

Caractérisation structurale et fonctionnelle de la peptide déformylase du phage Vp16T

Julien Nusbaum

▶ To cite this version:

Julien Nusbaum. Caractérisation structurale et fonctionnelle de la peptide déformylase du phage Vp16T. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT: 2016SACLS510. tel-02398199

HAL Id: tel-02398199 https://theses.hal.science/tel-02398199

Submitted on 7 Dec 2019

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.



ÉCOLE DOCTORALE Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)



NNT: 2016SACLS510

THESE DE DOCTORAT

DE

L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

PREPAREE A

L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 577 Structure et Dynamique des Systèmes Vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

Mr Julien NUSBAUM

Caractérisation structurale et fonctionnelle de la peptide déformylase du phage Vp16T

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 06 décembre 2016 :

Composition du Jury :

Madame BURY-MONE Stéphanie Pr, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) Monsieur GENEVAUX Pierre DR, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire Rapporteur Monsieur GILLET Reynald DR, Institut de Génétique et Développement de Rennes Rapporteur Madame ROMBY Pascale DR, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire Madame GIGLIONE Carmela DR, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) Madame FIEULAINE Sonia CR, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)

Présidente du jury Examinateur Directeur de thèse Co-directeur de thèse

Table des matières

Introduction générale

A-La traduction	10
A.1-La structure du ribosome	10
A.2- Plusieurs types de ribosomes, suivant les organismes et/ou compartiments cellulaires	12
A.3- Le tunnel de sortie du peptide	13
A.4- Les étapes de la traduction chez la bactérie	15
B- Les évènements co-traductionnels et les RPBs chez les procaryotes	18
 B.1- Les RPBs	
B.3-La plateforme d'interaction des RPBs / régulation	32
C-La voie de l'excision de la méthionine N-terminale : la NME	39
 C.1 – Les méthionine aminopeptidases (MetAP) 1) Différentes classes de MetAP, et différentes localisations. 2) Activité peptidase des MetAP et thérapeutique. 	41 41 42
C.2 – Les peptides déformylases	44 مر
D-FI 001C1114UY4C	40

<u>Chapitre I: Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une peptide deformylase atypique</u> <u>de phage: Vp16PDF</u>

A - Identification d'homologues de PDFs chez des virus et bactériophages	54
A.1 - Identification et caractérisation de séquences codant des PDFs virales	54
A.2 - Deux PDFs présentes dans deux bactériophages de Vibrio parahaemolyticus : Vp16T et	<i>Vp</i> 16C
B - Le gène codant une PDF putative chez le bactériophage Vp16T possède une activit déformvlase : Complémentation fonctionnelle in vivo	é 58

C - Caractérisation biochimique de la PDF du phage Vp16T60
C.1 - Purification à homogénéité de <i>Vp</i> 16PDF en utilisant les protocoles mis au point pour les formes bactériennes
C.2 - Vp16PDF purifiée dans des conditions classiques est peu active61
C.3- Production d'anticorps dirigés contre <i>Vp</i> 16PDF64
C.4 - L'extrémité C-terminale très courte de Vp16PDF stabilise fortement la protéine65
C.5- La structure cristalline de Vp16PDF révèle un repliement PDF classique, assorti de quelques particularités
D - Détermination des conditions nécessaires pour la préservation de l'activité de Vp16PDF
in vitro
D.1 - L'activité de <i>Vp</i> 16PDF est significativement plus élevée lorsque l'on augmente la concentration en nickel dans le tampon de lyse74
D.2 - L'activité de <i>Vp</i> 16PDF est fortement augmentée lorsque le tampon de lyse est de bas pH et qu'il contient de très fortes concentrations en nickel75
E – Purification et caractérisation enzymatique d'une forme active de Vp16PDF79
E.1 – Purification de Vp16PDF dans des tampons fortement concentrés en nickel
E.2 –La caractérisation de l'activité déformylase <i>in vitro</i> de la protéine <i>Vp</i> 16PDF purifiée avec le nouveau protocole révèle une protéine très active partageant des constantes catalytiques comparables aux autres PDFs actives80
E.3 – Vp16PDF est sensible à l'inhibiteur naturel des PDFs, l'actinonine
E.4 - Analyse de la spécificité de substrat de <i>Vp</i> 16PDF83
Conclusion

Chapitre II: Caractérisation biochimique du complexe Vp16PDF/ribosome

A – Vp16PDF interagit avec les ribosomes bactériens malgré l'absence de l'hélice α C-terminale typique des PDFs de type 1B	90
B – L'absence de l'hélice α C-terminale chez Vp16PDF semble conduire à une localisation ribosome différente de celle observée avec EcPDF	on au 93
B.1 - <i>Vp</i> 16PDF semble présenter trois sites de fixation au ribosome	94
B.2 – Vers la structure cristalline d'un complexe <i>Vp</i> 16PDF : ribosome	97
C – Rôle de l'hélice α des PDFs de type 1B et des résidus V ₁₃₅ T ₁₃₆ I ₁₃₇ C-terminaux de Vp16PDF dans la formation du complexe PDF : ribosome	99
D – L'affinité de Vp16PDF pour le ribosome semble être influencée par la longueur du polypeptide naissant	107
Conclusion	113

Chapitre III: Caractérisation de l'expression de Vp16PDF chez E. coli

A – La surexpression de Vp16PDF dans E. coli inhibe la croissance bactérienne à basse	
température1	18
A.1 – L'expression de Vp16PDF inhibe la croissance bactérienne1	.18
A1	19
B1	19
C	19
D1	.19
A.2 – L'inhibition de la croissance bactérienne n'est pas due à une compétition entre Vp16PDF et	I
<i>Ec</i> PDF mais dépend de la température1	.20
A.3 – L'inhibition de croissance est indépendante du fond génétique des bactéries1	.21
A.4 – L'inhibition de la croissance bactérienne induite par l'expression de Vp16PDF nécessité une forme active de l'enzyme1	e .23
A.5 L'isoleucine terminale de <i>Vp</i> 16PDF joue un rôle crucial dans l'effet inhibiteur exercé par l'expression de la protéine1	.24
B – La surexpression de Vp16PDF dans E. coli perturbe l'intégrité de l'enveloppe	
bactérienne1	27
B.1 – L'expression de Vp16PDF altère la structure de l'enveloppe bactérienne1	.27
B.2 – L'expression de <i>Vp</i> 16PDF accroît la sensibilité à l'action bactériolytique de détergents et antibiotiques1	.28
C –L'expression de Vp16PDF interfère avec le repliement de novo des protéines1	30
D – L'expression de Vp16PDF dans E. coli conduit à l'accumulation d'agrégats1	34
Conclusion :1	36

Discussion

ussion	141

Matériels et méthodes

A-Techniques de biologie moléculaire :	156
A.1-Souches bactériennes	
A.2 – Protocole	
1) Ensemble des constructions plasmidiques.	
2) Mutagénèse dirigée	150

3) Sous-clonage des gènes des chimères de Vp16PDF présentes dans le plasmide pBAD ver	rs le vecteur
pET-16b	151
4) Préparation des cellules thermocompétentes	153
5) Transformation bactérienne par choc thermique	154
6) Extraction d'ADN plasmidique (minipreps)	
7) Séquençage	155
B-Techniques de biochimie	155
B.1 Purification des protéines Vp16PDF et chimères	
1) Test d'expression et de solubilité	156
2) Purification de <i>Vp</i> 16PDF (forme peu active)	156
3) Purification de <i>Vp</i> 16PDF (forme pleinement active)	158
4) Dosage des protéines par la méthode de Bradford	159
5) Electrophorèse en conditions dénaturantes	159
6) Western-blot suivi d'une immunodétection	160
B.2 Mesure de l'activité peptide deformylase	
1) Matériel et solutions	163
2) Protocole	
3) Test d'inhibition de <i>Vp</i> 16PDF en présence d'actinonine	
B.3 Etudes sur les conséguences <i>in vivo</i> de l'expression de Vp16PDF	
1) Souches	
2) Complémentation fonctionnelle	
2) Effet de l'expression de Vp16PDF sur la croissance des bactéries	
3) Extraction d'agrégats des cellules bactériennes	
4) Préparation des échantillons d'agrégats protéiques pour une analyse en spectrométrie	de masse :
digestion trypsique d'échantillons issus d'un gel SDS-PAGE	170
B.4 Etudes des interactions avec le ribosome	
1) Préparation de ribosomes 70S d' <i>E. coli</i>	
2) Préparation de ribosomes 70S de <i>Thermus thermophilus</i>	
Mesure de l'activité des ribosomes	
3) Production de ribosomes bloqués en cours de traduction (« stalled ribosomes »)	
4) Test de sédimentation	
5) Pontage chimique	
B.5 Cristallisation de complexes 70S/facteurs NME	

<u>Bibliographie</u>

graphie

Introduction

A- La traduction

Les êtres vivants possèdent une quantité immense d'information génétique contenue sur un support biologique : leur ADN. Celui-ci leur sert de matrice pour produire l'ARN messager puis les protéines nécessaires à leur structure et leur métabolisme. L'étape permettant de produire les protéines est appelée « traduction », et elle est assurée par de grands complexes moléculaires : les ribosomes. Après transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm), le ribosome « lit » la séquence nucléotidique et, assisté par des protéines spécialisées, la machinerie traductionnelle utilise ainsi les acides aminés libres à l'intérieur de la cellule pour les assembler afin de produire les protéines. Ce processus est rapide, la vitesse étant de 10 à 22 acides aminés assemblés chaque seconde chez les procaryotes ^{1,2} et 5 à 6 acides aminés par seconde pour les eucaryotes ³.

Les avancées techniques des dernières années en matière de cryo-microscopie électronique et de cristallographie ont permis l'obtention de données précises sur la structure tridimensionnelle des ribosomes, aidant ainsi à améliorer la compréhension de ce mécanisme incroyablement complexe qu'est la traduction. Nous allons voir dans cette partie les caractéristiques des différents types de ribosomes, ainsi que les principales étapes de la traduction chez les procaryotes, de l'initiation à la terminaison.

A.1-La structure du ribosome

Les ribosomes forment une machinerie ribonucléoprotéique complexe (2,5 MDa chez les procaryotes, plus de 3,3 MDa chez les eucaryotes) destinée à déchiffrer le code génétique (sous forme d'ARNm) pour le traduire et produire les protéines. Ils possèdent deux fonctions principales : celle de décoder l'ARNm en reconnaissant les codons et en faisant interagir les ARNt correspondants, chargés des acides aminés arrivant, puis celle qui consiste à assembler les acides aminés entre eux, via la création de liaisons peptidiques. On les retrouve dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et procaryotes, mais également dans les organites des cellules eucaryotes (mitochondries et chloroplastes).

Les ribosomes procaryotes sont composés d'une cinquantaine de protéines et 3 ARN ribosomaux (ARNr) ; les ribosomes cytoplasmiques eucaryotes sont plus complexes puisqu'ils possèdent environ 80 protéines et 4 ARNr. Les ribosomes sont composés de deux sous-unités, contenant chacune des protéines et une ou plusieurs ARNr. Elles se différencient par la longueur

de leur(s) ARNr, par le nombre de leurs protéines, et ainsi par leur coefficient de sédimentation S (Sverdberg). Chez les procaryotes, on définit la petite sous-unité 30S et la grande sous-unité 50S, formant un complexe final 70S (Figure i.1). Cette organisation en deux sous-unités est fortement conservée dans l'ensemble du règne du vivant. La petite sous-unité contient environ vingt protéines et un ARNr 16S (environ 1500 nucléotides). Elle contribue à la reconnaissance de l'ARNm, par l'intermédiaire des protéines ribosomales bS1, uS3, bS18 et bS21 et de l'ARNr 16S dont l'extrémité reconnaît la séquence Shine-Dalgarno de l'ARNm ^{4,5}. Elle permet également le décodage de l'ARNm en contrôlant les appariements codon-anticodon entre l'ARNm et les ARNt⁴. Enfin cette sous-unité contient également les sites de liaison pour les facteurs d'initiation IF1, IF2 et IF3⁴. La grande sous-unité contient quant à elle une trentaine de protéines et deux ARNr, le 23S (environ 2500 nucléotides) et le 5S (environ 120 nucléotides). Elle catalyse la formation des liaisons peptidiques en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse du GTP, notamment grâce aux facteurs d'élongation EF-G et EF-Tu. Le mécanisme de catalyse des liaisons peptidiques se déroule dans le centre peptidyl-transférase (PTC) de cette grande sous-unité. Par ailleurs, la grande sous-unité possède trois sites de fixation des ARNt : i) le site A (aminoacyl-ARNt) dans lequel vient se fixer l'ARNt chargé de l'acide aminé arrivant (ARNt^{aa}) (hormis l'ARNt initiateur qui vient se fixer directement dans le site P); ii) le site P (peptidyl-ARNt) sur lequel est accroché le polypeptide en cours de synthèse et où a lieu la liaison peptidique, et iii) le site E (« exit ») qui permet le relargage de l'ARNt déchargé, une fois la liaison peptidique catalysée au niveau du PTC (Figure i.1). Enfin, il existe un tunnel à l'intérieur de la grande sous-unité, reliant le PTC jusqu'à la surface du ribosome, qui permet l'émergence du peptide en cours de synthèse.



Figure i.1: Structure du ribosome bactérien. Structure du ribosome 70S avec ARNm, ARNt et chaîne naissante. Les ARNt sont présents dans les sites E, P et A, respectivement en jaune, vert et rose. Le tunnel de sortie du peptide est représenté par des pointillés rouges. D'après Schmeing et Ramakrishnan, 2009 ⁶.

A.2- Plusieurs types de ribosomes, suivant les organismes et/ou compartiments cellulaires

Bien que l'architecture globale du ribosome soit conservée à travers le règne du vivant, formant un macro-complexe ribonucléoprotéique composé de deux sous-unités, ces entités possèdent néanmoins des particularités structurales, suivant l'organisme et/ou le compartiment où elles se trouvent (Figure i.2). Comme nous l'avons vu précédemment, une différence majeure est observable entre les ribosomes eucaryotes et procaryotes, puisque les premiers sont plus volumineux, contenant un plus grand nombre de protéines, des ARNr plus longs mais également un ARNr supplémentaire dans la grande sous-unité. Nous savons maintenant que les ribosomes ont évolué ainsi pour permettre un mécanisme de traduction de plus en plus complexe. En effet, chez les organismes eucaryotes, une plus grande diversité de protéines doit être traduite, et les mécanismes de décodage, de synthèse, de correction de la traduction et de modifications des peptides sont alors plus complexes. De même, les ribosomes présents dans les mitochondries et les chloroplastes montrent des particularités structurales, adaptées à la traduction des protéines codées par les génomes chloroplastiques et mitochondriaux ; les mitoribosomes sont particulièrement modifiés par rapport à la structure des ribosomes cytoplasmiques (voir ci-dessous).

Concernant les ribosomes des organites, le ribosome mitochondrial se trouve à l'intérieur de la matrice de la mitochondrie, fortement associé à la membrane. Cela permet l'insertion co-traductionnelle dans la membrane interne de la mitochondrie de la plupart des protéines codés par le génome mitochondrial, notamment les protéines de la chaîne respiratoire ⁷. Ces ribosomes contiennent moins d'ARNr et de protéines ribosomales que leurs homologues procaryotes et eucaryotes, et certains de leurs composants ne semblent pas avoir d'homologues chez les ribosomes cytoplasmiques (Figure i.2) ^{8,9}. De plus, il semble exister une diversité de ribosomes mitochondriaux, dont la structure peut fortement varier en fonction du type d'organisme (protiste, levure, mammifères, plantes ; voir Tableau Sup1 dans ⁷). Les particularités fonctionnelles de chacun des différents types de ribosomes mitochondriaux ne sont pas encore connues à ce jour. On observe cependant que les protéines entourant le tunnel de sortie du peptide sont pour la plupart spécifiques aux mitochondries (Figure i.2). De plus, bien que son existence et son rôle soient encore très contestés, un second tunnel de sortie du peptide semble exister dans la grande sous-unité des ribosomes mitochondriaux ^{8–11}.

Les ribosomes 70S de chloroplastes sont, quant à eux, beaucoup plus similaires à ceux retrouvés chez les bactéries, et possèdent peu de protéines ribosomales spécifiques (PSRP 1 à

6)¹². Ces PSRP semblent être localisées loin du tunnel de sortie du peptide (Figure i.2), et ne participeraient donc pas à la régulation des évènements co-traductionnels ¹².



Ribosome chloroplastique



Figure i.2 : Comparaison de l'organisation des ribosomes cytoplasmiques, chloroplastiques et mitochondriaux dans la région de l'extrémité du tunnel de sortie du peptide. La grande sous-unité des ribosomes est vue du dessus, au niveau de l'extrémité du tunnel de sortie (représentée par un rond noir), d'où émerge le polypeptide naissant. L'extrémité du probable second tunnel de sortie du ribosome mitochondrial est représentée par un carré noir. Les protéines ribosomales sont représentées de la même couleur si elles sont homologues. D'après Breiman *et al*, 2015⁷.

A.3- Le tunnel de sortie du peptide

Le tunnel de sortie est situé à l'intérieur de la grande sous-unité ribosomale, reliant le centre peptidyl-transférase (PTC) à la surface et permettant la sortie du peptide (Figure i.3). Sa longueur est évaluée à environ 80 à 100 Å ^{13,14}, permettant ainsi de contenir une chaîne peptidique d'une longueur de 30 à 60 acides aminés ^{15–17}. Le nombre d'acides aminés pouvant être présents dans le tunnel avant que la chaîne peptidique n'émerge dépend de la capacité du

peptide à se replier. Si aucune structure secondaire n'est formée (peptide en conformation étendue), alors le peptide sortira du tunnel une fois que 30 à 40 acides aminés auront été assemblés; si au contraire une structure secondaire se forme (type hélice α) alors la chaîne naissante contiendra 40 à 60 acides aminés avant d'émerger.

Ce tunnel est essentiellement formé par les régions conservées de l'ARNr 23S¹⁸, et possède donc un fort potentiel électronégatif^{19,20}. En plus de l'ARNr viennent s'ajouter des extensions des protéines ribosomales uL4 et uL22, qui contribuent à former une zone de constriction au sein du tunnel¹⁴ (Figure i.3). Nous ne connaissons pas encore le rôle précis de cette région, mais des études récentes suggèrent qu'elle permettrait de créer des interactions avec le peptide naissant, qui contribueraient à réguler la traduction²¹. On retrouve également une extension de la protéine uL23 aux abords de la sortie du tunnel¹⁸.



Figure i.3: Coupe transversale du ribosome 70S et visualisation du tunnel de sortie du peptide. Le tunnel de sortie du peptide se décompose en trois zones, les parties supérieures et inférieures contribuant au repliement de la chaîne peptidique, notamment via des interactions avec les protéines uL4, uL22 et uL23 constituant les parois du tunnel. Un ARNt (en vert) est présent dans le site P du PTC. La sous-unité 30S du ribosome est représentée en jaune et la 50S en bleu. D'après Knoops *et al*, 2012²²

Durant de nombreuses années, ce tunnel a été considéré comme un canal passif, permettant uniquement l'émergence du peptide à la surface du ribosome. Cependant, de récentes découvertes ont permis de mettre en évidence son rôle dans la régulation de la traduction. En effet, un certain nombre de séquences peptidiques peuvent entrer en interaction avec des composants du tunnel, ARNr ou protéines. Une séquence particulière de la protéine bactérienne SecM est un exemple de plus en plus documenté. Cette protéine permet la régulation de l'expression de la protéine SecA, et ainsi la régulation de la sécrétion des protéines. SecM possède en C-terminal une séquence dite « séquence d'arrêt SecM » qui, lorsqu'elle traverse le tunnel de sortie, induit une pause dans la traduction. En effet la séquence C-terminale d'arrêt de SecM est capable d'adopter une conformation compacte et d'interagir avec les composants du tunnel de sortie, au niveau de la zone de constriction ^{23,24}. Des

interactions spécifiques avec les protéines ribosomales uL4 et uL22 ainsi que l'ARN 23S modifient la conformation globale du ribosome ^{24,25}, qui observe alors une pause pendant la traduction. Très récemment, une structure en cryo-EM à environ 3,5 Å de résolution a permis de préciser au niveau atomique le mécanisme d'interaction de la séquence SecM avec le tunnel de sortie du peptide ²⁴ en montrant notamment un repositionnement de la sous-unité 30S par rapport à la 50S. Actuellement, des recherches sont en cours afin de muter des résidus dans la séquence C-terminale de SecM pour aboutir à des interactions plus forte avec le ribosome, et ainsi permettre une pause de la traduction plus importante ²⁶. D'autres études commencent à mettre en évidence le rôle de la séquence interne de SecM ²⁷, ainsi que la séquence N-terminale dans la régulation du mécanisme d'arrêt du ribosome ²⁸. D'autres séquences d'arrêt permettant la régulation de la traduction ont également été découvertes dans l'ensemble du règne du vivant, comme TnaC ²⁹, MfiM ³⁰, ErmCL ³¹, et ErmBL ^{31–34}.

A.4- Les étapes de la traduction chez la bactérie

Bien qu'il ait été montré que le ribosome est capable de synthétiser *in vitro* un peptide en absence de facteurs de traduction, le mécanisme est lent et le mode d'initiation non canonique ³⁵. En réalité, le ribosome ne peut assumer à lui seul la fonction de traduction dans la cellule et nécessite l'intervention de nombreux facteurs afin de réaliser de façon optimale le décodage de l'ARNm et la synthèse de la chaîne peptidique.

