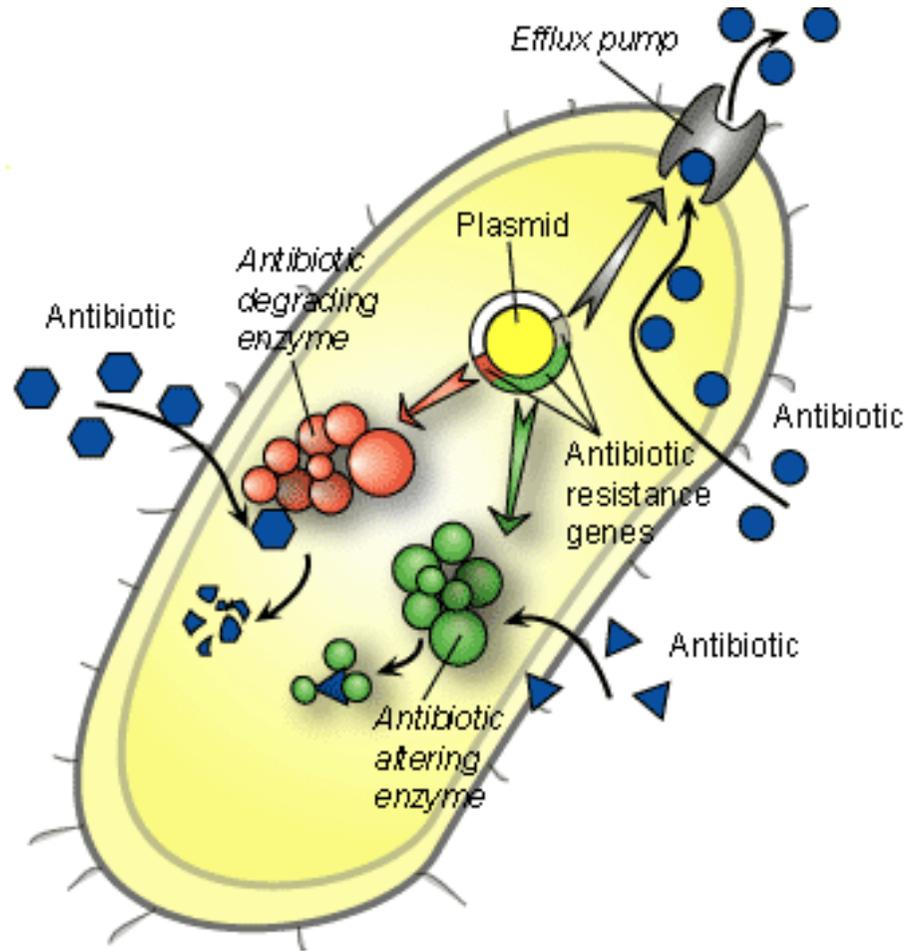
# Role d'anSMEs dans les interactions bactéries/hôte



⇒ **AnSME via l'activation des sulfatases permet à un groupe bactérien majeur de coloniser son hôte et d'établir des interactions complexes avec celui-ci**

Une enzyme radical SAM impliquée  
dans la résistance bactérienne aux  
antibiotiques

# Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries

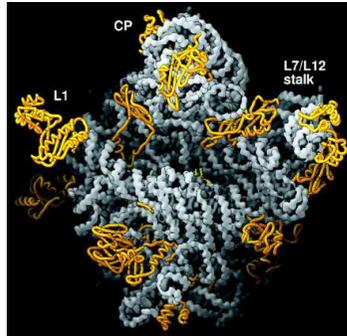


## Principaux mécanismes

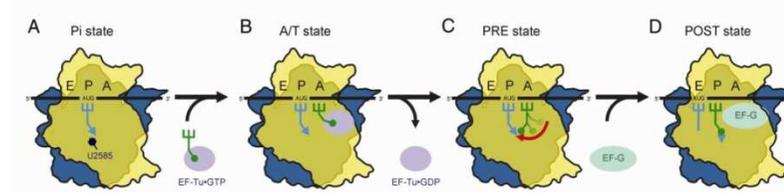
- ⇒ **Pompes à efflux**
- ⇒ **Enzymes de modification/dégradation**
- ⇒ **Méthylation de l'ARN ribosomal**

# Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

## Le ribosome: une machinerie complexe pour la synthèse protéique

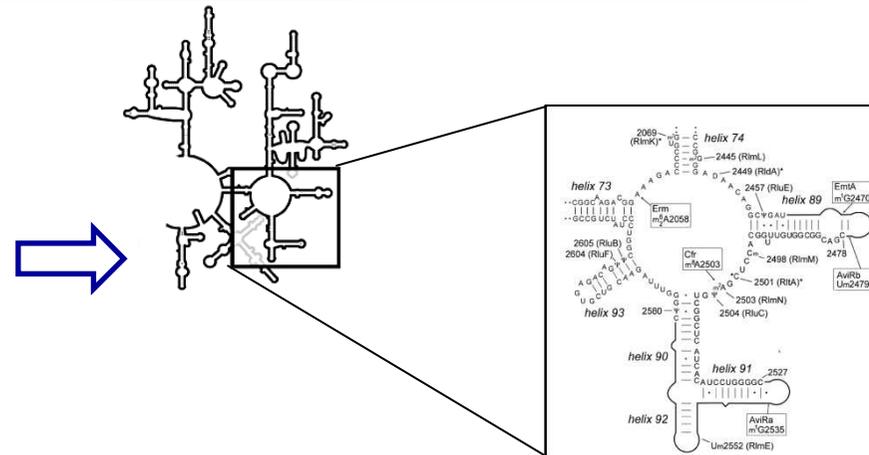
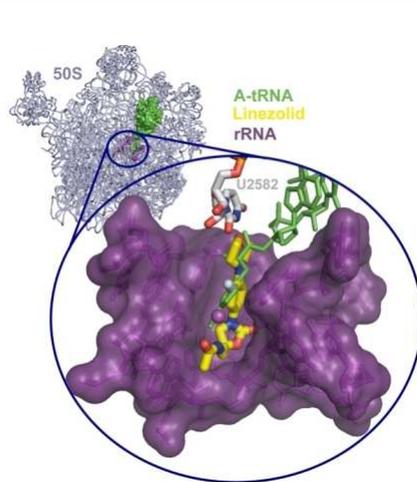


Le ribosome: Une structure composée de trois molécules d'ARN (16s rRNA, 23s rRNA and 5s rRNA) et d'environ 50 protéines

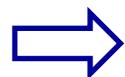


Wilson *et al.* PNAS 2008;105(36):13339-44.

## Au sein du ribosome le site qui catalyse la formation de la liaison peptidique :



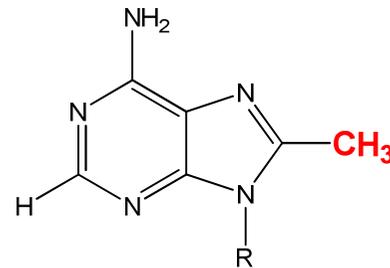
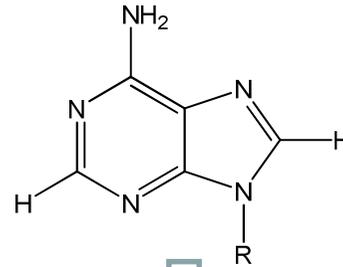
Purta *et al.* (2009) Mol Microbiol;72(5):1147-58.



**Des modifications du site actif en particulier des méthylations vont rendre les bactéries résistantes aux antibiotiques**



# Cfr, une nouvelle méthyltransférase qui confère la résistance à de nombreux antibiotiques

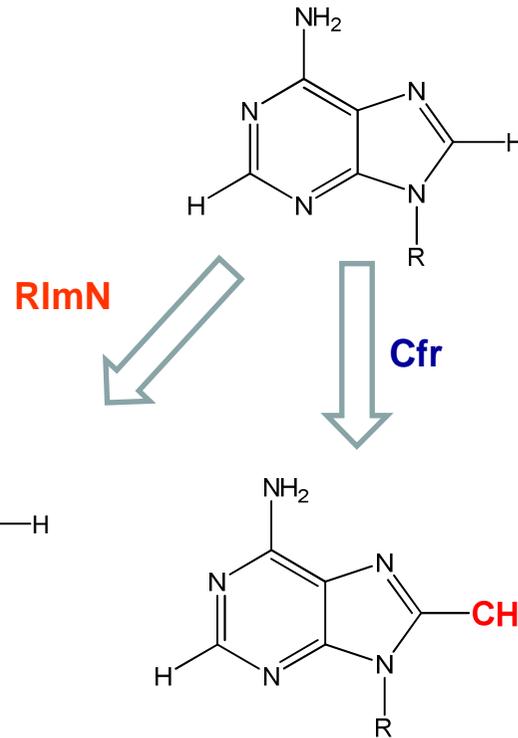
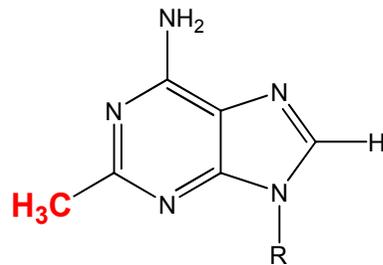