Ce mécanisme de synthèse des protéines se déroule en trois étapes - l'initiation, l'élongation et la terminaison - nécessitant l'intervention de plusieurs protéines auxiliaires.

L'initiation de la traduction permet de mettre en place une machinerie fonctionnelle en favorisant la reconnaissance de l'ARNm, de l'aminoacyl-ARNt initiateur, et en favorisant la formation du complexe ribosomal entier (70S). Chez les bactéries, la petite sous-unité reconnaît un motif consensus particulier, appelé séquence Shine-Dalgarno (SD), précédant le codon initiateur ATG, et s'y fixe. Des facteurs d'initiation (IF) permettent ensuite la reconnaissance et la fixation de l'ARNt initiateur (ARNt^{fMet}), ainsi que la stabilisation du complexe en vue du démarrage de l'élongation (Figure i.4). Une fois la grande sous-unité fixée, la synthèse peptidique à proprement parler peut alors débuter.

Ce complexe final (70S) recrute tour à tour des facteurs d'élongation (EF-Tu et EF-G) afin de d'assembler les acides aminés-ARNt. Le mécanisme de liaison des acides aminés se déroule dans le centre peptidyl-transférase (PTC) de la grande sous-unité. L'acide aminé-ARNt

arrive dans le site A, la liaison peptidique est formée avec l'acide aminé précédant se trouvant dans le site P, puis le ribosome se décale d'un codon (translocation). Le cycle va alors continuer, allongeant le polypeptide au site P, jusqu'à la reconnaissance d'un codon stop (Figure i.4).

La terminaison du processus de traduction se produit lorsque le site A du ribosome rencontre un codon stop (Figure i.4). La reconnaissance de ce codon implique deux facteurs de terminaison (« release factors » ou RF), RF1 et RF2 ³⁶. Ils participent au relargage de la chaîne peptidique liée à l'ARNt du site P. Un autre facteur de traduction intervient, RRF (« release recycling factor ») permettant la dissociation de l'ARNm et de l'ARNt présent dans le ribosome, et par la même occasion, les sous-unités ribosomales.



Figure i.4 : Vue d'ensemble du mécanisme de traduction chez la bactérie. Pour simplifier, toutes les étapes intermédiaires ne sont pas montrées. D'après Schmeing et Ramakrishnan, 2009⁶.

Cette étape de traduction de l'ARNm chez les procaryotes a lieu alors que la synthèse du messager (transcription) est toujours en cours. Au fur et à mesure que l'ADN est transcrit et que le messager s'allonge, les ribosomes se fixent à l'ARNm. Il est ainsi possible que plusieurs ribosomes se fixent les uns après les autres sur l'ARNm, formant ainsi un complexe appelé polysome, et permettant de traduire plusieurs fois la même protéine à partir d'un seul messager³⁷.

Les chloroplastes et les mitochondries possèdent leur propre ADN et machinerie de traduction. Dans ces compartiments la traduction de se déroule de façon similaire à celle retrouvée chez la bactérie^{38–40}, sans toutefois que les mécanismes ne soient encore suffisamment documentés pour bien comprendre leur spécificité ^{41 42}.

Chez les eucaryotes, le mécanisme de traduction dans le cytoplasme est globalement similaire, mais présente tout de même certaines différences. Tout d'abord, la méthionine initiatrice ne possède pas de groupement formyle comme observé chez les bactéries. Cependant, l'ARNt possédant la méthionine initiatrice est différent des ARNt chargés d'incorporer les méthionines internes à la séquence peptidique. L'ARNm ne contient pas de séquence Shine-Dalgarno, la petite sous-unité du ribosome vient donc se fixer en 5' de l'ARNm sur une séquence appelée « coiffe » et contenant une protéine particulière appelée CBP (CAP binding protein), et effectue un balayage ou scanning de la séquence nucléotidique, jusqu'à arriver au codon d'initiation AUG. Cette étape est assistée, en plus de la protéine CBP, par des facteurs d'initiation fixés sur une queue poly-A en 3' du messager, et qui se fixent à la petite sous-unité 40S en circularisant l'ARNm. La reconnaissance du codon d'initiation par l'ARNt initiateur déclenche la dissociation des facteurs d'initiation et le recrutement de la grande sous-unité 60S, pour le démarrage de la traduction. De plus, contrairement aux procaryotes chez qui la transcription et la traduction ont lieu dans le même compartiment et sont couplées, l'ARNm des eucaryotes est synthétisé dans le noyau, d'où il est ensuite exporté pour être traduit dans le cytoplasme, les deux processus ne pouvant donc pas avoir lieu simultanément.

A l'issue des trois grandes étapes décrites ci-dessus, les protéines sont nouvellement synthétisées. Cependant, la seule synthèse des chaînes peptidiques par le ribosome n'est pas suffisante pour obtenir des protéines fonctionnelles. En effet, d'autres étapes, co- et/ou post-traductionnelles, sont nécessaires. Les protéines nouvellement synthétisées doivent ainsi être repliées (par des mécanismes généralement assistés par des chaperons), et subissent généralement des modifications, réversibles ou non, comme l'ajout de groupements chimiques qui leur confèrent une fonction précise. Certaines protéines vont également être adressées vers des membranes, pour être sécrétées, insérées dans les membranes ou transloquées dans des compartiments cellulaires.

B- Les évènements co-traductionnels et les RPBs chez les procaryotes.

Dès que le peptide en cours de synthèse émerge à l'extrémité du tunnel de sortie du ribosome, les premiers évènements co-traductionnels se mettent en route, afin que la protéine puisse acquérir la fonction et la localisation adéquates. Parmi ces évènements, nous pouvons citer les modifications de l'extrémité N-terminale de la protéine, le repliement *de novo*, ainsi que la prise en charge du complexe chaîne naissante/ribosome pour l'adressage vers un compartiment spécifique. Tous ces évènements sont assistés par des facteurs spécifiques, les « ribosome-associated protein biogenesis factors » ou RPBs (Figure i.5).



 (PDF)
 l'interieur du tunnel
 (Nat)

 Figure i.5 : Les différents évènements co-traductionnels précoces qui touchent une protéine en cours de

synthèse lorsque celle-ci émerge du tunnel de sortie du ribosome. Les facteurs (RPBs) impliqués dans ces différents évènements sont indiqués.

B.1- Les RPBs

a) Les modifications de l'extrémité N-terminale du peptide naissant : la voie de l'excision de la méthionine N-terminale (NME)

L'excision de la méthionine N-terminale (voie de la NME) est le premier évènement cotraductionnel qui touche une protéine en cours de synthèse, dès que celle-ci émerge du tunnel de sortie. La NME est un mécanisme universel, essentiel et irréversible. Chez les procaryotes, cette modification est effectuée en deux étapes successives, chacune d'elle étant assurée par une enzyme dédiée : la peptide déformylase (PDF) clive le groupement formyl présent sur la méthionine initiatrice, puis la méthionine aminopeptidase (MetAP) excise la méthionine (Figure i.6). Cet évènement génère une grande diversité d'extrémités N-terminales et permet, dans certains cas, d'autres modifications de la chaîne peptidique en cours de synthèse. Bien que le caractère co-traductionnel de la NME était connu depuis la fin des années 1960, l'interaction directe entre les enzymes PDF et MetAP n'a été prouvée que récemment (voir section B.2 et B.3 de l'introduction).

Dans le cytoplasme des eucaryotes, le mécanisme de la NME ne comprend qu'une seule étape, l'excision de la méthionine initiatrice par la MetAP. En effet, la traduction dans le cytoplasme des eucaryotes commence avec une Met initiatrice libre.

Il existe de nombreuses isoformes des enzymes PDF et MetAP, dont la structure et le rôle seront détaillés dans les sections C.1 et C.2 de l'introduction.



Figure i.6 : Le mécanisme de la NME. La suppression du groupement formyl par la PDF n'a lieu que chez les bactéries et les organites. L'excision de la méthionine par la MetAP est universelle.

b) L'acétylation N-terminale : Une autre modification du N-terminal chez les protéines bactériennes

Il est maintenant admis que les protéines bactériennes peuvent être acétylées, y compris au niveau de l'extrémité N-terminale ^{43–46}. L'acétylation, catalysée par les enzymes RimI/J/L, touche la Met initiatrice si celle-ci n'est pas clivée par la voie de la NME, ou le deuxième acide aminé (plus fréquemment Ser, Ala ou Thr), qui devient accessible après clivage de la Met initiale. Comme chez les eucaryotes, l'acétylation N-terminale des protéines bactériennes est vraisemblablement co-traductionnelle.

L'acétylation N-terminale des protéines bactériennes reste relativement rare (moins de 20% du protéome bactérien d'après les données actuelles), alors qu'elle est très fréquente chez les eucaryotes avec plus de 20% des peptides N-terminaux qui n'ont pas subi la NME, aboutissant à une acétylation de la Met initiatrice, et plus de 50% des peptides N-terminaux qui l'ont subi (acétylation du deuxième acide aminé) ⁴⁷. Cette modification est également fortement présente dans le protéome des chloroplastes, mais très rare dans le protéome de la mitochondrie. Enfin l'acétylation du N-terminal a également été identifiée chez les archées ⁴⁸.

L'acétylation de l'extrémité N-terminale des protéines est essentielle pour la viabilité cellulaire chez les eucaryotes ^{47,49,50}. Elle serait également impliquée dans la dégradation des protéines ⁵¹, l'adressage membranaire et les interactions protéine-protéine ^{52,53}. Cependant, le rôle de cette modification chez les procaryotes n'est pas encore connu.

c) Repliement de la chaîne peptidique en cours de traduction : le trigger factor (TF)

Chez les bactéries, le repliement *de novo* des petites protéines est le plus souvent (65 à 80% des cas) assuré par le trigger factor (TF), un chaperon moléculaire qui agit très précocement pendant la traduction, alors que les protéines plus grosses nécessitent ensuite l'intervention d'autres chaperons, avec les systèmes DnaK/DnaJ et GroEL/GroES ^{54,55}. Le TF permet d'éviter également l'agrégation des protéines en cas de mauvais repliement, et évite ainsi une issue fatale pour les cellules, notamment à des températures supérieures à 30°C ^{56,57}. Bien que les protéines DnaK/DnaJ assistent le repliement des protéines de façon co-traductionnelle, seul le TF a été montré a l'heure actuelle comme étant en interaction directe avec le ribosome (voir section B.2 et B.3 de l'introduction).

Cette protéine de 48 kDa se décompose en trois domaines (Figure i.7). Le domaine Nterminal de 149 acides aminés est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec le ribosome ^{58–60}. La partie centrale de la séquence protéique se replie de façon à former un domaine à fonction peptidyl–prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase). Ce domaine n'est pas essentiel *in vivo*, il intervient dans la reconnaissance du substrat et l'activité chaperone, mais son rôle précis reste cependant encore mal connu ^{60–62}. Enfin le domaine C-terminal correspond au module principal d'activité chaperonne. Le TF expose des résidus hydrophiles et hydrophobes, et les différents domaines possèdent une bonne flexibilité, le tout permettant au TF de s'accommoder à un grand nombre de substrats ^{59,63,64}.



Figure i.7: Structure du Trigger factor (TF) d'*E. coli*, **composé de trois domaines.** En vert et bleu le domaine C-terminal à activité chaperonne, en rouge le domaine N-terminal permettant l'interaction avec le ribosome, et en jaune le domaine PPIase dont la fonction est encore mal connu. Les trois domaines du TF sont également nommés T (tail), H (head) et A (Arm). D'après Ferbitz *et al*, 2004⁶³

d) Le repliement de la chaîne peptidique dans le tunnel de sortie du peptide

Le tunnel de sortie du peptide joue un rôle dans la régulation de la traduction, en permettant au ribosome de ralentir, voire de s'arrêter durant la synthèse ^{65,66}. En effet, les résidus chargés positivement, comme les lysines ou arginines présentes dans la chaîne naissante, peuvent ralentir ou arrêter la traduction grâce à des interactions charge-spécifiques entre la chaîne peptidique et le tunnel ^{19,20,66}. Il permet également de provoquer un repliement co-traductionnel du peptide, avant même son émergence à la surface et sa prise en charge par les protéines chaperonnes. Il a été montré par cryo-EM que chez le ribosome eucaryote 80S, le repliement co-traductionnel du peptide en hélice α pouvait être initié à l'intérieur même du tunnel ^{67–70}. De plus, certaines séquences peuvent se replier jusqu'à former des domaines complets au sein du tunnel, comme des petits domaines en doigts de zinc ²¹ (Figure i.8A).

Enfin, il a également été montré par des méthodes utilisant la spectroscopie RMN que le peptide naissant pouvait se replier partiellement à la surface du ribosome, à proximité de l'extrémité du tunnel de sortie, par des interactions avec l'ARNr et la protéine uL24⁷¹ (Figure i.8B). Les auteurs suggèrent que ce repliement partiel contribuerait à réduire les risques de mauvais repliement. Comme un certain nombre d'autres évènements co-traductionnels, le repliement du peptide naissant qui ne nécessite pas l'action de RPBs est dépendant de la séquence du peptide.

A



Figure i.8: Repliement du peptide naissant à l'intérieur du tunnel de sortie du ribosome. A) Formation de structure secondaire du peptide ADR1 à l'intérieur du tunnel de sortie du peptide. Coupe transversale de densité obtenue par cryo-EM. La séquence SecM permettant de bloquer le ribosome en cours de synthèse est représentée en vert, et un domaine de la protéine ADR1 en rouge (PDB: 2ADR). La petite sous-unité 30S est représentée en jaune, et la grande sous-unité 50S en gris. D'après Nilsson *et al* , 2015 ²¹. **B**) Structure RMN d'un complexe ribosome/chaîne naissante (chaîne peptidique de 110 acides aminés) montrant le repliement co-traductionnel du peptide à la surface du ribosome. Le domaine désordonné est représenté en cyan, et le domaine replié naturellement en rose (PDB 2N62 et BMRB 25748). D'après Cabrita *et al*, 2016 ⁷¹.

e) Adressage du peptide en cours de synthèse vers la membrane : voies SRP et Sec

L'adressage d'un peptide vers une membrane se fait généralement en cours de traduction, ce qui permet de ne pas exposer ses zones hydrophobes, évitant ainsi des défauts de repliement et l'agrégation des protéines membranaires. Deux voies d'adressage aux membranes sont possibles, via les particules SRP (« signal recognition particule ») et la voie Sec. La voie TAT (« twin arginine translocation ») est également utilisée si la protéine est déjà repliée ⁷².

Chez les eucaryotes, les particules SRP sont des complexes ribonucléoprotéiques, composés de six protéines (SRP54/19/68/72/9/14) et d'une molécule d'ARN ^{73,74}. La protéine SRP54, très conservée, possède un domaine M qui reconnaît la séquence signal hydrophobe du peptide naissant, et un domaine NG qui se fixe au ribosome ^{73,74}. Chez les bactéries, la particule SRP est constituée d'une seule protéine (Ffh, qui est l'homologue de la protéine SRP54 des eucaryotes), complexée à une molécule d'ARN ^{73–75} (Figure i.9A). Fhf possède, comme SRP54, des domaines M et NG qui reconnaissent l'hydrophobicité du peptide émergeant du ribosome, permettant la formation d'un complexe ribosome:peptide:SRP, lequel est ensuite envoyé vers la membrane plasmique ⁷⁵. Il semblerait que le caractère hydrophobe du peptide naissant soit nécessaire mais pas suffisant pour permettre sa prise en charge par la SRP, et que la rapidité du peptide à se replier dans le cytoplasme influe négativement sur son interaction avec la SRP ⁷⁶.



Figure i.9 : Structure de la SRP d'*E.coli* **et interaction avec le ribosome. A**) Modèle moléculaire de la SRP d'*E.coli*. Le domaine M de la protéine Ffh est représenté en jaune, et son domaine NG en vert ; l'ARN 4,5S est en orange. D'après Schaffitzel *et al*, 2006⁷⁷ **B**) En absence de chaîne naissante, la SRP interagit avec le ribosome au niveau de la protéine uL23 via son domaine N, alors que le domaine M scanne le tunnel de sortie dans l'attente du peptide signal. A ce stade, les domaines M et NG sont flexibles et peuvent donc adopter des orientations différentes. Une fois le peptide signal repéré, la SRP se retrouve fixée au RNC avec trois points de contact avec la sous-unité 50S. Ffh se lie à uL23 et uL29 et l'ARN 4,5S à uL18. Le peptide vient alors s'ancrer dans la poche hydrophobe du domaine M, et le domaine NG voit son affinité pour le GTP augmenter, ce qui est nécessaire pour l'interaction avec le récepteur FtsY. La sous-unité 30S est représentée en jaune, la grande sous-unité 50S en bleu, le peptidyl-ARNt en vert, la SRP en rouge et les protéines ribosomales de contact, uL18 et uL23 en orange. D'après Schaffitzel *et al*, 2006⁷⁷.

De plus, il a été montré que d'autres paramètres ont une influence sur l'interaction entre le peptide naissant et la SRP. Ainsi si la séquence signal est défavorable à un repliement en hélice α , cela empêche la reconnaissance par la SRP ⁷⁸, alors que la présence de plusieurs résidus

basiques favorise cette interaction ⁷⁹. Des résultats récents montrent que la chaîne naissante comprenant le peptide signal de la proteine DsbA, cible de la SRP, adopte une structure étendue dans le ribosome, avec seulement des populations mineures de structure hélicoïdale ⁸⁰, indiquant que la SRP pourrait tout de même reconnaître des peptides qui n'adoptent pas de structure secondaire en hélice α .

Après la reconnaissance du peptide signal par la SRP et son transport jusqu'à la membrane, la chaîne en cours de synthèse est alors prise en charge par des récepteurs de particules SRP (SR chez les eucaryotes, FtsY chez les bactéries) permettant sa translocation au niveau du complexe membranaire SecYEG de la membrane interne. Cette voie peut aussi permettre à des protéines de passer dans le périplasme ou la membrane externe ⁷⁶.

La voie Sec est une voie d'adressage des protéines membranaires indépendante des particules SRP, faisant intervenir les protéines SecA et SecB^{81,82} (Figure i.10). La protéine SecB interagit avec la chaîne naissante de certaines protéines et permet d'éviter des défauts de repliement ⁸³. La façon dont SecB distingue les peptides qui doivent être transloqués est encore mal connue. Une séquence de 9 acides aminés avec des cycles aromatiques ou résidus basiques semblent être favorables, alors que les résidus acides ne semblent pas appropriés ⁸¹. Le complexe chaîne naissante:SecB interagit également avec SecA, par une interaction directe SecA:SecB qui permet de transporter le complexe jusqu'à la membrane, pour la translocation du peptide en cours de synthèse au travers du complexe SecYEG. La protéine SecA ne sert pas uniquement à adresser le peptide vers la membrane, elle permet également la translocation du peptide par son activité ATPase en fournissant l'énergie nécessaire au système et en permettant le décrochage de SecB. SecA se décroche du complexe une fois que la translocation du peptide est effectuée ^{83–85}.

24



Figure i.10: Schéma de l'adressage des protéines par le système Sec translocase. Le système Sec translocase se trouve dans la membrane interne (ou membrane cytoplasmique (CM)), et fait intervenir le moteur SecA (en vert) et le canal conducteur SecYEG (en orange) ainsi que des protéines auxiliaires comme YidC (en rouge) et SecDF (en rose). La protéine Signal peptidase (SPase) permet de cliver le peptide signal sur la surface périplasmique de la membrane. a) La protéine sécrétée est adressée au système Sec translocase par sa séquence signal, qui est reconnue directement par SecA, ou avec l'aide de SecB (en bleu). b) Les protéines membranaires peuvent être adressées au système translocase en formant un complexe ribosome:chaîne naissante:SRP et par le récepteur SRP, FtsY (en violet). c) Certaines protéines membranaires sont insérées dans la membrane via YidC. D'après Driessen et Nouwen, 2008⁸¹.

B.2- interactions RPB/ribosome

Comme décrit, plusieurs facteurs agissent sur le peptide naissant au moment où celui-ci émerge du tunnel de sortie. Cela contribue à lui conférer un certain nombre de propriétés qui permettront à la protéine synthétisée d'acquérir sa fonction et donc d'assurer son destin. Il est maintenant connu que tous ces facteurs exercent leur fonction de façon très précoce, en interagissant à la fois avec le peptide naissant mais aussi avec le ribosome. Bien que de nombreuses questions subsistent, l'accumulation des données permet de mieux comprendre la régulation des évènements co-traductionnels - modifications, repliement, adressage.

Ainsi, pour bien comprendre la dynamique spatio-temporelle d'intervention des RPBs, il est nécessaire d'avoir un grand nombre d'informations les concernant : leur concentration intracellulaire, leur localisation sur le ribosome, leur affinité pour celui-ci ainsi que l'influence de la taille et de la nature du peptide naissant. L'ensemble de ces paramètres permet ainsi de proposer des modèles pour comprendre leur intervention durant la synthèse, ainsi que leur possible coopération/exclusion au niveau du ribosome.

Le caractère co-traductionnel de la voie de la NME a été décrit chez les bactéries il y a près de 50 ans. Il avait alors été montré que la déformylation de la méthionine initiatrice, suivie de son excision, ont lieu très tôt dans la synthèse des protéines, dès que le polypeptide en cours de synthèse émerge du tunnel de sortie du ribosome, lorsqu'il dépasse une taille d'environ 40 \pm 5 acides aminés, pouvant aller jusqu'à 60 résidus ^{86–89}. Cependant, il a longtemps été admis que la PDF n'interagissait pas avec le ribosome, car cette interaction n'était pas détectable, mais aussi parce que l'enzyme est capable de déformyler un peptide en absence de ribosomes ⁹⁰. Ce n'est qu'en 2008 que des études de co-sédimentation ont montré que la PDF d'E. coli interagit avec le ribosome, entier ou la grande sous-unité 50S, selon une stechiométrie 1:1 et avec une affinité relativement faible ($K_d = 1.8 \pm 0.9 \,\mu\text{M}$ pour le 70S) ⁹¹. Ayant remarqué que le complexe EcPDF:ribosome était sensible à la force saline du tampon, les auteurs ont présumé que le maintien du complexe devait reposer en grande partie sur des interactions électrostatiques et ont supposé que l'hélice α C-terminale de la PDF (voir section C.2), chargée positivement, pouvait être impliquée dans l'interaction. Ils ont alors délété cette hélice et montré que le variant *Ec*PDF- Δ C n'était plus capable d'interagir avec le ribosome, aboutissant à la conclusion que cette hélice était vraisemblablement responsable de l'interaction *Ec*PDF:ribosome ⁹¹. Forts de ce résultat, les auteurs ont alors résolu la structure cristalline d'un complexe entre un ribosome 70S d'E. coli et un peptide synthétique de 22 acides aminés dont la séquence correspond à celle de l'hélice α C-terminale d'*Ec*PDF (résidus 147 à 168). Cette structure montre que le peptide utilisé, replié sous forme hélicale, vient se loger dans un sillon situé entre les protéines ribosomales uL22 et bL32, à proximité de la protéine bL17 (Figure i.11) ⁹¹. Cette zone d'interaction est en accord avec des données de pontage chimique entre EcPDF et le ribosome 70S qui, couplées à une analyse en spectrométrie de masse, ont permis d'identifier la protéine bL17 comme partenaire ⁹¹. Les interactions entre ce peptide C-terminal et le ribosome impliquent des ponts salins ainsi que des contacts hydrophobes: la chaîne latérale de la Leu149 du peptide est insérée dans une poche hydrophobe de la protéine ribosomale uL22, le résidu Arg153 forme un pont salin avec le résidu Glu59 de la protéine ribosomale uL22, et le résidu Lys157 interagit avec l'hélice 24 du domaine I de l'ARNr 23S⁹¹. Partant de cette structure, les auteurs ont superposé la structure de la PDF d'E. coli entière sur le peptide mimant son hélice C-terminale, de façon à modéliser le complexe PDF:ribosome. D'après ce modèle (Figure i.11), le site actif de la PDF serait positionné vers l'extrémité du tunnel de sortie, à environ 35 Å de celui-ci. Cette distance correspond à la longueur qu'adopte un peptide de 13 acides aminés qui ne forme pas de structure secondaire. Ainsi, en considérant que la longueur du tunnel

correspond en moyenne à un peptide de 35 acides aminés en conformation étendue, cela signifie que la PDF accueillerait dans son site actif un peptide long de 50 acides aminés ⁹¹, taille qui est tout à fait cohérente avec ce qui avait été montré précédemment ^{86,87}. Enfin, considérant que les trois résidus impliqués dans l'interaction avec le ribosome sont conservés dans la famille des PDFs, les auteurs ont alors abouti à la conclusion que l'hélice C-terminale des PDFs est le déterminant majeur de l'interaction des PDFs avec le ribosome ⁹¹, hypothèse corroborée par des travaux qui montrent que cette hélice n'est pas indispensable à l'activité peptide déformylase ⁹².

Or l'analyse des structures tridimensionnelles de plusieurs dizaines de PDFs procaryotes et eucaryotes par cristallographie et RMN montre qu'elles peuvent présenter des structures différentes du C-terminal, sur lesquelles nous reviendrons plus loin dans l'introduction (voir Section C.2). Ainsi le modèle d'interaction entre la PDF 1B d'*E. coli* et le ribosome ne peut être généralisé à toutes les classes de peptides déformylases ⁹³.

Une étude plus récente, comparant l'interaction d'*Ec*PDF avec des ribosomes vides et des ribosomes en cours de traduction, bloqués avec une chaîne peptidique de 40 acides aminés, n'a pas révélé de différence dans la valeur de l'affinité, suggérant que la taille de la chaîne en cours de traduction n'a pas d'effet sur la fixation d'*Ec*PDF avec le ribosome ⁹⁴.



Figure i.11 : Interaction de la peptide déformylase d'*E.coli* **avec le ribosome. A**) Interaction d'un peptide synthétique correspondant à l'hélice α C-terminale d'*Ec*PDF, au niveau des protéines ribosomales uL22 (en rose), bL32 (en jaune). Le tunnel de sortie du peptide est représenté par une étoile rouge. **B**) Superposition de la structure d'*Ec*PDF sur le ribosome, d'après les données de cristallographie obtenues avec le peptide synthétique correspondant à l'hélice α C-terminale. Figures d'après Bingel-Erlenmeyer *et al*, 2008 ⁹¹.

27

А

Les premières études sur la NME ont montré que la Met initiatrice est éliminée de la protéine en cours de synthèse sitôt après le clivage de son formyl, et lorsque 40 à 60 résidus ont été synthétisés ^{86,87,89}. Plusieurs approches ont montré que les MetAPs, responsables de l'excision de la Met initiatrice, interagissent avec le ribosome ^{94–96}, avec une affinité de 2,4 \pm 0,4 μ M ⁹⁴, mais la (les) région(s) des MetAPs impliquée(s) dans l'interaction n'ont pas encore été clairement identifiée(s). Il existe plusieurs types de MetAPs (voir Section C.1), qui se distinguent notamment par l'existence de domaines N-terminaux spécifiques (domaine en doigt de zinc, domaine poly-chargé, motif d'interaction aux domaines SH3) ⁴⁷, lesquels seraient impliqués dans l'interaction avec les ribosomes ^{95,97,98}, ce qui reste à démontrer. Chez *E. coli*, une boucle chargée positivement, située dans le domaine catalytique à proximité du site actif de la MetAP, permettrait l'interaction avec les protéines ribosomales bL17 et uL23 (Figure i.12) ⁹⁴.



Figure i.12 : Interaction putative d'*Ec***MetAP avec le ribosome bactérien. A**) Potentiel électrostatique à la surface de la MetAP. En bleu le potentiel positif et en rouge le potentiel négatif. En bas, boucle chargée positivement, contenant la Lys211, permettant l'interaction de la MetAP avec le ribosome. B) Modèle *in silico* du complexe MetAP:ribosome. Représentation de la MetAP en cartoon bleu foncé. L'ARNr en gris, et les protéines ribosomales bL17, bL32, uL22 et uL23 en rouge, jaune violet et orange, respectivement. D'après Sandikci *et al*, 2013 ⁹⁴.

De nombreux travaux ont permis de montrer que le trigger factor (TF) interagit avec les protéines ribosomales uL23 et uL29 ainsi qu'avec l'ARNr 23S, principalement par l'intermédiaire de son domaine N-terminal ^{63,99,100}. Plusieurs structures de complexes entre le

domaine N-terminal du TF et le ribosome (entier ou uniquement la grande sous-unité 50S) ont révélé que ce domaine se positionne au niveau de l'extrémité du tunnel de sortie du peptide ^{63,100,101} (Figure i.13A), sous la forme d'une cavité hydrophobe, conférant au TF un rôle de bouclier pouvant assister le repliement de la nouvelle protéine ^{63,102} (Figure i.13B). Au vu de l'affinité du TF pour le ribosome et de sa concentration dans la cellule, il est probable que celuici ait la capacité de se fixer sur n'importe quel ribosome, en cours de traduction ou non, et dont le peptide possède la séquence appropriée ou non. Cependant plusieurs études tendent à démontrer que le TF interagit préférentiellement avec un ribosome en cours de traduction, la chaîne naissante avant une influence sur l'affinité TF:ribosome. La taille du polypeptide naissant pris en charge par le TF est encore incertaine, allant de 20 à 60 acides aminés 63,64,103,104, et il a été montré qu'il pourrait même se fixer bien plus tardivement, sur un peptide d'au moins 100 résidus encore en cours de synthèse, mais sans interaction avec le ribosome ¹⁰⁵. Il a également été observé que l'affinité du TF pour un ribosome contenant une chaîne naissante est d'autant plus importante que le peptide est long (environ 100 résidus) et hydrophobe ^{94,105–108}. De plus, l'association de régions hydrophobes et chargées positivement sur le peptide favorise le recrutement du TF.



Figure i.13: Interaction du TF avec le ribosome. A) Structure du complexe formé entre le domaine Nterminal du TF (les 112 acides aminés faisant partie du domaine d'interaction) et la sous-unité 50S de *Deinococcus radiodurans.* L'ARNr et les protéines ribosomales sont colorés en bleu pâle, exceptés les protéines uL22 (cyan), uL23 (vert), uL24 (jaune) et uL29 (orange). Le tunnel de sortie du peptide est indiqué par une flèche. Deux orientations de la sous-unité sont représentées, avec les protéines uL1 et bL12 (L7/L12) comme références. D'après Schlunzen *et al*, 2005 ¹⁰⁰. **B)** La détermination de la structure cristalline du domaine Nterminal (domaine T sur la figure) du trigger factor avec le ribosome a permis d'établir un modèle de la fixation du trigger factor entier sur le ribosome. Les trois domaines, A (C-terminal), T (N-terminal) et H (PPIase) du trigger factor sont représentés. La chaîne naissante arrive au niveau d'une cavité hydrophobe du TF. Le contact principal du TF avec le ribosome se fait au niveau de la protéine uL23. Le peptide entame ensuite probablement un repliement précoce dans la cavité hydrophobe formée par le TF. D'après Horwich, 2004 et Ferbitz *et al*, 2004 ^{63,102}.

Diverses études structurales ont montré que les particules SRP interagissent avec le ribosome bactérien dans une région située à proximité de l'extrémité du tunnel de sortie du peptide, plus précisément avec les protéines ribosomales uL23 et uL29 ^{77,109,110} (Figure i.9B), le domaine NG permettant cette interaction avec le ribosome ²². Le domaine M permet lui, l'accrochage avec le peptide naissant ⁷³. L'ARN 4,5S peut également interagir avec la protéine ribosomale uL18. Le peptide signal reconnu par la SRP montre de fortes variations en terme de taille et de composition en acides aminés, mais il présente toujours une région hydrophobe ¹¹¹. Il est difficile de discriminer les peptides qui seront pris en charge par la voie Sec et ceux par la voie SRP ¹¹². Bien que la SRP puisse interagir avec un ribosome en absence de chaîne naissante, celle-ci permet d'augmenter fortement l'affinité de la SRP pour le complexe RNC ^{113–115}. Il semblerait que la fenêtre d'intervention de cette enzyme soit assez courte, puisque qu'elle ne peut plus interagir si le peptide naissant dépasse une longueur d'environ 140 acides

aminés ^{113,114,116}. De plus, il a été montré que la majorité des interactions de la SRP avec le ribosome se font lorsque le peptide atteint une taille d'environ 40 à 55 acides aminés, lorsque le peptide émerge du tunnel ^{116,117}. Cependant, une étude récente suggère que la SRP peut interagir avec le complexe RNC, bien avant que le peptide émerge à la surface, par l'intermédiaire de son domaine protéique M, qui entre en contact avec le peptide naissant à l'intérieur du tunnel ¹¹⁰. Concernant le récepteur SecYEG, il entrerait en contact avec le ribosome au niveau de la protéine uL23 lors de la translocation du peptide ¹¹⁸. Ainsi, suivant l'organisme étudié, la technique utilisée ainsi que la nature du peptide en cours de synthèse, il est encore difficile de déterminer précisément la fenêtre temporelle d'intervention de cette enzyme.

Comme décrit plus haut, un certain nombre de protéines bactériennes (protéines périplasmiques ainsi que protéines de la membrane externe) peuvent être adressées à la membrane cytoplasmique par la voie Sec, indépendamment de la voie SRP (Figure i.10), ce qui permet leur translocation à travers cette membrane. Les protéines prises en charge par la voie Sec possèdent en N-terminal une séquence signal, qui est clivée durant la translocation⁸². Il a longtemps été admis que l'adressage par la voie Sec était intégralement post-traductionnel ^{81,82,119}, la reconnaissance de la protéine substrat et sa translocation se faisant une fois le peptide détaché du ribosome. Il a cependant été démontré que SecA peut interagir avec des peptides naissants ^{120–122} ainsi qu'avec les ribosomes, à proximité du tunnel de sortie du peptide ^{123,124}; l'affinité de SecA pour un ribosome bloqué en cours de traduction est inférieure à 0,5 µM¹²³. Ainsi SecA reconnaîtrait le peptide naissant (contenant environ 160 résidus), l'adresserait à la membrane plasmique où il se détacherait et serait alors transloqué de façon post-traductionnelle (Figure i.10)¹²³. Le rôle de SecB n'est pas encore bien compris, mais il contribuerait, grâce à sa fonction chaperon et à une interaction directe avec SecA, à l'adressage du peptide vers le translocon SecYEG (Figure i.10)¹²³. De même il n'est pas encore clairement défini comment SecA interagit avec le ribosome puisque des études contradictoires montrent que SecA pourrait se fixer sous forme monomérique ¹²³ ou dimérique ¹²⁴. Une première molécule de SecA se fixerait à la protéine ribosomale uL23^{123,124}, puis une deuxième interagirait avec les protéines ribosomales uL22 et uL24, recouvrant totalement l'extrémité du tunnel de sortie ¹²⁴ (Figure i.14).

31



Figure i.14: Le ribosome 70S en interaction avec deux molécules de SecA. La première protéine SecA vient se fixer sur la protéine ribosomale uL23. La seconde molécule SecA vient se fixer au niveau des protéines ribosomales uL22/uL24 à l'extrémité du tunnel de sortie du peptide. Les deux molécules entourent complètement le tunnel de sortie du peptide. Dans ce modèle, ni le TF ni la SRP ne peuvent interagir de concert avec SecA Singh *et al*, 2014 ¹²⁴.

B.3-La plateforme d'interaction des RPBs / régulation

Comme nous l'avons vu, un certain nombre de protéines non-ribosomales sont chargées d'effectuer des modifications sur le peptide naissant, très précocement durant la synthèse. Afin que les étapes d'élongation, de repliement, d'adressage et de contrôle qualité permettent une synthèse efficace et ainsi d'aboutir à une protéine repliée, fonctionnelle et correctement localisée, une coordination efficace doit être établie entre les différents facteurs. Ainsi, l'ensemble des protéines ribosomales se trouvant sur la surface du ribosome, autour du tunnel, contribue à former une plateforme d'interaction et de régulation pour l'intervention des facteurs auxiliaires ^{94,125–127}. Cette région comprenant les protéines ribosomales bL17, bL22, bL32, uL24, uL29 et uL23 semble donc être fortement impliquée dans la régulation des modifications co-traductionnelles précoces (Figure i.15)²². D'ailleurs, il apparaît que la protéine uL23 est un site de fixation universel pour plusieurs facteurs, tel le TF¹²⁸, SecA¹²³ et SRP⁷⁷. Cette protéine possède un domaine constituant une partie du tunnel de sortie, et un domaine à la surface du ribosome. Il est donc fortement suspecté qu'elle puisse permettre un forme de communication entre la chaîne en cours de synthèse à l'intérieur du tunnel et la surface du ribosome, bien que ce mécanisme n'ai pas encore été démontré. Il faut également noter que même si les protéines ribosomales impliquées dans les interactions avec les différents RPBs sont identifiées, il est également important de prendre en compte l'encombrement stérique des RPBs (Figure i.15B).



Figure i.15: Plateforme de recrutement des facteurs impliqués dans les modifications co-traductionnelles précoces du N-terminal des protéines chez le ribosome d'*E .coli***. A) Repésentation des différents facteurs intervenant au niveau du tunnel de sortie du peptide. B) Localisation des différents acteurs des modifications précoces du N-terminal, aux abords du tunnel de sortie du peptide. L'étoile jaune représente la sortie du tunnel du peptide. TF pour trigger factor, PDF pour peptide deformylase, SRP pour « signal recognition particle » et MetAP pour methionine aminopeptidase. D'après Selmer et Liljas, 2008¹²⁷.**

La synthèse des études réalisées sur ces différents facteurs a donc permis de déterminer la localisation des différents RPBs sur le ribosome (Figure i.15A) et ainsi d'établir des modèles dynamiques de la régulation des modifications co-traductionnelles (Figure i.15B).

Chez *E. coli*, la PDF interagit au niveau des protéines ribosomales bL17 et uL22 ⁹¹, et la MetAP au niveau des protéines ribosomales bL17 et uL23 (Figure i.15B) ⁹⁴. Bien que ces sites de fixation soient distincts, ils sont suffisamment proches l'un de l'autre pour entraîner un encombrement stérique si les deux protéines se fixaient en même temps au ribosome, conduisant à une compétition entre la PDF et la MetAP (Figure i.15B) ⁹⁴. La déformylation ayant lieu obligatoirement avant l'excision de la méthionine initiatrice ¹²⁹, la PDF intervient nécessairement sur la chaîne avant la MetAP. Ainsi, la cinétique rapide de la PDF, sa faible affinité pour le ribosome et sa faible abondance (environ 1300 PDF par cellule, pour 50000 ribosomes) sont autant de facteurs suggérant qu'elle pourrait scanner le ribosome et agir rapidement sur la chaîne pour ensuite se décrocher et laisser la MetAP agir. Jusqu'à présent aucune donnée ne suggère que la longueur de la chaîne peptidique a une influence sur

l'interaction ⁹⁴. De plus, des études *in vitro* n'ont pas montré de spécificité de substrat ¹³⁰. Actuellement, il n'a donc pas été observé que l'état de traduction du ribosome avait une influence sur le recrutement de la PDF. En ce qui concerne l'excision de la méthionine, il apparaît que cet évènement intervient lorsque la chaîne peptidique atteint une longueur de 40 à 50 acides aminés ⁹⁴ et que la nature du second acide aminé, ainsi que les 4-5 suivants, ont une influence sur les paramètres cinétiques de la MetAP ¹³¹. Une étude réalisée avec des ribosomes bloqués ayant une chaîne de 40 acides aminés n'a cependant pas montré une influence de la chaîne peptidique sur l'affinité de la MetAP avec le ribosome ($K_d = 2,4 \pm 0,4 \mu M$) ⁹⁴. Il est supposé que les cinétiques rapides d'intervention de ces deux enzymes permettent de compenser leur faible abondance dans la cellule ⁹⁴. Cependant, la littérature ne donne encore que très peu d'informations sur la régulation de l'intervention de ces deux enzymes.

Nous avons vu que le TF interagit avec le ribosome au niveau des protéines ribosomales uL23 et uL29 (Figure i.15B). Même si le TF possède une forte affinité pour le ribosome ($K_d =$ 2 nM pour des ribosomes en cours de traduction et 100 nM pour des ribosomes dépourvus de chaîne naissante)¹³², il a été montré que plus la chaîne peptidique est longue, plus le TF a d'affinité pour le complexe ribosome: chaîne naissante (RNC)^{107,108}. Une chaîne de 43 acides aminés peut interagir avec le TF, mais c'est à partir de 90 acides aminés que la chaîne naissante engage le plus d'interactions avec le TF, notamment avec le domaine PPIase. Ainsi, les auteurs ont suggéré que le mécanisme d'assistance au repliement effectué par le TF a lieu de façon optimale lorsque la chaîne peptidique atteint une longueur de 90 acides aminés ⁶⁴. Cependant, étant donné que l'affinité du TF pour les ribosomes vide est assez importante ¹³², que la nature du peptide naissant présent dans le tunnel influence son affinité ¹³³, et que sa durée de fixation sur le ribosome est relativement longue (entre 15s et 50s suivant les caractéristiques du peptide en cours de synthèse et partant du principe que les ribosomes assemblent entre 10 et 20 acides aminés par seconde)^{1,108}, les auteurs ont supposé que ce facteur peut interagir avec le ribosome dès le début de la traduction, et qu'il reste fixé aux abords du tunnel de sortie du peptide jusqu'à ce que le peptide atteigne une longueur d'environ 150 à 200 résidus ⁶⁴. Cette hypothèse reste valide si on tient compte du fait que ce facteur n'entre pas en compétition avec la PDF et la MetAP⁹¹. En 2008, alors que les données d'interaction de la MetAP avec le ribosome n'étaient pas encore disponibles, le site de fixation du TF au ribosome étant différent de celui de la PDF, il a tout d'abord été proposé qu'il puisse interagir simultanément avec la PDF et la MetAP (en supposant que celle-ci n'entrait pas en compétition avec la PDF). Cela permettant de diriger la chaîne émergente vers l'une ou l'autre des deux enzymes se trouvant de part et d'autre du TF

(Figure i.15B)⁹¹. Pourtant, des études *in vivo* plus récentes proposent une forme de compétition entre le TF et la PDF 94,132, car la surexpression du TF semble provoquer une croissance cellulaire légèrement réduite, phénotype particulièrement évident lorsque les cellules qui expriment la PDF endogène d'E. coli ont été traitées avec un inhibiteur de PDFs, l'actinonine. Cette inhibition cellulaire par surexpression de TF est également exacerbée lorsque les cellules inhibées par l'actinonine expriment la version tronquée en C-terminal de la PDF d'E. coli. Etant donné que les 21 derniers résidus de l'hélice C-terminale de la PDF d'E. coli ne sont pas nécessaires pour assurer le caractère essentiel de la PDF in vivo⁹⁴, mais qu'une interaction de celle-ci avec le ribosome a été observée, les données in vivo ci-dessus ne trouvent pas d'explication à ce jour. Pour compliquer encore davantage le scénario, plusieurs données d'interaction in vitro montrent que TF et PDF ou MetAP peuvent se lier simultanément à ribosomes ou RNC 94,132. Même si des compétitions partielles entre ces facteurs ont pu être observées ⁹⁴, il a été proposé que TF reste lié lorsque la PDF interagit avec les RNCs spécifiques ou les ribosomes vides mais avec des agencements modifiés (des modifications partielles où aucune altération du K_d pour la liaison du TF au ribosome n'a été observée en présence de concentrations croissantes de PDF)¹³². Les mêmes résultats ont été rapportés pour la MetAP d'E. coli ¹³². Néanmoins, il faut rappeler qu'une étude précédente sur la localisation de la MetAP bactérienne sur le ribosome ⁹⁴ a suggéré qu'une compétition pouvais exister entre la PDF et la MetAP, due à la promiscuité des sites d'interaction des deux enzymes et de leur encombrement stérique. De plus, bien qu'il n'y ait pas eu de compétition observée concernant l'interaction du TF et de la MetAP sur le ribosome ¹³², l'efficacité de l'excision de la méthionine est plus faible lorsque le TF est déjà présent sur le ribosome, suggérant que sa fixation réduit l'efficacité de la MetAP, et que le TF doit intervenir après l'excision de la méthionine ⁹⁴. Cela est probablement dû au fait que, malgré des sites de fixation distincts, le recouvrement du peptide naissant par le TF le rend inaccessible pour la MetAP (Figure i.16).