**Cfr méthyle une base critique  
présente dans l'ARNr 23S  
(A2503) en position 8**

(Giessing *et al.* (2009) RNA; 15(2):327-3)

# Cfr, une nouvelle méthyltransférase confère la résistance à de nombreux antibiotiques

Un analogue chez *E. coli* appelé **RImN**  
méthyle en position 2  
(Toh et al. (2008) RNA; 14(1):98-106)

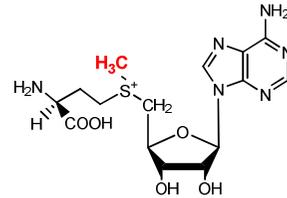


Cfr méthyle une base critique  
présente dans l'ARNr 23S  
(A2503) en position 8  
(Giessing et al. (2009) RNA; 15(2):327-3)

**Comment est effectuée cette réaction de méthylation ?**

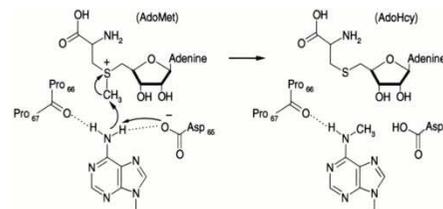
# La méthylation des acides nucléiques

⇒ Le donneur de groupement méthyle : la SAM



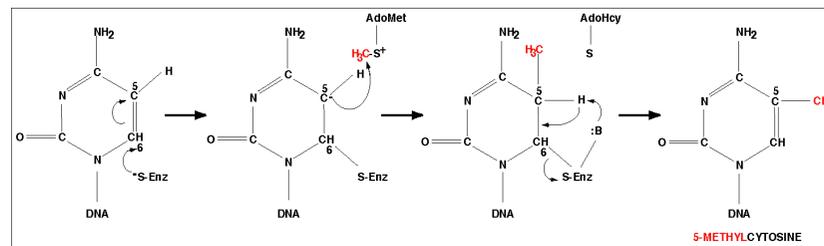
⇒ En général une simple substitution nucléophile

Mécanisme proposé d'une ADN amino méthyltransférase



Scavetta *et al.* NAR. 2000;28:3950-3961

⇒ La méthylation sur un atome de carbone nécessite une « activation » :  
le cas des C-méthyl transférase

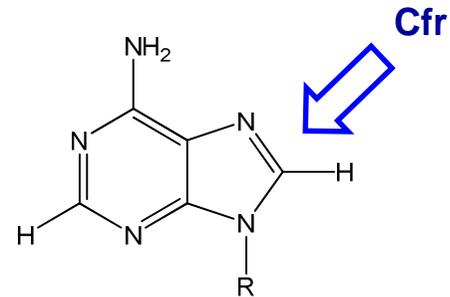


Wu & Santi 1987 *J Biol Chem*;262(10):4778-86

# Le mécanisme de Cfr

Dans le cas de Cfr :