Bien que les résultats ne sont pas encore très clairs et parfois même contradictoires au premier abord, il semblerait que le modèle admis actuellement consiste en l'intervention séquentielle de ces facteurs, à savoir la PDF dans un premier temps, suivie de la MetAP puis enfin du Trigger factor (Figure i.17C).

La particule SRP se fixe, tout comme le TF, au niveau des protéines ribosomales uL23 et uL29, suggérant une compétition entre ces deux enzymes (Figure i.16). Cependant, les données de la littérature sont encore contradictoires, certains résultats indiquant une interaction simultanée ^{123,134,135} et d'autres une compétition entre ces deux enzymes ^{77,136,137}. Une autre
Introduction

étude indique que la SRP et le TF peuvent interagir en même temps, mais que cela impose un réarrangement du complexe ribosome: facteur, réarrangement résultant en un avantage compétitif en faveur de la SRP¹³². Il a été montré précédemment que la SRP pouvait interagir avec le ribosome et reconnaître un peptide signal alors même que celui-ci est encore contenu dans le tunnel¹¹⁰. Dans ce cas de figure, la SRP peut intervenir soit avant, soit à la place du TF. Il apparaissait ainsi que ces deux enzymes entraient en compétition, la nature du peptide en cours de synthèse permettant de discriminer l'intervention de l'une ou l'autre de ces deux enzymes pour un repliement co-traductionnel de la chaîne ou son adressage à la membrane. Il a été proposé que le TF empêche la fixation de la SRP dans un contexte ou le peptide est peu hydrophobe²². Le TF et la particule SRP reconnaissent l'hydrophobicité du peptide émergent, sans toutefois que l'on ait pu déterminer des séquences spécifiquement reconnues par la SRP ou le TF. Un étude plus récente a montré que la SRP reconnaît préférentiellement les domaines transmembranaires hydrophobes, et exclut plutôt les séquences signal de protéines de la membrane externe, prises en charge probablement par la voie Sec¹³⁸. Ce travail propose un fonctionnement universel pour la SRP d'E. coli dans l'adressage des protéines à la membrane interne (IMP pour inner membrane protein), à l'exception des courts IMPs (i.e., YbgT and YbhT), suggérés comme étant pris en charge par YidC¹³⁸. Cela n'exclut pas qu'un groupe important soit également substrat des SRP, incluant des protéines cytoplasmiques comme la chaperonne DnaK. Dans ce travail très récent, il a été montré également que l'adressage des protéines médié par la SRP n'est pas influencé par le TF, qui semble ne pas partager le même ensemble de substrats. Ainsi, en opposition avec d'autres données, les auteurs ont trouvé que le TF n'augmente pas la spécificité de SRP (la surexpression de TF n'affecte pas le binding de SRP à ses substrats mais au contraire la délétion de TF augmente l'interaction avec des IMPs et réduit l'interaction avec les protéines cytosoliques). Enfin, les résultats de cette étude ne sont pas en accord avec d'autres données montrant que la SRP peut lier indistinctement tous les ribosomes au début de la traduction, avant que leur N-terminus émerge ¹³⁹. Les données de protéomique et de l'interactome de la SRP ont en effet montré que les SRP semblent se lier au RNC lorsque les chaînes naissantes sont d'environ 50 à 100 résidus de long¹³⁸. Enfin, il semblerait que la SRP et la PDF ou MetAP n'entrent pas en compétition, même si le ribosome traduit une chaîne naissante possédant une séquence signal pour la SRP ⁹⁴, indiquant que la PDF ou la MetAP peuvent probablement agir et permettre ensuite à la SRP de prendre en charge le complexe RNC pour l'adresser à la membrane ¹⁴⁰ (Figure i.17A).



Figure i.16: Intervention spatiale des différents RPBs. A) Structure des protéines PDF, MetAP, TF et SRP en interaction avec le ribosome.¹²⁶ b) Evolution du modèle d'interaction de différents RPBs sur le ribosome depuis les dernières années ^{91,126,132}.

Enfin, il a été montré que le translocon SecYEG peut également interagir avec le ribosome, au niveau de la protéine ribosomale uL23 et uL29 ¹³⁸Cependant, bien qu'aucune donnée ne soit disponible concernant la taille du peptide naissant lors de cette interaction, les auteurs soupçonnent que celle-ci a lieu après l'intervention de la SRP (Figure i.17B). Pour finir, la protéine SecA interagit au niveau des mêmes protéines ribosomales que le TF et la SRP (uL23) et possiblement avec les protéines uL22 et uL24, et intervient relativement tard durant la synthèse du peptide afin de repérer une séquence signal. L'influence de la séquence peptidique sur son recrutement n'a pas été démontrée. Les seules données disponibles indiquent qu'elle ne peut interagir avec le complexe RNC lorsque la chaîne peptidique dépasse 166 acides aminés, mais nous ne savons pas quelle est la taille minimum du peptide naissant pour que SecA



Figure i.17 : Intervention temporelle des différents RPBs. D'après Gloge et al, 2014¹²⁶

A) Intervention spatiale des RPBs dans un contexte de translocation co-traductionnelle. La SRP se fixe très tôt durant la synthèse, puis interviennent la PDF et la MetAP. Suite à l'excision de la méthionine, la SRP reste fixée sur le ribosome jusqu'à la prise en charge du RNC par le complexe SecYEG. **B)** Intervention spatiale des RPBs dans un contexte de translocation post-traductionnelle. La SRP est la première enzyme à intervenir sur le ribosome, mais se retire avant intervention de la PDF et la MetAP. Suite à l'excision de la méthionine, SecA se fixe au ribosome et par l'intervention de SecB le peptide est adressé au complexe SecYEG. **C)** Intervention spatiale des RPBs dans un contexte de repliement du peptide dans le cytosol. La SRP est présente avant l'intervention de la PDF et la MetAP, puis suite à l'excision de la méthionine le TF intervient, pour que le peptide soit ensuite pris en charge par les chaperones DnaK/J et GroEL/ES.

En conclusion, bien que des modèles ont été proposés (Figure i.16 et i.17), les données actuelles concernant l'intervention des facteurs impliqués dans les modifications précoces du N-terminal ne sont pas toutes en adéquation. S'il apparaît que la PDF intervient avant la MetAP, nous ne savons pas réellement ce qu'il en est concernant le TF et la SRP. Ces deux enzymes peuvent entrer en compétition, mais ce n'est pas toujours le cas, et bien que leur intervention soit favorisée par l'émergence de séquences peptidiques particulières à la sortie du tunnel, des signaux envoyés depuis l'intérieur du tunnel, très précocement durant la synthèse, servent de signal pour leur recrutement. Il est fortement probable que la séquence en cours de traduction permette de réguler l'intervention des différentes enzymes, en favorisant la NME et/ou le repliement et/ou l'adressage du peptide durant la traduction.

C-La voie de l'excision de la méthionine N-terminale : la NME

Le premier résidu incorporé lors de la synthèse peptidique est, dans la grande majorité des cas, une méthionine; de rares exceptions ont toutefois été observées, chez les bactéries, les eucaryotes et les protéines virales, où la synthèse protéique peut débuter par un résidu Val, Leu ou Gln¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Chez les bactéries et dans les organites (mitochondries et chloroplastes), la méthionine initiatrice possède un groupement formyl, ajouté sur le groupement amino-terminal de la méthionine chargée sur l'ARNt^{Met} initiateur (Met-ARNt^{Met} \rightarrow Fo-Met-ARNt^{Met}) par la méthionyl-ARNt formyltransferase (FMT); la formylation permet vraisemblablement de stabiliser le complexe ribosomal durant l'initiation de la traduction⁴. Pourtant, la plupart des protéines perdent leur méthionine initiatrice ou la formyl-méthionine grâce à un processus cotraductionnel protéolytique appelé excision de la méthionine N-terminale (NME). Ce mécanisme est universel et irréversible, et a été mis en évidence dans l'ensemble du règne du vivant ¹⁴². Ce processus essentiel a lieu aussi bien chez les procaryotes que dans le cytoplasme et les organites des eucaryotes (mitochondries et chloroplastes). La NME est assurée par deux enzymes: la peptide déformylase (PDF) qui enlève le groupement formyl quand il est présent (dans les bactéries et organelles) et la méthionine aminopeptidase (MetAP) qui clive la méthionine initiatrice uniquement après l'action préalable de la PDF¹²⁹. La déformylation concerne plus de 90% du protéome chez la bactérie et dans les chloroplastes, et ne concerne que quelques protéines dans les mitochondries. En effet, le nombre de protéines codées dans le génome mitochondrial est variable en fonction de l'organisme (par exemple, 13 chez l'homme et 33 dans la plante modèle Arabidopsis thaliana). A cause de leur forte hydrophobicité, la caractérisation chimique de ces protéines et en particulier de leur extrémité N-terminale est restée inaccessible durant longtemps. En mesurant la masse moléculaire de la plupart des 13 protéines mitochondriale de cœur de bœuf, il a été suggéré que probablement seule la protéine CoxII subit le processus NME. Néanmoins, il a été démontré que la PDF mitochondriale humaine est capable de deformyler efficacement, au moins in vitro, 7 peptides formylés, tous dérivés de l'extrémité N-terminale des protéines mitochondriales. Enfin, le séquençage de 8 des 32 protéines mitochondriales d'A. thaliana révèle clairement que toutes les protéines séquencées, avec une seule exception, ont leur N-formyl-Met excisée ^{47,140,145}.

L'expression et la fonction des PDF et MetAP sont très finement régulées durant le développement cellulaire. La NME est impliquée dans la formation de tumeurs en réponse à des stresses biotiques et abiotiques ^{146–148}, suggérant l'importance de cette réaction dans

diverses fonctions métaboliques. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le clivage précoce de la méthionine initiatrice :

- considérant que la méthionine est un acide aminé très peu abondant dans les cellules ¹⁴⁹, que les animaux ne savent pas synthétiser et dont la biosynthèse est coûteuse chez les bactéries, les archées et les plantes, la NME permettrait de maintenir continuellement un réservoir de méthionine libre dans la cellule ¹⁵⁰. Cela permettrait alors d'initier en permanence des synthèses protéiques, sans atteindre de carence en méthionine.

- étant donné que la méthionine libre s'oxyde facilement, il est suggéré que cet acide aminé a la possibilité de protéger les cellules contre le stress oxydatif en jouant un rôle d'anti-oxydant. En effet, les méthionines peuvent réagir avec les ROS (« reactive oxygene species ») et former de la méthionine sulfoxide. La plupart des cellules contiennent une ou plusieurs méthionine sulfoxide réductases, permettant de catalyser la réduction de méthionine sulfoxide en méthionine, réaction dépendante de la thiorédoxine ^{151,152}. Ainsi la méthionine libre aurait un rôle dans la gestion des ROS lors de conditions de stress oxydatif. Les méthionines internes aux protéines, présentes en surface, permettraient elles aussi de protéger la protéine contre l'oxydation, en s'oxydant elle-même, afin de protéger le site actif ¹⁵³.

- le clivage de la méthionine N-terminale permet également de générer une très grande diversité de résidus N-terminaux (« N-end rule ») chez les protéines, qui peuvent être ainsi des signaux potentiels de stabilisation ou de déstabilisation, influant donc sur la demi-vie et l'homéostasie des protéines ^{47,154–156}. En effet, un système de dégradation reconnaît spécifiquement le N-terminal des protéines, les N-recognines pour les eucaryotes qui avec l'ubiquitination du N-terminal envoie le peptide dont le signal est déstabilisant, au protéasome. On retrouve chez les procaryotes la protéine ClpS, qui dirige la protéine dont le N-terminal est déstabilisant vers la protéase ClpAP pour sa dégradation ¹⁵⁷.

La proportion de protéines dont la méthionine N-terminale est excisée varie beaucoup selon les organismes ou les compartiments étudiés. Ainsi, la NME concerne plus de 50% du protéome chez les bactéries, environ 70% du protéome cytoplasmique des eucaryotes, plus de 40% dans les chloroplastes et un peu plus de 10% dans les mitochondries, mais les pourcentages varient selon les organismes étudiés ^{7,145,158,159} ⁴⁷. L'excision de la méthionine N-terminale existe également chez les archées, environ 40% des protéines sont concernées ⁴⁷.

La NME peut être suivie d'autres modifications co-traductionnelles qui affectent l'extrémité N-terminale des protéines en cours de synthèse, comme la N-α-acétylation catalysée Introduction

par des N-acétyltransférases (Nat) ou la myristoylation catalysée par des Nmyristoyltransférases (NMT) dans les organismes eucaryotes ⁴⁷. Il est donc nécessaire que ce mécanisme soit finement régulé afin de ne pas perturber l'ensemble du processus de modification de la chaîne naissante, et ainsi son devenir.

C.1 – Les méthionine aminopeptidases (MetAP)

1) Différentes classes de MetAP, et différentes localisations.

Les MetAP sont des enzymes essentielles identifiées dans tout le règne du vivant, des bactéries aux eucaryotes supérieurs ^{142,147}. Ce sont des métalloprotéases contenant deux cations divalents (comme Fe²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ ou Zn²⁺) indispensables au mécanisme enzymatique, mais dont la nature exacte reste encore débattue.

Les MetAP se distinguent en 2 groupes (1 et 2) et plusieurs sous-groupes (1a, 1b, 1c, 1d et 2a, 2b). Les MetAP ne présentent qu'une faible homologie de séquences entre elles, mais présentent de fortes homologies de structure au niveau du site actif et du site de liaison aux métaux. Les organismes eucarvotes possèdent les deux types de MetAP (1 et 2), contrairement aux bactéries qui ne possèdent que des MetAP1s et les archées qui n'ont que des MetAP2 (Figure i.18). Les MetAP1a se retrouvent dans le cytoplasme des eucaryotes. Elles sont également présentes chez les bactéries, ainsi que les MetAP1a' récemment découvertes chez Streptococci et Lactobacilli 160, possédant une insertion dans le corps de la protéine. Les trois MetAP1b, 1c, 1d, s'observent dans les organites eucaryotes (Figure i .18). D'autres bactéries, comme les actinobactéries, possèdent une autre MetAP, de type 1c, qui possède en N-terminal un domaine de fixation aux domaines SH3 (« SH3 binding motif »), contenant le motif typique P-X-X-P. De plus, les MetAP eucaryotes possèdent une extension N-terminale de 50 à 100 résidus, qui n'est pas présente chez les MetAP procaryotes ¹⁴² (Figure i.18). La différence majeure qui permet de distinguer les deux types de MetAP est l'existence de deux insertions au sein du domaine catalytique des MetAP de type 2, dont la fonction est encore inconnue. Par ailleurs, la MetAP2b possède également un domaine additionnel en N-terminal⁴⁷. Le rôle de ce domaine supplémentaire, qui n'est pas nécessaire pour l'activité catalytique ¹⁶¹, reste encore inconnu mais il serait probablement impliqué dans les interactions avec différents partenaires, dans le but de réguler le processus de NME. Il a par exemple été montré que le domaine Nterminal riche en lysines de la MetAP2b permet de prévenir la phosphorylation du facteur d'élongation eIF2, afin d'éviter l'inhibition de l'initiation de la traduction ^{162,163}. Il a également été proposé, mais non prouvé, que le domaine en doigt de zinc des MetAP1b et le « SH3 binding motif » des MetAP1c seraient impliqués dans l'interaction avec les ribosomes ^{95,97}. Cependant,

des travaux récents ont proposé que c'est une boucle chargée positivement et située au cœur du domaine catalytique de la MetAP1a d'*E. coli* qui serait responsable de la formation du complexe avec le ribosome ⁹⁴. Si l'interaction MetAP:ribosome a bien été mise en évidence ^{94–96}, le mode d'interaction précis reste donc à élucider.



Figure i.18 : Les différentes classes de MetAPs et leur répartition par compartiments/organismes. La localisation des différentes classes de MetAPs est présentée, cependant les cellules ne possèdent que certaines classes de MetAPs, et non pas l'ensemble de celles présentées dans la figure, au sein d'une cellule.

2) Activité peptidase des MetAP et thérapeutique.

La spécificité de substrat des MetAPs les conduit à ne cliver la méthionine initiatrice que si celle-ci est suivie d'un acide aminé dont la chaîne latérale est peu volumineuse : Val, Gly, Cys, Pro Ala, Ser et Thr ^{131,164–166}. Bien qu'*in vitro*, les MetAPs de types 1 et 2 semblent Introduction

partager la même spécificité de substrat, la situation *in vivo* est légèrement différente. Ainsi, l'inactivation de la MetAP1 induit chez la levure un fort retard de croissance, alors que ce phénotype est moins fort lors de l'inactivation de la MetAP2 ^{167,168}. Au contraire, les cellules de mammifères sont plus sensibles à l'inactivation de la MetAP2. Enfin, chez *Arabidopsis thaliana*, la fonction des deux types d'enzyme peut être interchangeable ¹⁴⁷.

Les méthionine aminopeptidases étant des enzymes essentielles à la survie des cellules, les avancées dans la compréhension de leurs mécanismes d'action ont fait d'elles des cibles thérapeutiques prometteuses. En effet, le fait que les cellules procaryotes ne possèdent qu'un seul gène codant une MetAP, celle de type 1, la découverte de composés inhibiteurs à large spectre est envisagée. De plus, l'implication de ces enzymes dans un grand nombre de pathologies, comme le développement tumoral et l'angiogenèse ont attisé l'intérêt des chercheurs ^{169–171}. Cependant, l'inconvénient majeur réside dans le fait que les cellules humaines possèdent également des MetAP de type 1, cytoplasmiques et mitochondriales, qui risquent d'être également inhibées par des anti-MetAP1 et ainsi provoquer des effets secondaires. Il est donc important de connaître avec précision le mécanisme d'action des MetAP à travers l'ensemble des organismes du règne du vivant.

La fumagilline, un composé d'origine naturelle provenant du champignon *Aspergillus fumigatus*, est un inhibiteur naturel des MetAPs de type 2. Des dérivés synthétiques de ce composé ont été découverts et ont pu montrer leur rôle dans l'arrêt de la prolifération cellulaire d'un grand nombre de lignées de cellules cancéreuses ^{172–174}. L'implication de la MetAP dans un grand nombre de processus cellulaires implique qu'elle est actuellement une cible thérapeutique d'importance pour la lutte contre certains types de cancers, ainsi que d'autres pathologies, comme l'obésité ¹⁷⁵.

De plus, jusqu'alors il était admis que les MetAP pouvaient agir sur un peptide seul, indépendamment du ribosome, les tests d'activité étant réalisés *in vitro* avec de courts peptides portant une méthionine. Cependant des données récentes indiquent que ces enzymes ont la capacité d'interagir avec le ribosome, aux niveau des protéines ribosomales bL17 et uL23, grâce à une boucle chargée positivement, proche du site actif et contenant un brin β^{94} (Figure i.12B). Bien que ces résultats concernent la MetAP d'*E. coli*, il est reconnu que cette interaction existe également chez les eucaryotes ^{95,96}. Cependant, les sites de fixation des MetAP eucaryotes avec le ribosome ne sont pas encore identifiés.

C.2 – Les peptides déformylases

Comme décrit plus haut, la méthionine initiatrice des protéines bactériennes et des protéines codées par les génomes mitochondriaux ou chloroplastiques possède un formyle au niveau de son groupement amino-terminal, lequel est généralement excisé. La peptide déformylase (PDF) est la première enzyme qui modifie le N-terminal des protéines. Cette réaction de déformylation est essentielle et irréversible ¹⁴². Les PDF sont des métalloenzymes contenant 140 à 200 résidus en moyenne, qui nécessitent la présence d'un ion métallique au sein de leur site actif. Les PDF ont été identifiées chez les bactéries, les archées, les chloroplastes et les mitochondries, et sont absentes dans le cytoplasme eucaryote et les levures. Il est à noter que les PDF mitochondriales et chloroplastiques sont codées par le génome nucléaire et sont donc exprimées dans le cytoplasme puis adressées vers les organites, grâce à une extension N-terminale de 50 à 100 acides aminés, servant de peptide signal ^{176–178}.

Les peptides déformylases présentent une faible identité de séquence globale, environ 20% à 30% ^{179,180}, mais une forte homologie au niveau de trois motifs conservés (Figure i.19A) participant à la structure du site actif: $G\Phi G\Phi AAxQ$ (motif 1), EGC Φ S (motif 2) et HE Φ DHxxG (motif 3), Φ étant un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé quelconque ^{179,180}. Certaines PDFs présentent des insertions typiques, conduisant à des particularités structurales qui ont permis d'établir une classification en différents sous-types ^{142,181,182}. Les PDFs de type 1B, dont le représentant est l'enzyme codée par *E. coli*, sont généralement trouvées chez les bactéries à Gram négatif ainsi que dans les chloroplastes et mitochondries des plantes (Figure i.19B). Les PDFs de type 2, exprimées par les bactéries à Gram positif (Figure i.19B), présentent deux à trois insertions dans le cœur globulaire de la protéine. Le type 1A est spécifique des organites (Figure i.19B) et contient une longue insertion entre les motifs 1 et 2. Les PDFs de type 3, retrouvées chez les protistes et dont la structure et le rôle sont encore inconnus, contiennent des mutations critiques dans les motifs conservés, les rendant inactives ou peu actives (Figure i.19A).



Figure i.19 : Les différentes classes de peptides déformylases. A) Alignement des séquences protéiques des domaines catalytiques et C-terminaux de plusieurs types de déformylases. Les trois motifs du site actif sont représentés. Deux séquences représentatives de chaque groupe sont présentées. Les PDF1B sont représentées par les séquences des peptides déformylases d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les types 2 sont représentés par *Bacillus stearothermophilus* et *Streptococcus aureus*. Les types 3 sont représentés par *Trypanosoma brucei* et *Leishmania major*. Les 38 et 90 derniers résidus des PDFs de types 3 ne sont pas représentés. Les résidus strictement conservés sont en blanc sur fond rouge et les résidus majoritairement conservés sont rouges. B) Répartition des différentes classes de peptides déformylases dans les organismes et organites.

Les différents types de déformylases possèdent généralement un corps globulaire, et diffèrent fortement au niveau de leur extrémité C-terminale (Figure i.20). La plupart des représentants des types 1B possèdent une région C-terminale structurée en hélice α , alors que les PDF1A ont une région C-terminale relativement désordonnée. Les PDFs de type 2 possèdent quant à elle un brin β . Aucune structure de PDF de type 3 n'a encore été résolue, mais les programmes de prédiction de structures secondaires indiquent que leur extrémité C-terminale pourrait se replier en hélice α .



Figure i.20 : Structure et position du domaine C-terminal des différents types de PDF. ⁴⁷**. A)** Structure des PDF d'*E.coli, B. stearothermophilus* et *H. sapiens*, représentant respectivement les PDF de type 1B, 2 et 1A. Les trois motifs du site actif sont colorés en magenta, l'extrémité C-terminale en vert et les insertions en bleu et rouge. **B)** Comparaison du repliement du domaine C-terminal des PDF de types 1A, 1B et 2 par superposition sur le corps globulaire de la PDF d'*E.coli*.

Les génomes codent généralement une seule PDF mais on rencontre parfois deux gènes, notamment chez les bactéries. Nous ne savons pas quelles sont les conséquences physiologiques pour un organisme qui exprime différentes PDFs, et si celles-ci peuvent se lier simultanément au même ribosome. Chez certaines bactéries seule une des deux PDF serait fonctionnelle car l'une des deux isoformes est inactive ^{183,184}. Pourtant, comme décrit plus haut, les plantes codent et expriment deux PDFs, toutes deux fonctionnelles, au niveau des chloroplastes et mitochondries. Ces deux isoformes présentent quelques différences qui pourraient leur conférer des rôles spécifiques. Il a par exemple été montré que les deux PDFs de plante n'utilisent pas le même ion en guise de co-facteur. Ainsi, la PDF1A possède naturellement un ion zinc alors que la PDF1B contient vraisemblablement un ion fer ¹⁸⁵.

Les trois motifs conservés décrits plus haut (G Φ G Φ AAxQ, EGC Φ S et HE Φ DHxxG) participent à la structure du site actif et sont impliqués aussi bien dans la reconnaissance et la fixation du substrat que dans le mécanisme enzymatique. Il a été montré que contrairement aux MetAP, les PDF n'ont pas de spécificité de substrat et peuvent ainsi virtuellement agir sur tous les peptides qui se présentent à elle ^{93,186–188}. Le site de fixation du ligand est composé de trois

« poches » distinctes, appelées S1', S2' et S3' (Figure i.21). La poche S1', fortement hydrophobe et très conservée, accueille la chaîne latérale de la méthionine formylée ¹³⁰. Il est à noter que les PDF de type 1A ont une poche S1' plus étroite et moins flexible que celle retrouvée chez les PDFs bactériennes¹⁸⁹. Chez la PDF humaine la poche S1' est par ailleurs considérée comme la seule véritable poche permettant de recevoir le substrat formylé ¹⁵⁸. Les poches S2'et S3' sont moins conservées et ne participent que peu à la reconnaissance du substrat. La cystéine du motif 2 et les deux histidines du motif 3, combinées à une molécule d'eau, participent à la fixation du métal ^{90,190,191}. Le métal naturel de la plupart des PDF est le fer Fe²⁺, mais celui-ci étant très sensible à l'oxydation il contribue à rendre l'enzyme particulièrement instable ^{192,193}. Cependant il a été démontré que les déformylases peuvent être actives et plus stables en substituant d'autres ions comme le $Ni^{2+192,194}$ ou le Co^{2+195} . Il est à noter que certaines enzymes, comme la PDF1A d'A. thaliana, possèdent naturellement du zinc, et sont naturellement actives avec ce métal ¹⁸⁵. Ainsi l'obtention de PDFs recombinantes pleinement actives est difficile et nécessite la mise au point de protocole de purification adapté, consistant à tester plusieurs concentrations et types d'ions dans les tampons, ainsi que différents pH. La glutamine du motif 1 et le glutamate du motif 2 sont essentiels dans le mécanisme de catalyse et directement impliqués dans la reconnaissance du groupement formyl ^{130,190,196}. Les autres résidus du motif 1 sont impliqués dans la reconnaissance et la fixation du substrat¹³⁰.



Figure i.21 : Le site actif des peptides déformylases. Représentation schématique du site actif fixant un substrat formylé. Le peptide est représenté en vert, et les liaisons hydrogène en rouge. Le X représente n'importe quelle chaîne, à condition qu'elle ne soit pas chargée négativement. Le métal est représenté en rose. D'après Ragusa *et al*, 1999 ¹³⁰.

Introduction

Les peptides déformylases étant des enzymes essentielles, elles sont, depuis leur découverte, considérées comme des cibles thérapeutiques intéressantes ^{130,196–199}. Un puissant inhibiteur naturel des PDFs, l'actinonine, a été découvert il y a déjà plusieurs années ^{200,201}. Cette molécule ne peut être utilisée en thérapie car i) elle est cytotoxique ^{202–205}, ii) elle est rapidement éliminée par les bactéries via des pompes d'efflux ^{206–208}, iii) des phénomènes de résistance apparaissent rapidement ^{183,184,209–211}, iv) des homologues sensibles à l'actinonine existent chez les eucaryotes, notamment chez l'homme ^{178,203,204,212,213} et enfin v) elle semble affecter à haute concentration d'autres aminopeptidases ^{214,215}. De nombreux autres composés anti-PDFs, dérivés ou non de l'actinonine, ont été décrits et certains d'entre eux sont entrés en phase d'essais cliniques, sans avoir pu à ce jour aboutir à une autorisation de mise sur le marché. Cependant, les PDFs restent une cible attractive pour la conception de nouveaux antibiotiques et les tentatives de mise au point de nouveaux inhibiteurs de PDF continuent ^{216,217}.

D-Problématique

La NME est un processus essentiel chez tous les organismes vivants. Les avancées scientifiques des dernières années ont montré son importance dans la régulation du développement cellulaire et d'un grand nombre de pathologies. Certains composés anti-NME ont été identifiés et sont fréquemment utilisés en laboratoire pour les études sur les mécanismes catalytiques de ces enzymes. Néanmoins, il reste encore beaucoup de zones d'ombres concernant la régulation de la NME et son implication dans diverses cascades de réactions métaboliques.

Comme nous l'avons vu précédemment, les peptides déformylases jouent un rôle crucial dans la maturation des protéines nouvellement synthétisées, et sont présentes dans la quasitotalité des génomes du règne du vivant. De leur action découle toute une cascade de réactions, permettant d'aboutir à des protéines fonctionnelles. Ces enzymes sont étudiées depuis plus de 20 ans et leur mécanisme enzymatique est maintenant fortement documenté. Jusqu'alors, les moyens techniques ne permettaient pas de démontrer que les déformylases pouvaient interagir au niveau du ribosome. La démonstration que la PDF d'*E. coli* interagit avec le ribosome, au niveau du tunnel de sortie du peptide en cours de synthèse, a ouvert la voie à de nouvelles perspectives concernant la régulation de la NME et de la traduction en règle générale. En effet, l'interaction de ces enzymes au niveau d'une plateforme de régulation de la synthèse protéique sur le ribosome suggère une régulation fine du mécanisme d'intervention des déformylases. Le fait que le domaine C-terminal des PDF1B soit présenté comme le déterminant majeur Introduction

permettant l'interaction de l'enzyme au ribosome, il est alors possible que d'autres structures présentes en C-terminal chez les différentes sous-familles permettent des formes de régulation différentes de la traduction. Actuellement aucune information n'est encore disponible quant au mode d'interaction des autres types de PDFs, ne disposant pas de l'hélice α . Le modèle décrit chez *E. coli* n'est donc pas généralisable à l'ensemble des voies NME présentes dans le règne du vivant. Il paraît ainsi évident que des différences concernant la localisation de l'enzyme sur le ribosome, son affinité ainsi que le « moment » de son intervention sont autant de paramètres permettant de réguler la synthèse protéique. De plus, nous ne savons pas réellement qu'elle est l'influence de la chaîne naissante sur l'affinité de la PDF puisque seuls des ribosomes bloqués avec une chaîne naissante de 40 acides aminés ont été utilisés dans les expériences d'interaction PDF:ribosome. Il ressort ainsi des études que l'affinité de la PDF pour le ribosome est très faible, lui permettant de « scanner » rapidement les ribosomes afin d'intervenir sur le peptide lorsqu'il émerge du tunnel de sortie, puis de libérer instantanément son site de fixation pour l'intervention d'autres facteurs, comme la MetAP ou le TF. Il semble donc important de réussir à décrypter ces mécanismes chez les différentes sous-familles de peptide déformylases.

Durant cette thèse, je me suis ainsi intéressé à la fonction du domaine C-terminal en hélice α des PDF1B. Je me suis plus particulièrement intéressé à une PDF1B d'origine virale, *Vp*16PDF codée par le bactériophage *Vp*16T²¹⁸, dont le rôle est encore inconnu. Cette enzyme présente un intérêt tout particulier. Tout d'abord, parce que c'est l'une des séquences de peptide déformylase les plus courtes connues à ce jour, et ne possédant pas a priori d'hélice α C-terminale, comme c'est le cas pour *Ec*PDF. Ainsi, cette enzyme semblait être un bon outil pour l'étude du rôle du domaine C-terminal des PDF, dans leur interaction et leur localisation sur le ribosome. De plus, jusqu'à très récemment, l'existence de ce type d'enzyme était encore insoupçonnée chez les virus. Ainsi j'ai tenté de répondre à un certain nombre de questions:

- Le gène homologue de peptide déformylase découvert chez le phage Vp16T permet-il de coder pour une enzyme à fonction déformylase *in vivo* ? Si oui, quelles sont ses particularités biochimiques, structurales et enzymatiques lui conférant un intérêt évolutif pour le phage ? Pour répondre à ces questions j'ai donc étudié la complémentation fonctionnelle *in vivo* de ce gène chez *E. coli* et réalisé une étude structure-fonction *in vitro*, afin de déterminer ses paramètres cinétiques.
- La peptide déformylase du phage Vp16T, bien que ne possédant pas d'hélice α en Cterminal, peut-elle tout de même interagir avec le ribosome ? Si oui, sa localisation et son affinité sont-elles différentes par rapport à une enzyme présentant une hélice α en

C-terminal ? J'ai donc réalisé des études *in vitro* d'interaction avec les ribosomes, par sédimentation, pontage chimique et analyse en Western-blot et spectrométrie de masse.

Pour la PDF d'*E. coli*, une étude a montré que la taille de la chaîne peptidique en cours de synthèse ne modifie pas son affinité pour le ribosome ⁹⁴. Cependant, une enzyme présentant un domaine C-terminal modifié pourrait montrer une différence de comportement durant la synthèse peptidique.

- Ainsi, la taille de la chaîne peptidique en cours de synthèse a-t-elle une influence sur l'affinité de l'enzyme pour le ribosome ? Pour cela, j'ai réalisé des études d'interaction par sédimentation, en utilisant des ribosomes bloqués en cours de synthèse, possédant différentes longueurs de chaînes peptidiques.
- Enfin, quel pourrait-être l'intérêt pour les virus, et plus particulièrement le phage Vp16T d'exprimer une peptide déformylase ? Pour répondre à cette question, j'ai étudié l'impact *in vivo* que pouvait avoir l'expression de cette enzyme chez la bactérie *E. coli*.

Les réponses à ses différentes problématiques ont pour objectif d'approfondir les connaissances sur la régulation de la NME, et son lien avec les autres modifications affectant la synthèse des protéines. De plus, la peptide déformylase étant une cible thérapeutique faisant l'objet de nombreuses recherches, il semble intéressant de pouvoir décrypter ses mécanismes d'interaction, en vue de rechercher des composés thérapeutiques non plus ciblés uniquement sur l'activité enzymatique, mais également sur la capacité des enzymes à interagir avec le ribosome.

Introduction

Chapitre I : Caractérisation structurale et fonctionnelle d'une peptide déformylase atypique d'origine virale : Vp16PDF



A - Identification d'homologues de PDFs chez des virus et bactériophages A.1 - Identification et caractérisation de séquences codant des PDFs virales

Durant les 15 dernières années, des séquences codant des PDFs ont été trouvées dans la majorité des génomes (eucaryotes et procaryotes) et, en 2003, deux séquences très proches des peptides déformylases ont également été mises en évidence chez les phages Vp16T et Vp16C de la bactérie *Vibrio parahaemolyticus*²¹⁸. Un travail pionner plus récent, portant sur l'analyse des données métagénomiques des océans (GOS) et des données provenant du séquençage de viromes et de microbiomes marins a révélé la présence de nombreux gènes métaboliques auxiliaires (AMGs), incluant des homologues de protéines impliquées dans la traduction, telles que des protéines ribosomales, des facteurs d'initiation, des phosphorylases et des peptides déformylases ²¹⁹. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les séquences de peptide déformylase sont les plus fréquemment retrouvées parmi les AMGs. Les génomes de nombreux autres phages et virus ont depuis été séquencés, et des séquences de peptide déformylases ont ainsi été observées dans l'ensemble de ces organismes ^{219,220}.

Un alignement de séquences entre différentes PDFs retrouvées chez des virus, ainsi que des représentants des divers types de PDFs retrouvées chez les procaryotes et les eucaryotes, nous permet de mettre en évidence certaines caractéristiques des PDFs virales (Figure I-1). Tout d'abord, il faut signaler que la plupart des déformylases ont une faible homologie de séquence globale, ce qui contraste fortement avec la forte homologie retrouvée au niveau des motifs du site actif ¹⁴². Ainsi, les trois motifs conservés participant à la structure du site actif et caractéristiques des PDFs (G Φ G Φ AAxQ, EGC Φ S, et HE Φ DHxxG où Φ est un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé quelconque) sont bien présents dans l'ensemble des séquences des PDFs putatives retrouvées chez les virus, permettant de les classer comme homologues de peptides deformylases (Figure I-1A).

Après avoir identifié les motifs « signature » des PDFs, la comparaison des séquences et des structures permet de classer ces enzymes en trois groupes distincts, 1, 2 et 3. Les PDFs de type 1 se répartissent en deux sous-groupes, les 1A et les 1B. Les déformylases de type 1B, et en particulier la PDF d'*E. coli* (*Ec*PDF), sont considérées comme les peptides déformylases modèles. Une de leur principale caractéristique est une extrémité C-terminale se repliant sous forme d'hélice α ^{191,221,222}. Le sous-type 1A se distingue par la présence d'une longue insertion dans le corps de la protéine et par une extrémité C-terminale non structurée, adoptant une conformation étendue ^{158,189}. Les PDFs de type 2 possèdent quant à elles plusieurs insertions

par rapport au type 1, et une extrémité C-terminale qui a tendance à former des brins β^{181} . Enfin, les PDFs de type 3, dont aucune structure n'a encore été déterminée, présentent des substitutions cruciales au niveau des motifs I et II, les rendant très peu ou totalement inactives ^{47,223}. D'après l'ensemble des données issues de la littérature et de l'alignement de séquences (Figure I-1A), il apparaît que les peptides déformylases virales se rapprochent plus particulièrement du sous-groupe 1B. En effet, celles-ci ne présentent pas d'insertion particulière dans le corps de la protéine, les distinguant des PDFs de type 1A et 2, et les trois motifs du site actif sont conservés.

Il ressort donc clairement que les PDFs virales identifiées et analysées sont apparentées aux PDFs de type 1B, avec toutefois une extrémité C-terminale fortement tronquée. Les PDF virales forment alors un sous-groupe parmi le type 1B (Figure I-1B). Par ailleurs, toutes les PDF virales appartiennent à ce nouveau sous-groupe, et correspondent aux séquences de déformylases putatives actives les plus courtes parmi l'ensemble des séquences répertoriées.

A







A.2 - Deux PDFs présentes dans deux bactériophages de Vibrio parahaemolyticus : Vp16T et Vp16C

Notre laboratoire a focalisé son attention sur les séquences de peptide déformylases provenant des phages Vp16T et Vp16C²¹⁸ car ce sont les séquences de PDFs parmi les plus courtes identifiées à ce jour. L'analyse de la séquence de ces deux enzymes a révélé qu'elles appartiennent à la même classe que la PDF d'E. coli, mais qu'elles présentent des caractéristiques distinctes, notamment au niveau de leur extrémité C-terminale (Figure I-1 et I-2A). Les motifs conservés du site actif ne présentent pas de mutations pouvant suggérer une déficience dans l'activité de la protéine, comme c'est le cas pour les PDFs de type 3²²⁴ ou certaines PDF1A, comme la peptide déformylase humaine¹⁷⁸. De plus, aucune insertion particulière n'est observable par rapport à la séquence d'*Ec*PDF et des PDFs de type 1B en général. Cependant, l'extrémité C-terminale diffère puisque elle ne présente pas l'extension permettant le repliement sous forme d'une hélice α. Une étude précédemment réalisée avec *Ec*PDF indique que la protéine peut être active en dépit de l'absence de son hélice α3 Cterminale, tant que la délétion n'a pas lieu trop près du motif 3 permettant la structure du site actif. Ainsi chez EcPDF, une délétion en amont du 139^{ème} acide aminé (Val) aboutit à une perte totale d'activité alors qu'une délétion à partir du résidu 141 (Lys) n'empêche pas la complémentation *in vivo* du gène endogène ⁹². Le dernier acide aminé des déformylases de phage (Ile) correspond au 143^{ème} acide aminé d'*Ec*PDF (Figure I-1A), ce qui signifie que malgré leur très courte séquence, celle-ci sont potentiellement d'une taille suffisante pour coder une protéine active. Finalement, les séquences des PDFs des phages Vp16T et Vp16C ne montrent pas de mutation dans les motifs conservés du site actif, ne présentent pas d'insertion particulière suggérant un repliement différent d'EcPDF, et l'extrémité C-terminale très courte ne semble pas rédhibitoire pour la conservation de l'activité de la protéine. Il est donc probable que le gène des peptides déformylases identifié chez ces phages code pour deux enzymes actives.

Ainsi, l'identification de séquences nucléotidiques codant potentiellement des protéines ayant toutes les caractéristiques des peptides déformylases nécessite de caractériser ces protéines. Jusqu'à présent, seule la PDF identifiée dans le génome du cyanophage S-SSM7 a été caractérisée 225 , indiquant que cette protéine est en tout point similaire aux PDFs connues jusqu'alors. Au cours de ce travail, nous avons souhaité aller plus loin en caractérisant la PDF présentant la plus courte séquence identifiée à ce jour mais potentiellement active, et avons alors choisi la PDF codée par le bactériophage $Vp16T^{218}$, la plus proche homologue de la PDF

de Vp16C (Figure I-2A). Nous avons procédé à une caractérisation structure-fonction poussée de cette protéine, cherché à caractériser la façon dont elle interagit avec les ribosomes bactériens (voir chapitre II), et enfin tenté de comprendre les conséquences de l'expression du gène lors de l'infection de bactéries par le phage (voir chapitre III).