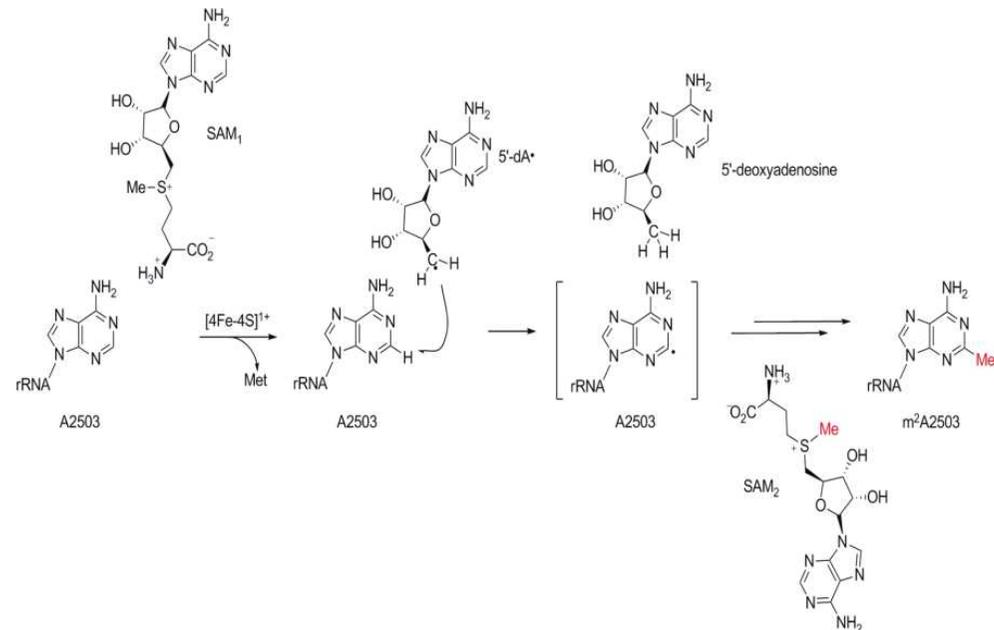
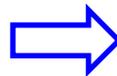
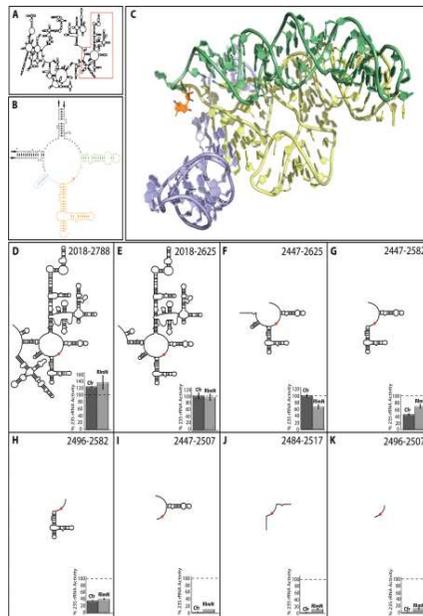
- pas de position « activable »
- un atome de carbone hybridé  $sp^2$



**Comment catalyser cette méthylation ?**

**Une première proposition : l'abstraction d'un H de l'ARN**

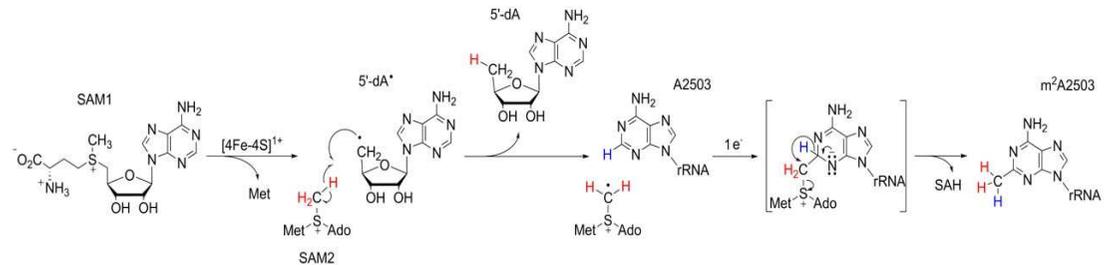
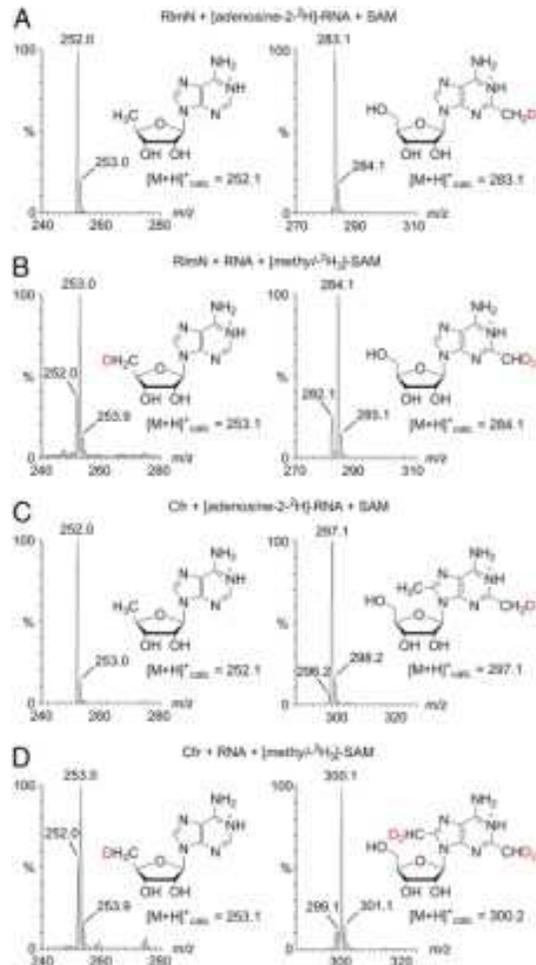
Yan et al. *J Am Chem Soc.* 2010;132(11):3953-64