A											
PDF de Vp16C MKVLTGD PDF de Vp16T MKILKDD ** * *		AYELHAIAADVP APELHAIAAEVP	HGEDVTGLVDAMT HGEDVKDLVLDMT ***** ** **	AAMTAAGGIGLA AAMTAAGGIGLA	SNQLGVLKRVIVVR SNQVGVLKRIIVLR	AP CP *					
PDF de <i>Vp</i> 160 PDF de <i>Vp</i> 161	KFKGCIV TFKGCVI ****	KFKGCIVNPVITRHTSGHVNSREGCLSFPGKTVDKKRHNKITVEGFDAHWQPIKVEAKGL TFKGCVINPIITRHTDGHVYSPEGCLSYPGKTVAKKRRNKVVVEGYDMDWQPITIAAKGL **** ** ***** *** * ***** ***** ****									
PDF de <i>Vp</i> 160 PDF de <i>Vp</i> 167	TAFCIQH TAFCLQH	NEIDHLNGVTI NEIDHLNGVTI									
В											
1 <u>0</u>	2 <u>0</u>	3 <u>0</u>	4 <u>0</u>	5 <u>0</u>	6 <u>0</u>						
MKILKDDAPE	LHAIAAEVPH	GEDVKDLVLD	MTAAMTAAGG	IGLAGNQVGV	LKRIIVLRCP						
7 <u>0</u> TFKGCVINPI	8 <u>0</u> ITRHTDGHVY	9 <u>0</u> SPEGCLSYPG	10 <u>0</u> KTVAKKRRNK	11 <u>0</u> VVVEGYDMDW	12 <u>0</u> QPITIAAKGL						
13 <u>0</u> TAFCLOHEID	HLNGVTI										

Figure I-2 : Séquence de la protéine *Vp***16PDF recombinante étudiée au cours de cette thèse. A)** Alignement de séquence des PDFs de *Vp***16C et** *Vp***16T.** L'alignement a été réalisé avec Clustal Omega. Les étoiles indiquent les résidus identiques. **B**) Séquence protéique de *Vp***16PDF.** Les motifs conservés typiques des PDFs sont indiqués en rouge (motif I : G Φ G Φ AAxQ, motif II : EGC Φ S, motif III : HE Φ DH ou Φ est un acide aminé hydrophobique et x un acide aminé quelconque).

La protéine recombinante Vp16PDF que j'ai étudiée au cours de cette thèse est codée par un gène synthétique (voir Matériels et Méthodes), contenu dans différents plasmides en fonction du type d'approche expérimentale utilisée. Les phages Vp16T et VpP16C ayant un contenu en bases GC élevé ²¹⁸, le gène a été conçu avec optimisation de codons pour une expression optimale en système bactérien. La protéine est composée de 137 acides aminés (Figure I-2B) ; elle a une masse moléculaire théorique de 14783,2 Da ainsi qu'un point isoélectrique (pI) calculé de 7,00.

B - Le gène codant une PDF putative chez le bactériophage *Vp*16T possède une activité déformylase : Complémentation fonctionnelle *in vivo*

Avant de démarrer une étude structure-fonction sur la protéine recombinante V_p16PDF , nous avons cherché à savoir si cette protéine présente une activité déformylase *in vivo*, c'est-àdire si elle est capable de déformyler les protéines dans un contexte cellulaire. Nous avons pour

cela réalisé des expériences de complémentation fonctionnelle selon un protocole mis au point précédemment au laboratoire (voir Matériels et Méthodes). L'expérience est basée sur l'utilisation d'une souche d'E. coli létale conditionnelle (PAL421Tr), dont le gène chromosomique codant la PDF endogène a été inactivé, et possédant un plasmide pMAK portant le gène codant EcPDF sauvage (voir Matériels et Méthodes)²²⁶. Ce plasmide présente une origine de réplication thermosensible ²²⁷. Ainsi, pour des températures inférieures ou égales à 37°C (températures dites permissives), le plasmide peut se répliquer durant les divisions cellulaires : les cellules filles possèdent alors le plasmide et peuvent survivre. Pour des températures supérieures à 37°C (températures dites non permissives), le plasmide n'est plus répliqué durant les divisions : les cellules filles ne possèdent plus le plasmide, ni aucun gène de déformylase, aboutissant à la mort cellulaire. L'utilisation de ce plasmide permet ainsi une expression thermosensible de la PDF d'E. coli sauvage. Lors d'une expérience de complémentation fonctionnelle visant à étudier une activité déformylase in vivo, la souche PAL421Tr est transformée par un plasmide pBAD/Myc-HisA portant le gène codant la protéine d'intérêt. L'expression de la protéine codée dans ce plasmide est inductible par l'arabinose. En réalisant une gamme de concentration d'arabinose dans le milieu de croissance, il est ainsi possible de moduler et contrôler le niveau d'expression de la déformylase testée. Ce protocole permet de disposer d'une souche pour laquelle nous pouvons contrôler aussi bien l'expression du gène EcPDF sauvage que celle du gène de complémentation Vp16PDF, en jouant sur la température d'incubation des bactéries et/ou l'ajout d'arabinose dans le milieu de culture. La croissance des bactéries est alors suivie sur milieu solide, à 30 et 42°C (températures permissive et non permissive respectivement). Ainsi, à 42°C et avec ajout d'arabinose dans le milieu, seule l'expression de la PDF portée par le plasmide pBAD est assurée. Si cette protéine est active, c'est-à-dire qu'elle est capable d'assurer la déformylation des protéines d'E. coli, la souche pousse; si la protéine est inactive, la souche ne pousse pas.

Préalablement à l'expérience de complémentation fonctionnelle, un contrôle est réalisé à 30°C sur milieu solide contenant du glucose et non de l'arabinose, qui réprime l'expression du gène porté par le plasmide pBAD. Ainsi, seul le gène porté par le plasmide pMAK (codant ici *Ec*PDF wt) est exprimé, et les bactéries doivent pousser correctement, quel que soit le gène inséré dans le plasmide pBAD. Des gouttes de dilutions successives réalisées à partir d'une culture bactérienne en milieu liquide sont déposées sur boîte et incubées à 30°C, permettant de s'assurer que les quantités de bactéries testées sont équivalentes pour chacune des constructions testées, contrôles inclus. Le contrôle préalable à 30°C sur milieu glucose ayant été concluant

59

(Figure I-3A), nous avons pu réaliser l'expérience de complémentation fonctionnelle à 42°C en présence d'arabinose. Comme attendu, les bactéries possédant le plasmide pBAD vide ne poussent pas, alors que celles possédant le gène codant *Ec*PDF wt poussent (Figure I-3B). Les bactéries exprimant le gène *Vp*16PDF poussent également à 42°C en présence d'arabinose (Figure I-3B), ce qui indique que l'enzyme est active *in vivo* et est capable d'assurer la déformylation du protéome d'*E. coli*.



Figure I-3 : Mesure de la fonction déformylase du gène du bactériophage Vp16T codant une PDF putative par un test de complémentation fonctionnelle. Des gouttes de dilutions successives de 10 en 10 prélevées sur une culture liquide poussée une nuit à 30°C sont déposées sur milieu gélosé. Les bactéries de la souche PAL421Tr contiennent le plasmide pMAK portant le gène codant *Ec*PDF wt, et sont transformées avec un plasmide pBAD vide ou portant les gènes codant *Ec*PDF ou Vp16PDF wt. A) Les boîtes contenant 0,5% de glucose sont incubées une nuit à 30°C. B) Les boîtes contenant 2% d'arabinose sont incubées une nuit à 42°C.

C - Caractérisation biochimique de la PDF du phage Vp16T

C.1 - Purification à homogénéité de *Vp*16PDF en utilisant les protocoles mis au point pour les formes bactériennes

*Vp*16PDF a initialement été purifiée dans les conditions habituellement utilisées au laboratoire pour d'autres PDFs, ce qui inclut la présence de nickel dans les tampons de lyse et de purification. En effet, les déformylases sont des métalloenzymes utilisant un ion métallique lors du mécanisme enzymatique d'hydrolyse du groupement formyl de la méthionine N-terminale des protéines ¹⁹⁰. A l'état natif, il s'agit généralement de fer Fe^{2+ 192,193}. Or, le Fe²⁺ s'oxyde facilement en Fe³⁺, ce qui conduit à l'oxydation de la Cys catalytique, rendant l'enzyme inactive ^{193,228}. De plus le Fe²⁺ a une faible affinité pour les PDFs et est facilement remplacé spontanément par du zinc, dont l'affinité pour les PDFs est bien supérieure ^{142,229}. Cependant la plupart des PDFs sont très peu actives lorsqu'elles sont complexées à du Zn^{2+ 230}. Il est toutefois possible de substituer le métal catalytique natif par d'autres cations divalents lors de la

purification des PDFs, notamment du Ni²⁺, permettant de purifier des protéines recombinantes dont l'activité enzymatique est préservée ²³⁰.

Vp16PDF étant une PDF de type 1B, nous avons choisi dans un premier temps de suivre le protocole utilisé pour purifier la PDF d'E. coli 230, qui est la protéine de référence pour le type 1B. Après surexpression de la protéine codée par le gène contenu dans le plasmide pBAD dans un milieu contenant de l'arabinose, la lyse des bactéries a ainsi été effectuée en présence de 20mM NiCl₂, concentration qui permet de préserver l'activité d'*Ec*PDF, mais également de précipiter de nombreuses protéines. Une concentration de 5mM NiCl₂ a ensuite été utilisée au cours des différentes étapes de purification, afin de maintenir l'ion Ni²⁺ dans le site actif de l'enzyme. De manière classique, les PDFs purifiées au laboratoire ne possèdent pas d'étiquette d'affinité et sont purifiées sur colonne échangeuse d'ions. Compte tenu du point isoélectrique inhabituel de V_p 16PDF (pI = 7,0 contre 5,5 pour *EcPDF*), nous avons lysé les bactéries dans un tampon à pH5,5, permettant à la protéine d'être chargée positivement et ainsi de s'accrocher à une colonne échangeuse de cations (voir Matériels et Méthodes). L'analyse de la protéine sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes après cette première étape de chromatographie a révélé la présence de nombreux contaminants (Figure I-4 puits 2), ce qui nous a conduits à procéder à une seconde étape de purification sur tamis moléculaire (voir Matériels et Méthodes). Nous avons ainsi pu obtenir une protéine pure à 95% (Figure I-4 puits 3, 4 et 5).



Figure I-4 : Suivi de la purification de *Vp*16PDF par analyse sur gel SDS-PAGE 14% coloré au bleu de Coomassie. Puits 1: Surnageant de lyse. Puits 2: Protéine partiellement purifiée sur SP-Sepharose. Puits 3, 4 et 5: respectivement 1 μ g, 5 μ g et 10 μ g de protéine purifiée sur tamis moléculaire. La flèche indique la position de la protéine *Vp*16PDF.

C.2 - Vp16PDF purifiée dans des conditions classiques est peu active

L'activité enzymatique de la protéine purifiée comme décrit ci-dessus a été mesurée *in vitro* et comparée à l'activité d'autres PDFs bien caractérisées. J'ai utilisé le test d'activité

déformylase couplé à l'activité de la formyl déshydrogénase, réalisé comme décrit dans la littérature ²³¹. Dans ce test, la PDF clive le groupement formyl de son substrat (généralement un tripeptide formylé), lequel est oxydé par la formate déshydrogénase pour réduire une molécule de NAD⁺ en NADH (voir Matériels et Méthodes). La production du NADH est suivie au cours du temps par mesure d'absorbance à 340 nm. Les vitesses initiales de réaction obtenues sont exprimées en fonction de la concentration en peptide formylé utilisé dans le test, et l'équation de Michaëlis-Menten permet alors de déterminer les constantes cinétiques de la PDF testée.

Comme attendu suite aux résultats de complémentation, Vp16PDF présente bien une activité déformylase. En revanche, dans les conditions de purification décrites ci-dessus, l'efficacité catalytique de Vp16PDF s'est révélée particulièrement faible : $k_{cat}/K_m = 915 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, contre $k_{cat}/K_m = 54000 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour *Ec*PDF par exemple (Tableau I-1). Cette faible efficacité catalytique n'est pas due à l'affinité pour le substrat, qui est comparable à celle généralement obtenue pour d'autres PDFs actives, quel que soit le type (K_m de l'ordre de 1 à 6 mM, voir Tableau I-1), mais à la vitesse de réaction. En effet, $k_{cat} = 3 \text{ s}^{-1}$ pour Vp16PDF, là où on obtient une valeur supérieure à 20 s⁻¹ pour les PDFs actives, pouvant même aller jusqu'à 1007 s⁻¹ pour les enzymes les plus actives (Tableau I-1). Ainsi, la vitesse de réaction de Vp16PDF se rapproche plus de celle mesurée avec des PDFs connues pour être constitutivement peu actives, comme les enzymes humaine¹⁷⁸ ou issue de *Plasmodium falciparum*²³², ou de celles dont le métal catalytique est un Zn²⁺ et non un Ni²⁺ (Tableau I-1). L'activité de Vp16PDF est également similaire à celle mesurée pour la peptide déformylase du phage S-SSM7²²⁵.

PDF		$k_{\rm cat}$ (s ⁻¹)	$K_{\rm m}({\rm mM})$	$k_{\rm cat}/K_{\rm m}({\rm M}^{-1}.{\rm s}^{-1})$	Référence
Type 1B					·
Bactéries	Zn-EcPDF	$5,6\pm1.5$	70 ± 20	80 ± 22	Ragusa et al, 1998 ¹⁹⁴
	Ni-EcPDF	210 ± 13	$3{,}9\pm0.6$	54000 ± 8000	Ragusa et al, 1998 ¹⁹⁴
	<i>Tt</i> PDF	ND	>10	ND	Ragusa et al, 1998 ¹⁹⁴
	Ni- <i>Tt</i> PDF	27 ± 3	$2{,}3\pm0.5$	11739 ± 2500	Ragusa et al, 1998 ¹⁹⁴
	SePDF	150-250	1-1,9	88-313	Frank et al, 2013 225
Organites	AtPDF1B	13 ± 2	$8,2\pm0.2$	1600 ± 40	Serero et al, 2001 185
	Ni-AtPDF	75 ± 15	$5{,}6\pm1{.}9$	13300 ± 1500	Serero et al, 2001 185
Phages	Vp16PDF	3	3,2	915	Ce travail
	S-SSM7 PDF	583-800	0,3-1,3	449-2204	Frank et al, 2013 225
Type 1A					
Organites	AtPDF1A	22 ± 2	$0,\!25\pm0.07$	$88,000 \pm 150$	Serero <i>et al</i> , 2003 ¹⁷⁸
	HsPDF	0,030 ± 0,005	$1,6\pm0.4$	18 ± 2	Serero <i>et al</i> , 2003 ¹⁷⁸
Type 2					
Bactéries Gram+	Bst PDF	ND	>10	ND	Ragusa et al, 1998 ¹⁹⁴
	Ni-BstPDF	$1{,}007 \pm 191$	$4,1 \pm 1,2$	245000 ± 10000	Ragusa et al, 1998 ¹⁹⁴
	Ni-SaPDF	50 ± 3	$1,\!20\pm0,\!8$	41993	Fieulaine et al, accepté
Туре 3					
Archées	Ni- <i>Pf</i> PDF	ND	ND	13700 ± 1000	Bracchi-Ricard et al, 2001 ²³²
et Trypanosomes	Zn- <i>Tb</i> PDF	ND	ND	8	Bouzaidi-Tiali, 2007 224

Tableau I-1: Constantes cinétiques de Vp16PDF et autres PDFs. Les vitesses initiales de réaction ont été mesurées en utilisant le test couplé à la FDH et du Fo-Met-Ala-Ser (fMAS) comme substrat ¹⁹⁴, et les paramètres cinétiques ont été calculés en utilisant le logiciel Sigma Plot. Pour la PDF de *Synechococcus elongatus* et du phage associé S-SSM7 les tests d'activité ont été réalisés avec les substrats fMTSI, fMLIS, f.MTTA, fMAKK, fMARI, fMSRV . Pour la PDF de *Plasmodium falciparum (Pf*PDF), le test d'activité a été réalisé selon le protocole de Wei *et al*, 1997 ²³³avec le substrat formyl-Met-Leu-p-nitroanilide. *Ec pour Escherichia coli, Tt pour Thermus thermophilus, Se* pour *Synechococcus elongatus*, *At* pour *Arabidopsis thaliana, Vp*16 pour phage *Vp*16T, S-SSM7 pour phage de *Synechococcus elongatus, Hs* pour *Homo sapiens, Bst* pour *Bacillus stearothermophilus, Sa (Streptococcus agalactiae, Pf* pour *Plasmodium falciparum, Tb* pour *Trypanosoma brucei*. Ni et Zn indiquent que la protéine purifiée est une forme avec nickel ou zinc respectivement, lorsque le métal a été identifié.

La mesure d'une faible activité de Vp16PDF suggère une mauvaise substitution du métal catalytique natif par le nickel au cours de la purification de la protéine, impliquant que le protocole suivi n'est pas optimal. Cependant, d'autres hypothèses pourraient expliquer la faible activité catalytique de cette protéine. En effet, il est possible que Vp16PDF soit naturellement peu active, et ce pour plusieurs raisons. Il est par exemple connu que les PDFs mitochondriales des mammifères présentent deux mutations critiques dans les motifs consensus qui caractérisent la famille des PDFs ¹⁷⁸, expliquant la faible activité mesurée pour l'enzyme humaine ^{158,178,204,213,234}. Or, comme décrit plus haut (Figure I-1A), l'analyse de la séquence de Vp16PDF ne permet pas d'identifier une quelconque mutation qui pourrait altérer le mécanisme enzymatique, conduisant à une faible vitesse de réaction. Une autre explication tiendrait à l'extrémité C-terminale atypique de Vp16PDF, qui est la plus courte découverte à ce jour (voir paragraphe A.2). Enfin, il n'est pas exclu que Vp16PDF adopte un repliement atypique et/ou qu'elle ait une spécificité de substrat inhabituelle.

Ainsi, bien que cette première tentative de purification de la protéine Vp16PDF ne nous ait pas permis d'obtenir une protéine très active, la haute pureté de l'échantillon (Figure I-4) ainsi que le bon rendement de purification (8 mg de protéine pure pour 2 litres de culture bactérienne) nous ont permis de caractériser la protéine par différentes approches afin de mettre en évidence ses particularités éventuelles (voir sections C.4 à C.6). En parallèle, j'ai également optimisé les conditions de purification de Vp16PDF, dans le but de disposer d'une protéine dont l'activité enzymatique est préservée (voir section D).

C.3- Production d'anticorps dirigés contre Vp16PDF

L'obtention de la protéine Vp16PDF pure nous a permis de stimuler la production d'anticorps dirigés contre la protéine par immunisation de lapins (voir Matériels et Méthodes). La caractérisation de ces anticorps sur des extraits bruts bactériens nous a permis de démontrer leur spécificité : ils reconnaissent exclusivement la PDF de phage et pas celle d'*E. coli* (Figure I-5). Un signal unique et intense est observé dans les extraits bruts surexprimant Vp16PDF, correspondant à une protéine ayant une taille d'environ 14 kDa, comparable à celle attendue d'après sa séquence codante (Figure I-2). Ces anticorps spécifiques et de haute affinité sont devenus un outil très puissant pour la suite de mes études. Ils sont utilisé à une dilution de 1/5000 durant les expériences.



Figure I-5 : Test des anticorps-anti-*Vp***16PDF.** Pour chaque gel, 10ng, 50ng et 100ng de protéine purifiée ont été déposés, et comparés à un aliquote d'extrait brut (EB). Chaque membrane a été incubée avec une dilution d'anticorps primaire variable (1/1000, 1/2000, 1/5000 et 1/10000), suivie d'une incubation en présence d'anticorps secondaire porteur d'un fluorophore. La fluorescence a ensuite été détectée, révélant une bande spécifique entre 10 et 15 kDa, qui correspond à *Vp*16PDF.

C.4 - L'extrémité C-terminale très courte de *Vp*16PDF stabilise fortement la protéine

Grâce à différentes collaborations, nous avons pu caractériser la stabilité thermique de *Vp*16PDF en utilisant deux techniques différentes.

En collaboration avec la plateforme « Mesures d'interaction des macromolécules » (PIM) de l'I2BC, la stabilité thermique de Vp16PDF a été mesurée par la technique DSC (« differential scanning calorimetry »), qui mesure la variation de capacité calorifique associée à la dénaturation de la molécule lorsque celle-ci est chauffée à vitesse constante. Le thermogramme obtenu permet alors de déterminer une température de transition notée T_m .

A titre de comparaison, la valeur T_m a été mesurée pour Vp16PDF ainsi que pour d'autres PDFs (la valeur T_m associée à la PDF1B *d'A. thaliana* (*At*PDF1B) est tirée de précédentes expériences réalisées dans les mêmes conditions ²³⁵). Il est à noter que les protéines ont systématiquement précipité à haute température, donnant des thermogrammes qui ne peuvent pas être pleinement analysés (c'est-à-dire que les variations d'enthalpie et d'entropie ne sont pas quantifiables), mais permettant tout de même une bonne estimation du T_m associé à chaque protéine testée.

Les PDF 1Bs d'*E. coli* et *A. thaliana* ont une stabilité thermique semblable, avec un T_m de 60°C et 61°C respectivement (Figure I-6 et ²³⁵). Le T_m de la PDF1B de *Thermus thermophilus (Tt*PDF) est bien plus élevé (73°C, Figure I-6), vraisemblablement car elle est produite par une bactérie hyperthermophile. De manière intéressante, le T_m mesuré de *Vp*16PDF

est également élevé, avec une valeur de 68°C (Figure I-6). Cette valeur est très proche de celle obtenue avec une version de la PDF d'*E. coli* dont l'extrémité C-terminale a été tronquée (variant 1-148 ; $T_m = 72$ °C, Figure I-6). Ce résultat signifie que l'absence d'hélice alpha en C-terminal stabilise significativement les PDFs de type 1B, effet qui avait déjà été observé lors d'une précédente étude avec *Ec*PDF ⁹².



Figure I-6: Stabilité thermique de différentes PDFs de type 1B dont Vp16PDF. La stabilité thermique de différentes PDFs de type 1B a été mesurée par la technique DSC. Les températures apparentes de transition T_m ont été déduites des thermogrammes après correction de la ligne de base. En rouge: Vp16PDF, bleu: EcPDF, vert: EcPDF variant 1-148, noir: TtPDF.

La stabilité thermique de Vp16PDF a également été analysée par la technique de thermofluor ou FTSA (« Fluorescence-based Thermal Shift Assay »), en collaboration avec Eric Jacquet à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette). Cette technique est basée sur l'analyse des variations de l'intensité de fluorescence de colorants fluorescents, tels que le Sypro Orange, en présence de la protéine et en fonction de la température ; le fluorophore fluoresce lorsqu'il est en contact avec les régions hydrophobes des protéines, régions qui sont progressivement exposées à mesure que la protéine est dénaturée par la température croissante. Les courbes de fluorescence obtenues sont dérivées afin d'avoir accès à la température de demie-dénaturation T_m .

La dénaturation thermique de *Vp*16PDF a été mesurée pour différentes concentrations de protéine (de 13 à 49 μ M) ; la protéine étant stockée dans un tampon 50 mM MES-KOH pH5,5, 5 mM NiCl₂ et diluée dans un tampon 50 mM MES-KOH pH5,5 sans NiCl₂, une quantité résiduelle de NiCl₂ était présente dans les échantillons (de 208 à 750 μ M). Cette première série

de tests a permis de déterminer un $T_{\rm m}$ égal à 67 ± 1°C (Figure I-7A courbes bleues), égal à celui déterminé par DSC (Figure I-6). L'ajout de 7,5 mM EDTA, a fortement modifié le comportement de Vp16PDF. En effet, nous avons pu observer i) une augmentation de la fluorescence du fluorophore associée à la dénaturation de Vp16PDF, ii) une diminution significative du $T_{\rm m}$ (61 ± 1°C), et iii) l'apparition d'une phase précoce de dénaturation entre 30 et 45°C (Figure I-7A courbes vertes). Ce résultat suggérait une influence du NiCl₂ sur la conformation et la stabilité de la protéine, son absence contribuant à une stabilité moindre. Nous avons alors purifié Vp16PDF en absence totale de nickel afin de procéder à de nouveaux tests. La protéine ainsi purifiée en absence de NiCl₂ s'est avérée aussi stable, que ce soit en absence ou en présence de NiCl₂ supplémentaire dans l'échantillon ($T_m = 70 \pm 1^{\circ}$ C et 68 $\pm 1^{\circ}$ C, Figure I-7B courbes noire et verte respectivement). En revanche, l'ajout de 2 mM EDTA a comme précédemment modifié le comportement de la protéine (diminution du $T_{\rm m}$ (62 ± 1°C) et apparition d'une phase précoce de dénaturation, voir Figure I-7B courbe rouge). La protéine testée ayant été purifiée en absence de nickel, ce dernier résultat suggère un lien entre la stabilité de Vp16PDF et la présence d'un ou plusieurs métaux lié(s) intrinsèquement à la protéine et non pas ajoutés au cours de la purification ou de l'expérience. De plus, Vp16PDF ayant un pI particulièrement élevé en comparaison d'autres PDFs, nous avons souhaité tester l'influence du pH sur sa stabilité (les expériences ont été réalisées en utilisant la protéine purifiée en absence de NiCl₂). Nous avons ainsi pu constater que la protéine était déstabilisée lorsqu'elle était diluée dans un tampon à pH 4,0 au lieu de 5,5 ($T_{\rm m} = 52 \pm 1^{\circ}$ C, avec une forte diminution de la fluorescence, Figure I-7C courbes bleues). De plus, les résultats précédents ont été confirmés, à savoir une stabilité inchangée par l'ajout de 2 mM NiCl₂ ($T_m = 51 \pm 1^{\circ}$ C), mais diminuée en présence d'EDTA ($T_{\rm m} = 45 \pm 1^{\circ}$ C) (Figure I-7D courbes vertes et rouges respectivement).

Bien que ces résultats soient encore préliminaires et mériteraient d'être approfondis, il en ressort un lien évident entre la stabilité de la protéine et le tampon dans lequel elle est purifiée et/ou diluée, tant au niveau de l'influence du pH que du métal lié au niveau du site actif et/ou à d'autres sites non identifiés jusqu'ici.



Figure I-7 : Influence des métaux et du pH sur la stabilité thermique de *Vp*16PDF. La stabilité thermique de *Vp*16PDF a été mesurée par la technique de thermofluor. L'effet du NiCl₂, de l'EDTA et du pH a été testé. Les températures apparentes de transition T_m ont été déduites à partir de la dérivation des courbes de fluorescence obtenues en fonction de la température. Pour chaque condition l'expérience est répétée deux fois. A) *Vp*16PDF stockée dans un tampon 50 mM MES-KOH pH 5,5, 5 mM NiCl₂ a été diluée dans un tampon 50 mM MES-KOH pH 5,5, 5 mM NiCl₂ a été diluée dans un tampon 50 mM MES-KOH pH 5,5, 5 mM. NiCl₂ de 750 µM, et contenant ou non de l'EDTA à 7,5 mM. **B**) *Vp*16PDF purifiée en absence totale de NiCl₂ et stockée dans un tampon 50mM MES-KOH pH 5,5 a été diluée dans un tampon 50mM MES-KOH pH 5,5 ou d'EDTA. A titre de contrôle, la protéine a été diluée dans le tampon 50 mM MES-KOH pH 5,5 ou 4,0. **D**) Même expérience que C mais avec ajout de 2 mM de NiCl₂ ou d'EDTA.

C.5- La structure cristalline de *Vp*16PDF révèle un repliement PDF classique, assorti de quelques particularités.

Dans le but de déterminer si l'extrémité C-terminale très courte et/ou un repliement atypique de Vp16PDF pourraient expliquer la faible activité mesurée, nous avons résolu sa structure cristalline. La protéine purifiée en présence de faibles concentrations en nickel était parfaitement adaptée pour la technique de cristallographie des rayons X, car purifiée à homogénéité en relativement grande quantité, et stable (voir résultats précédents).

De manière inattendue, nous avons obtenu plusieurs dizaines de formes cristallines en utilisant des kits de cristallisations disponibles à la plateforme de cristallographie de l'I2BC (voir Matériels & Méthodes). La diffraction des cristaux a pu être testée directement à partir des plaques de cristallisation (voir Matériels & Méthodes), et une douzaine d'entre eux a diffracté à une résolution comprise entre 2 et 4,5 Å. L'optimisation manuelle de ces cristaux a été réalisée avec succès pour deux conditions de cristallisation. Les cristaux ainsi obtenus ont permis de résoudre la structure cristalline de *Vp*16PDF à 1,7 Å de résolution, par remplacement moléculaire en utilisant la structure de la PDF de *Pseudomonas aeruginosa* (code PDB 1LRY, ¹⁸¹) privée de son extrémité C-terminale, qui présente une identité de séquence de 34%. Les deux formes cristallines obtenues sont parfaitement superposables (r.m.s.d. < 0,5 Å pour 100% des C α), et seule l'une d'elle a ensuite été considérée pour l'analyse structurale.

*Vp*16PDF adopte un repliement classique, comparable à celui des autres PDFs de type 1B connues, notamment celles de *Vibrio cholerae* (code PDB 3FWX) et *E. coli* (code PDB 2AI8¹⁸²) qui sont les plus proches homologues structuraux, ainsi qu'avec la PDF du phage S-SSM7 (code PDB 3UWA²²⁵). Elle possède sept brins β (β 1 à β 7), deux hélices α (α 1 et α 2) ainsi que deux hélices 3₁₀ (η 1 et η 2) (Figure I-8). Bien que la structure de *Vp*16PDF soit classique, plusieurs différences sont notables.



Figure I-8: Comparaison structurale de plusieurs PDFs de type 1B. La structure de *Vp*16PDF (à gauche) est comparée aux structures des PDFs d'*E. coli* (milieu) et du phage S-SSM7 (droite). Les hélices α et les brins β sont représentés en violet et vert respectivement. Les trois motifs caractéristiques des PDFs, constituant le site actif, sont représentés en jaune. L'hélice 3₁₀ (η 3) présente chez *E. coli* et S-SSM7 est entourée en rouge.

La différence la plus importante concerne l'extrémité C-terminale de *Vp*16PDF. La protéine s'arrête quelques résidus après l'hélice $\alpha 2$; elle ne comporte donc ni l'hélice α C-terminale ni l'hélice 3_{10} $\eta 3$ typiques des PDFs de type 1B, que l'on retrouve par exemple chez *Ec*PDF (Figure I-8). Or cette hélice 3_{10} est présente dans quasiment toutes les PDFs de structure connue (voir Figure S1 dans ²³⁵), et constitue une région critique pour l'activité de la protéine. En effet, comme décrit plus haut (section C.5), une délétion de la protéine *Ec*PDF au niveau des résidus 139 à 143, situés avant ou dans cette hélice $\eta 3$, conduit à une inactivation partielle ou totale de la protéine ⁹².

L'extrémité C-terminale de Vp16PDF n'est pas flottante, elle est collée contre le cœur globulaire de la protéine, à proximité du site actif. La chaîne latérale de la Thr136, l'avantdernier résidu, fait une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la Tyr88, tandis que la chaîne latérale de Ile137 est enfouie à l'intérieur d'une poche hydrophobe constituée de résidus provenant des brins β 4 et β 5 (Figure I-9). Enfin, un pont salin maintient le groupement carboxyle terminal du dernier résidu (Ile137) avec l'extrémité de la chaîne latérale de la Lys91 (Figure I-9). Ce réseau d'interactions a été comparé à celui existant dans les PDFs d'E. coli et du cyanophage S-SSM7. La seule interaction conservée entre ces trois PDFs est le contact hydrophobe mentionné ci-dessus. Cette interaction implique généralement un résidu Phe ou Tyr (que l'on retrouve dans plus de 93% de PDFs, y compris celle du cyanophage S-SSM7), et il est relativement rare de trouver une Ile dans cette position (moins de 2% des cas). La PDF de Thermotoga maritima représente l'une des exceptions puisqu'elle possède une Ile à cette position, et non une Phe ou une Tyr. Cependant, la présence de ce résidu ne modifie pas le réseau d'interactions dans cette zone (Figure I-9). Il est également intéressant de souligner qu'une Ile est systématiquement retrouvée à la place des résidus conservés Phe ou Tyr dans la plupart des PDFs de classe 3 qui sont inactives (Figure I-1)²¹⁹.

Malgré ces particularités, l'environnement de l'extrémité C-terminale de la protéine semble finalement assez similaire à celui observé dans d'autres PDFs, et ne permet donc pas d'expliquer la faible efficacité catalytique observée *in vitro* avec la protéine purifiée dans les conditions décrites précédemment.



Figure I-9 : Zoom sur les extremités C-terminales de plusieurs PDFs de type 1B. Les structures de la PDF du phage *Vp*16T, du phage S-SSM7, d'*E. coli* et *T. maritima* sont représentées. **A**) Repliement de la structure C-terminale pour les différentes PDFs. **B**) Interactions entre la région C-terminale et l'extrémité de la protéine pour les différentes PDFs.

Il a été montré que le domaine C-terminal des déformylases ne joue pas un rôle majeur dans l'activité enzymatique ⁹², mais qu'il est nécessaire pour l'interaction avec le ribosome ⁹¹. A ce jour, l'interaction PDF:ribosome a été montrée uniquement pour la protéine d'*E. coli*, indiquant que cette interaction est médiée par l'hélice α 3 C-terminale d'*Ec*PDF, qui entre en contact avec la protéine ribosomale uL22 via des contacts hydrophobes et électrostatiques (Figure i.12 de l'introduction) ⁹¹. Or, comme décrit plus haut, nous savons que les PDFs de type 1A et 2 n'ont pas d'hélice α en C-terminal, et que certaines PDFs de type 1B ont une extrémité C-terminale très courte, sans équivalent de l'hélice α 3 d'*Ec*PDF. Ainsi, en supposant que toutes les PDFs sont capables d'interagir avec le ribosome, ce qui reste à démontrer, d'autres types d'interactions sont à envisager. Quelques particularités structurales ont pu être relevées sur la structure de *Vp*16PDF, qui pourraient entrer en jeu lors de l'interaction avec le ribosome le cas échéant.

En raison de son point isoélectrique moins acide que celui calculé pour les autres PDFs (pI =7,00 contre 4,0-5,5 habituellement), la répartition des charges en surface de Vp16PDF est légèrement modifiée. En effet il apparaît clairement que la surface de Vp16PDF est globalement moins chargée que d'ordinaire, en particulier autour du site de fixation du ligand (Figure I-10A). Cela est particulièrement valable en comparaison d'*Ec*PDF (Figure I-10A Panneau du haut). Etonnement, cette altération de répartitions de charges ne s'applique pas pour la PDF très courte du cyanophage S-SSM7, dont le pI calculé est de 5,45 (Figure I-10A). De plus, bien
qu'aucun patch acide ou basique ne soit caractéristique de tel ou tel type de PDF, un faible patch basique est observable sur la protéine Vp16PDF (Figure I-10A). Par ailleurs, la répartition des résidus hydrophobes semble être altérée chez Vp16PDF, avec une hélice $\alpha 1$ qui présente une surface accessible au solvant particulièrement hydrophobe (Figure I-10B). Enfin, avec un tour en moins à son extrémité N-terminale, l'hélice $\alpha 1$ de Vp16PDF est significativement plus courte que celle des autres PDFs, quel que soit le type.

Il n'est pas exclu que l'ensemble de ces particularités puisse moduler l'interaction avec le ribosome, et seules des études complémentaires permettront de valider ces hypothèses.

Enfin, les cartes de densité électronique ont révélé la présence d'un ion métallique dans le site actif de la protéine Vp16PDF, coordonné de façon classique à la cysteine du motif 2, aux deux histidines du motif 3 et à une molécule d'eau. Cet ion s'est avéré être un Zn²⁺ et non un Ni²⁺. La présence d'un ion zinc dans le site actif des PDFs est courante, car l'affinité de ce métal pour les PDFs est très élevée ; cet ion provient généralement de la solution de cristallisation. Or Vp16PDF a cristallisé dans des conditions de cristallisation sans zinc (voir Matériels et Méthodes), ce qui suggère une mauvaise substitution du métal lors de la purification de la protéine, ayant conduit à l'incorporation de Zn²⁺ et non de Ni²⁺. Cette hypothèse est renforcée par une expérience de spectrométrie de masse native sur la protéine purifiée (réalisée en collaboration avec Sarah Cianferani au LSMBO de Strasbourg), qui indique une masse moléculaire théorique de Vp16PDF (MM = 14783,2 Da) complexée à un atome de Zn²⁺ (MM théorique = 65,38 Da).

Ces résultats suggèrent fortement que nous ne sommes pas parvenus à substituer le métal endogène de l'enzyme (probablement du Fe²⁺, comme beaucoup d'autres PDFs) par du nickel au cours de la purification de l'enzyme. En présence de faibles concentrations en nickel, nous aurions donc produit une forme Zn-Vp16PDF, ce qui expliquerait la faible activité enzymatique mesurée *in vitro*.



Figure I-10: Répartition des résidus chargés ou hydrophobes à la surface de différents types de PDFs. Les structures de PDFs de type 1B (issues de Vp16T, *E. coli* et S-SSM7), de type 2 (issue de *B. stearothermophilus*) et de type 1A (issue d'*A. thaliana*) ont été comparées. A) La surface des protéines est représentée et colorée selon la répartition des résidus basiques (arginine, lysine et histidine) et acides (aspartate et glutamate), respectivement en bleu et rouge. Un patch chargé positivement (entouré en rouge) est présent sur Vp16PDF. B) Les résidus hydrophobes sont représentés en orange.

D - Détermination des conditions nécessaires pour la préservation de l'activité de *Vp*16PDF *in vitro*.

L'ensemble des résultats obtenus et décrits dans la première partie de ce chapitre montrent que Vp16PDF est une protéine très semblable aux autres PDFs décrites, avec quelques particularités de séquence et de structure. Les résultats indiquent également que l'incorporation du nickel dans le site actif n'a vraisemblablement pas été effective, conduisant à une mauvaise activité enzymatique, et donc à l'impossibilité de déterminer totalement les propriétés enzymatiques de cette PDF de bactériophage, notamment sa spécificité de substrat. Dans cette deuxième partie, j'ai donc naturellement cherché à optimiser la purification de Vp16PDF, dans le but de disposer d'une protéine pleinement active. En plus de jouer sur la concentration en nickel au moment de la lyse des bactéries qui surexpriment la protéine, j'ai également testé l'influence du pH dans les tampons de lyse. Par ailleurs, voulant augmenter les rendements de purification, j'ai produit la protéine à partir du gène sous-cloné dans un plasmide pET16b, inductible à l'IPTG (voir Matériels et Méthodes).

D.1 - L'activité de *Vp*16PDF est significativement plus élevée lorsque l'on augmente la concentration en nickel dans le tampon de lyse

Il est connu que la concentration en nickel du tampon dans lequel est effectuée la lyse des bactéries surexprimant une PDF recombinante représente un point critique pour l'incorporation de ce métal ¹⁹⁴. C'est pourquoi j'ai fait varier la concentration en nickel dans le tampon de lyse et mesuré la vitesse initiale de réaction de *Vp*16PDF sur les extraits bruts solubles ainsi obtenus. Le test d'activité a été réalisé dans les conditions classiques, à 37°C en utilisant le substrat de référence fMAS à 4 mM.

J'ai ainsi constaté qu'entre 0 mM et 20 mM d'ion nickel dans le tampon de lyse, l'activité mesurée était pratiquement nulle et qu'il fallait utiliser des concentrations supérieures à 20 mM pour observer une augmentation significative de l'activité (Figure I-11A, courbe bleue). Ces concentrations élevées étant inhabituelles, j'ai reproduit l'expérience en utilisant une plus forte concentration de substrat (6 mM au lieu de 4 mM) afin de vérifier que la concentration de NADH formé était bien en lien avec l'hydrolyse du substrat, et donc l'activité déformylase. Les vitesses initiales de réaction mesurées étaient significativement supérieures (Figure I-11A, courbe rouge), indiquant que l'activité mesurée était bien due à Vp16PDF et non à un artefact. De plus j'ai voulu savoir si l'activité de Vp16PDF mesurée in vitro pouvait être modulée par la température. J'ai donc reproduit l'expérience précédente en testant quatre températures (25°C, 30°C, 37°C et 42°C), à une concentration fixe de fMAS (4 mM). Les vitesses initiales de réaction mesurées ont été significativement plus élevées lorsque le test d'activité était réalisé à 37 ou 42°C comparé à 30 ou 25°C, avec une différence d'autant plus marquée que la concentration en nickel dans le tampon de lyse était plus élevée ²²⁹ (Figure I-11B). Ce comportement est courant pour une PDF, et les tests d'activité suivants ont donc été réalisés classiquement à 37°C.



Figure I-11 : Influence de la concentration en nickel dans le tampon de lyse sur l'activité de *Vp*16PDF dans des extraits bruts solubles. Des aliquotes de culture bactérienne ayant surexprimé *Vp*16PDF ont été resuspendus dans du tampon de lyse à pH5,5 en présence de différentes concentrations de NiCl₂ (de 3 à 30 mM). La vitesse initiale de réaction (v_0) a ensuite été mesurée sur les extraits bruts solubles ainsi obtenus, et reportée sur le graphique en fonction de la concentration en nickel présente dans le tampon de lyse. A) Le test d'activité a été réalisé à 37°C, et deux concentrations en substrat fMAS ont été testées : 4 mM et 6 mM, représentés en bleu et rouge respectivement. B) Le test d'activité a été réalisé à différentes températures : 25°C, 30°C, 37°C et 42°C (représentés respectivement en jaune, vert, rouge et bleu), en utilisant 4 mM de fMAS.