# Le mécanisme de Cfr

## Une deuxième proposition : l'abstraction d'un H de la SAM

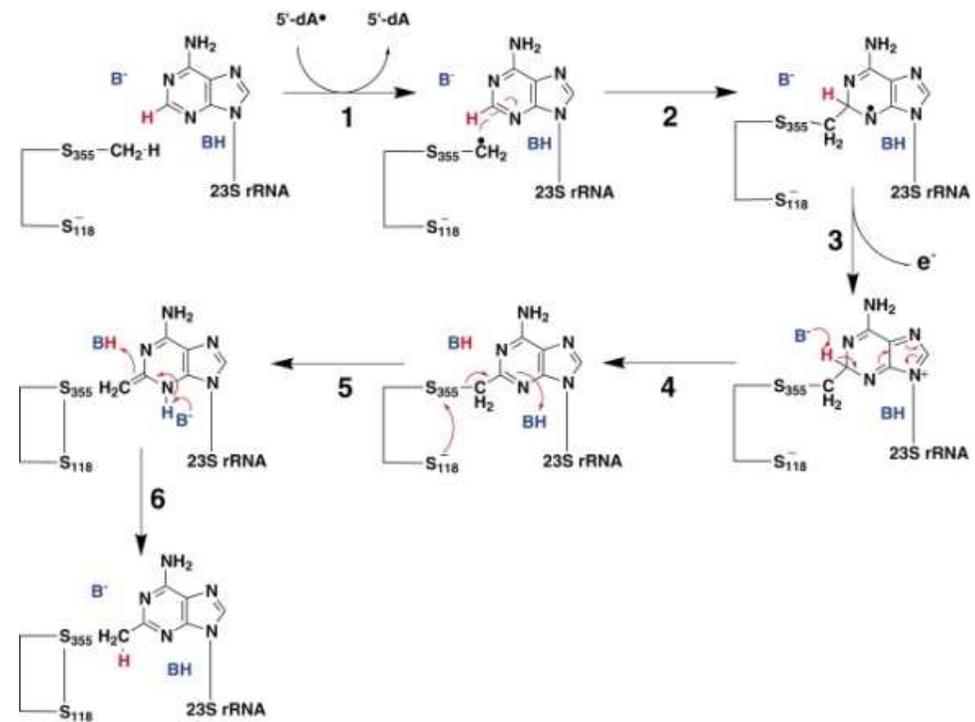
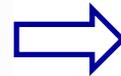
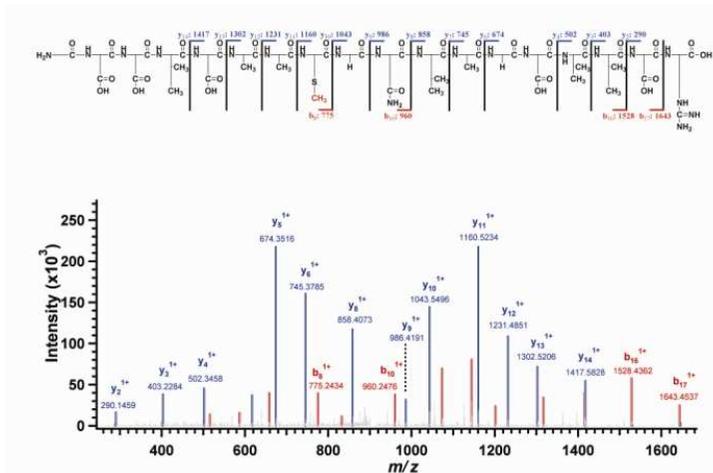
Yan & Fujimori *PNAS* 2011;108:3930-3934



# Le mécanisme de Cfr

## Une troisième proposition : un groupement méthyle présent sur la protéine

Grove *et al.* Science 2011;332:604-607



D'autres hypothèses ?

# Remerciements



Alhosna Benjdia



**BioBac, INRA** (Jouy-en-Josas)  
Alain Guillot



**University of Georgia** (USA)  
Michael K. Johnson  
& Sowmya Subramanian



**IFRMP23 INSERM** (Rouen)  
Jérôme Leprince  
& Hubert Vaudry



**SLU** (Suède)  
Corine Sandström



**Washington University School of Medicine** (USA)  
Jeffrey I. Gordon  
& Eric Martens



**iRSTV - CEA** (Grenoble)  
Etienne Mulliez