Cette première étape de l'optimisation du protocole de purification a montré une dépendance au nickel de Vp16PDF inhabituelle, indiquant que la concentration en nickel utilisée au moment de la lyse des bactéries lors des premières purifications de la protéine était loin d'être optimale, conduisant à une activité enzymatique très faible. La première gamme de concentration testée m'a permis de montrer que le tampon de lyse doit contenir un minimum de 30 mM de NiCl₂ pour pouvoir préserver efficacement l'activité enzymatique de Vp16PDF. Durant les tests suivants, j'ai encore augmenté cette concentration afin de déterminer la concentration optimale à utiliser lors de la lyse des bactéries. De plus, je me suis intéressé au point isoélectrique particulier de la protéine.

D.2 - L'activité de *Vp*16PDF est fortement augmentée lorsque le tampon de lyse est de bas pH et qu'il contient de très fortes concentrations en nickel

Comme décrit plus haut, Vp16PDF possède un point isoélectrique théorique inhabituel égal à 7,00, conduisant à une répartition atypique des charges en surface de la protéine (voir section C.5 Figure I-10). De plus, nous avons montré que des variations de pH influencent la stabilité de la protéine (voir section C.4 Figure I-7). Au cours d'une deuxième série de tests, j'ai donc cherché à évaluer l'influence du pH sur l'activité de Vp16PDF, en modifiant le pH du

tampon de lyse des bactéries ayant surexprimé la protéine. L'ensemble des tests d'activité a été réalisé à partir des extraits bruts solubles ainsi obtenus, à 37°C et en utilisant 4 mM de fMAS.

Outre le tampon de lyse à pH 5,5 (celui utilisé lors de la première série de tests, voir section précédente), j'ai testé deux pH, l'un inférieur (pH 4,0) et l'autre proche du pI théorique (pH 7,5) permettant à la protéine d'être globalement chargée positivement dans un cas et globalement neutre dans l'autre. J'ai commencé par tester l'activité sur des bactéries lysées dans un tampon contenant 0, 10 ou 50 mM de NiCl₂. Une augmentation de la vitesse initiale de réaction a pu être observée à 50 mM de nickel pour des bactéries lysées dans un tampon à pH 5,5 comparé à 7,5 (Figure I-12A, courbes rouge et noire). Une activation bien plus importante a pu être mesurée pour des bactéries lysées dans un tampon à pH 4,0 (Figure I-12A, courbe leue).

Une concentration de 50 mM NiCl₂ étant relativement élevée, j'ai voulu vérifier la solubilité des protéines dans les échantillons testés. J'ai donc analysé sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes les fractions solubles et insolubles des extraits bruts lysés dans les différents tampons. Comme observé précédemment, on retrouve Vp16PDF majoritairement dans la fraction insoluble, quel que soit le pH (Figure I-12B, puits « 0 »). De plus, au contraire des contaminants qui précipitent, Vp16PDF reste stable en présence de 10 ou 50 mM de nickel, et reste partiellement soluble à pH 4,0 (Figure I-12B, puits « 10 » et « 50 »). Ces résultats étaient particulièrement intéressants car ils montraient que lyser les bactéries dans un tampon à pH 4.0 et fortement concentré en nickel permettait non seulement d'activer Vp16PDF (Figure I-12A) mais également de la purifier partiellement en précipitant de nombreux contaminants. J'ai donc par la suite testé une gamme plus large de concentrations en nickel (jusqu'à 100 mM) afin de déterminer la concentration la plus élevée que je pouvais utiliser dans le tampon de lyse pour obtenir l'activité maximale de l'enzyme, mais également éliminer le maximum de contaminants. Ainsi, pour chaque aliquote de culture bactérienne lysé dans un tampon à pH 4,0 et contenant des concentrations croissantes en NiCl₂, j'ai mesuré la vitesse initiale de réaction et quantifié les protéines contenues dans les échantillons testés; la vitesse initiale de réaction a également été mesurée pour un tampon à pH 5.5. J'ai ainsi montré que l'activité de Vp16PDF est fortement augmentée en utilisant un tampon de lyse contenant jusqu'à 80 mM de NiCl₂, concentration au-delà de laquelle un plateau semble être atteint (Figure I-12C). Par ailleurs, l'activation semble meilleure avec un tampon de lyse à pH 4,0 comparé à pH 5,5. De plus, comme attendu suite aux tests précédents, la quantité totale de protéines diminue à mesure que l'on augmente la concentration en nickel (Figure I-12C). De manière surprenante, j'ai même pu

observer une augmentation de la quantité totale de protéines au-delà de 50 mM de nickel (Figure I-12C), qui semble correspondre à l'augmentation de la quantité de *Vp*16PDF soluble (Figure I-12B).



Figure I-12 : Influence du pH et de la concentration en nickel dans le tampon de lyse sur l'activité de *Vp*16PDF dans des extraits bruts solubles. Des aliquotes de culture bactérienne ayant surexprimé *Vp*16PDF ont été resuspendus dans du tampon de lyse à pH variable en présence de différentes concentrations en NiCl₂. La vitesse initiale de réaction ($vo(A_{340}.min^{-1})$) a ensuite été mesurée sur les extraits bruts solubles ainsi obtenus, et reportée sur le graphique en fonction de la concentration en nickel présente dans le tampon de lyse. De plus, les échantillons ont été analysés sur gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes, colorés au bleu de Coomassie. A) Le test d'activité a été réalisé à 37°C et 4 mM de fMAS, à partir d'échantillons lysés dans un tampon à pH 4,0, 5,5 ou 7,5 (courbes en bleu, rouge et noir respectivement). B) Les échantillons testés en A ont été analysés sur gel. C) Le test d'activité a été réalisé à 37°C et 4 mM de fMAS, à partir d'échantillons lysés dans un tampon à pH 4,0 ou 5,5 (courbes en bleu et rouge respectivement), avec des concentrations en NiCl₂ allant jusqu'à 100 mM. La quantité de protéines totales dans les échantillons a été mesurée et les valeurs reportées sur le graphique. D) L'activité spécifique (vitesse initiale divisée par la quantité de protéines totales) est représentée en fonction de la concentration en nickel dans le tampon de lyse, pour chacun des deux pH (4,0 et 5,5, courbes en bleu et rouge respectivement).

L'ensemble des résultats précédents m'a permis de déterminer le tampon de lyse adéquat (50 mM MES-KOH pH4 avec 80 mM de NiCl₂) permettant à la protéine Vp16PDF d'être à la fois soluble et de préserver son activité. Par ailleurs, un avantage non négligeable de ce tampon est qu'il permet une purification partielle de la protéine via l'élimination d'un grand nombre de contaminants. Cependant, avant de procéder à une nouvelle purification de Vp16PDF en utilisant ce tampon optimisé, j'ai voulu vérifier si l'on pouvait diminuer la concentration en nickel après la lyse, c'est-à-dire durant la purification, sans affecter l'activité enzymatique. En effet, dans la suite de ma thèse (voir Chapitre II), j'ai étudié les interactions de Vp16PDF avec les ribosomes bactériens, qui sont très sensibles aux ions métalliques ²³⁶. Nous avons donc cherché à travailler avec des concentrations de nickel les plus faibles possible pour ne pas risquer de perturber leur intégrité. Ainsi, une dialyse de la fraction soluble active obtenue en lysant les bactéries ayant surexprimé Vp16PDF dans le tampon 50 mM MES-KOH pH4,0, 80 mM NiCl₂ a été effectuée contre un tampon 50 mM MES-KOH pH4,0 contenant des concentrations plus faibles en NiCl₂ (2 mM, 5 mM, 10 mM et 15 mM). L'analyse des échantillons dialysés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes a montré que diminuer la concentration en nickel après l'étape de lyse n'altère pas la solubilité de la protéine, quelle que soit la concentration en nickel (Figure I-13A). Les échantillons contiennent donc tous la même quantité de Vp16PDF, et des tests d'activité ont donc pu être réalisés. La mesure des vitesses initiales de réaction a montré une perte quasi-totale de l'activité de Vp16PDF lorsque celle-ci était dialysée contre un tampon contenant une faible concentration en nickel (Figure I-13B), indiquant que le maintien de l'activité enzymatique nécessite un minimum de 15 mM de NiCl₂ dans le tampon de dialyse. Cette concentration étant déjà trop importante pour la stabilité des ribosomes utilisés lors d'expériences ultérieures, nous avons décidé de ne pas tester d'autres concentrations en nickel dans le tampon de dialyse. Comme décrit dans le chapitre II, les tests d'interaction avec les ribosomes ont donc été réalisés avec la forme peu active de Vp16PDF, purifiée avec des tampons faiblement concentrés en nickel (5 mM) comme décrit précédemment (voir section C.1 et C.2). Par ailleurs, les tests d'activité ont révélé une diminution de l'activité enzymatique au-delà de 3 mM de substrat fMAS, phénomène connu pour être une inhibition par excès de substrat propre aux PDFs ²²⁹. Ce phénomène n'avait pas été observé jusqu'à maintenant (j'ai au contraire montré une vitesse initiale de réaction supérieure en utilisant 6 mM de fMAS comparé à 4 mM, voir Figure I-11A), probablement parce que l'activité enzymatique n'était pas optimisée en raison de conditions de tampons non adaptées (mesures réalisées sur des bactéries lysées dans un tampon à pH 5,5).



Figure I-13 : Activité de *Vp*16PDF après dialyse dans des tampons contenant de faibles concentrations en nickel. Des aliquotes de culture bactérienne ayant surexprimé *Vp*16PDF ont été resuspendus dans du tampon MES-KOH 50 mM pH 4,0, 80 mM NiCl₂, puis dialysés contre des tampons contenant des concentrations en NiCl₂ plus faibles (2 à 15 mM). A) Les échantillons dialysés ont été analysés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, coloré au bleu de Coomassie. B) Les vitesses initiales de réaction ont été mesurées sur les échantillons dialysés ainsi obtenus pour des concentrations croissantes de substrat fMAS. En bleu, la vitesse initiale mesurée pour la protéine *Vp*16PDF non dialysée, en jaune, violet et bleu les protéines dialysées contres des tampons contenant respectivement 5, 10 ou 15 mM de NiCl₂.

E – Purification et caractérisation enzymatique d'une forme active de Vp16PDF

Par la suite, j'ai procédé à une nouvelle purification de Vp16PDF en utilisant les conditions de tampon permettant le maintien de l'activité, ce qui m'a permis de déterminer précisément ses constantes catalytiques.

E.1 – Purification de *Vp*16PDF dans des tampons fortement concentrés en nickel

Vp16PDF a été surexprimée en bactéries et les cellules ont été lysées dans le tampon optimisé 50 mM MES-KOH pH 4,0, 80 mM NiCl₂. La protéine étant globalement chargée positivement dans ce tampon, j'ai pu procéder à une étape de chromatographie en utilisant une colonne échangeuse de cations (voir Matériels et Méthodes). A l'issue de cette étape, la pureté de Vp16PDF s'est avérée supérieure à 90% (Figure I-14).

Grâce à l'optimisation du tampon de lyse des bactéries, il est donc possible, en une seule étape chromatographique, d'obtenir la protéine Vp16PDF sous forme pure et active avec un bon rendement de purification (12 mg de protéine pour 2 litres de culture bactérienne).

		MM	0,5µg	1µg	2µg
180 130 100 70 55	kDa kDa kDa kDa kDa				
40	kDa	_			
35	kDa				
25	kDa				
15	kDa	-	_	-	-
10	kDa				

Figure I-14 : Analyse de la pureté de *Vp*16PDF après purification dans des conditions de bas pH (4,0) et forte concentration en nickel (80 mM). Gel SDS-PAGE 14% coloré au bleu de Coomassie.

E.2 –La caractérisation de l'activité déformylase *in vitro* de la protéine *Vp*16PDF purifiée avec le nouveau protocole révèle une protéine très active partageant des constantes catalytiques comparables aux autres PDFs actives

Les constantes enzymatiques de Vp16PDF purifiée *via* le protocole optimisé ont été déterminées avec le test d'activité couplé à la FDH (voir Matériels et Méthodes), en utilisant le substrat Fo-Met-Ala-Ser (fMAS), comme précédemment. Les vitesses initiales de réaction obtenues en faisant varier la concentration en substrat ont pu être traitées selon l'équation de Michaëlis-Menten (Figure I-15A).

La modification des conditions de purification a permis d'obtenir une enzyme ayant une vitesse de catalyse nettement améliorée par rapport au premier protocole utilisé ($k_{cat} = 20 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, contre 3 s⁻¹) (Tableau I-1). L'efficacité catalytique, déterminée par le rapport entre la vitesse catalytique (k_{cat}) et la constante de Michaëlis (K_m) est également fortement améliorée (8478 M⁻¹.s⁻¹ contre 915 M⁻¹.s⁻¹ obtenue initialement avec la forme purifiée en condition pH5,5 et 5 mM de nickel), et est comparable à celle d'autres déformylases actives connues, comme Ni-*At*PDF1B ou Ni-*Tt*PDF (Tableau I-I). De plus *Vp*16PDF possède une affinité pour le substrat fMAS qui est dans l'ordre de grandeur de celui observé pour les peptides déformylases actives ($K_m = 2,3 \pm 0,3$ mM).

D'après les données obtenues, et comparées à celles issues de la littérature, il semble que Vp16PDF soit une déformylase pleinement active une fois purifiée dans les nouvelles conditions que j'ai établies.



Figure I-15 : Vitesse initiale de déformylation de Ni-*Vp***16PDF.** Les vitesses initiales de réaction pour chaque concentration de substrat sont représentées selon les représentations de Michaëlis et Menten (**A**) et Lineweaver et Burke (**B**). L'activité deformylase a été mesurée en présence de concentrations croissantes de fMAS et 67,5 nM d'enzyme.

E.3 – Vp16PDF est sensible à l'inhibiteur naturel des PDFs, l'actinonine

L'actinonine est un inhibiteur peptidomimétique naturel des PDFs ²⁰⁰ dont le mode d'action est connu ^{201,235}. C'est un inhibiteur compétitif ^{200,201} qui se fixe aux PDFs selon un mécanisme à deux étapes (Figure I-16). Au cours de la première étape, l'actinonine se fixe rapidement à l'enzyme avec une constante d'inhibition $K_{\rm I}$ modérée. Le complexe EI ainsi formé évolue ensuite lentement vers un complexe EI* de très haute affinité ($K_{\rm I*} << K_{\rm I}$). Ce complexe final est qualifié de quasi-irréversible car il possède une constante de dissociation très faible. Le passage du complexe EI en complexe EI* est vraisemblablement dû à un changement de conformation de l'enzyme en réponse à la fixation de l'actinonine (processus d'induced-fit) ^{235,237}. L'actinonine étant un inhibiteur universel des PDFs, j'ai cherché à savoir si *Vp*16PDF y est également sensible, et si oui, à en déterminer les constantes d'inhibition, en comparant notamment les valeurs $K_{\rm I}$ et $K_{\rm I}^*$. La mesure des constantes d'inhibition utilise le test d'activité couplé à la FDH et le substrat fMAS, et l'actinonine est ajoutée à des concentrations variables de manière à obtenir des courbes dose-réponse (voir Matériel et Méthodes).



Figure I-16 : Mode d'action de l'actinonine (I) sur une PDF (E) selon un mécanisme de slow-tight binding en deux étapes.

Dans un premier temps, j'ai déterminé la valeur d'IC₅₀, correspondant à la concentration d'actinonine nécessaire pour inhiber l'activité PDF de moitié. Pour cela, j'ai pré-incubé la protéine et l'actinonine pendant 10 min à 37°C, en utilisant des concentrations croissantes d'actinonine, puis déclenché la réaction enzymatique par l'ajout de substrat à une concentration fixe (3 mM). J'ai ainsi obtenu une IC₅₀ de 51 ± 4 nM pour 100 nM de *Vp*16PDF (Figure I-17A). Par ailleurs, la pré-incubation conduit à la formation d'un complexe final EI* stable ce qui permet, le cas échéant, de s'affranchir de l'étape lente du mécanisme d'inhibition par slow-tight binding, permettant ainsi d'avoir accès à la valeur *K*_I*. Dans ce travail, j'ai déterminé une constante d'inhibition apparente (*K*_{I*app}), *via* la représentation du rapport v_0/v_i (= vitesse initiale de réaction en absence d'actinonine / vitesse initiale de réaction en présence d'actinonine) en fonction de la concentration en actinonine, qui conduit à une courbe dose-réponse sous la forme d'une droite (figure I-18B droite avec les carrés) dont le coefficient directeur est égal à la valeur $1 / K_{I*app}$. J'ai ainsi pu déterminer une valeur *K*_{I*app} égale à 30 ± 3 nM.

Par la suite, j'ai reproduit l'expérience en utilisant les mêmes concentrations en actinonine, substrat et enzyme, mais cette fois sans pré-incubation du complexe Vp16PDF: actinonine. Les cinétiques obtenues étaient différentes de celles observées précédemment, avec deux phases clairement distinctes. Les vitesses initiales de réaction pour la première phase ont été relevées, et la droite v_0/v_i en fonction de la concentration en actinonine tracée (Figure I-17B droite avec les triangles). J'ai ainsi pu déterminer une valeur de K_1 égale à 167 ± 10 nM (le coefficient directeur de la droite est égal à $1 / K_I$).

Les cinétiques d'inhibition ainsi que la comparaison des valeurs $K_{\rm I}$ et $K_{\rm I^*app}$ ($K_{\rm I^*app} < K_{\rm I}$) montrent clairement une différence de comportement de Vp16PDF selon qu'elle est préincubée ou non avec l'actinonine. Cela est tout à fait cohérent avec un mécanisme d'inhibition par slow-tight binding, que l'on retrouve pour la plupart des PDFs ^{201,235,238}.



Figure I-17 : **Inhibition de** *Vp*16PDF **par l'actinonine. A**) Mesure de l'IC₅₀ de l'actinonine sur *Vp*16PDF (100 nM). L'activité résiduelle de l'enzyme a été mesurée pour des concentrations croissantes d'actinonine, en présence de 3 mM fMAS. L'activité initiale hors présence d'inhibiteur est considérée comme équivalente à 100%. B) Représentation des vitesses initiales de réaction mesurées en A sous la forme $v_0 / v_i =$ f(actinonine). Le coefficient directeur de la droite ainsi obtenue permet de déterminer le *K*_I apparent. Les carrés représentent l'expérience avec préincubation du complexe enzyme/inhibiteur et les triangles l'expérience sans préincubation du complexe enzyme/inhibiteur.

E.4 - Analyse de la spécificité de substrat de Vp16PDF

Jusqu'à présent, l'ensemble des propriétés enzymatiques de Vp16PDF a été déterminé avec un seul tripeptide (fMAS), qui est le plus souvent utilisé au laboratoire car l'un de ceux qui permettent d'obtenir les meilleures efficacités catalytiques avec la PDF d'E. coli ^{130,229}. Or il n'est pas exclu que Vp16PDF ait une spécificité de substrat particulière, permettant de favoriser la déformylation de l'une ou l'autre des protéines codées par le génome du phage Vp16T, ou au contraire de défavoriser la déformylation des protéines de la bactérie hôte. Une telle observation serait un élément pour comprendre la présence d'un gène codant une PDF dans des génomes de virus. Il est à noter que la caractérisation in vitro de l'activité déformylase de la PDF du cyanophage Synechococcus S-SSM7 en utilisant différents tétrapeptides formylés dérivés de séquences de protéines du phage a mis en évidence une légère différence de spécificité de substrat de l'enzyme par rapport à l'enzyme de l'hôte ²²⁵. Afin de déterminer si Vp16PDF pourrait déformyler spécifiquement des protéines codées par son propre génome, nous avons défini des tripeptides dont la séquence est dérivée des séquences N-terminales du protéome du phage. D'après les données de séquençage, le génome du phage Vp16T contient 64 ORFs (Figure I-18)²¹⁸. Une fonction a pu être attribuée pour seulement douze des protéines codées par ces ORFs ²¹⁸, mais aucune d'elle n'a encore été confirmée expérimentalement.



Figure I-18: Carte génomique du phage *Vp***16T.** Seules les ORFs codant pour des séquences protéiques supérieures à 70 acides aminés sont représentées. Seules 12 ORFs codent pour des protéines dont la séquence est homologue à celle de protéines dont la fonction est connue. D'après Seguritan *et al*, 2003 ²¹⁸.

Après analyse des séquences protéiques codées par les ORFs de Vp16T, nous avons choisi de tester les peptides MNE, MAL, MPA et MSN, correspondant respectivement aux Nterminaux des protéines putatives ADN polymérase, protéine de queue (« tail fiber protein »), capside et hélicase. De plus, nous avons choisi de tester les peptides MAK, MTT et MKL, correspondant à des séquences N-terminales représentées plusieurs fois (3 fois maximum) dans le génome du phage (le peptide MNE est trouvé deux fois dans les séquences N-terminales du phage). Les efficacités catalytiques de Vp16PDF et EcPDF vis-à-vis de ces peptides ont été déterminées en utilisant le test d'activité couplé à la FDH; les efficacités catalytiques obtenues avec le peptide de référence fMAS ont été fixées arbitrairement comme étant 100%.

Les peptides ont été solubilisés dans de l'eau (voir Matériels et Méthodes). Malheureusement, malgré de nombreux essais, dont l'ajout de DMSO (voir Matériels et Méthodes), les peptides fMNE et fMAL n'ont pas pu être solubilisés et ils n'ont donc pas été testés. De plus, en raison de problèmes expérimentaux, le peptide fMAK a pu être testé uniquement avec *Ec*PDF.

L'efficacité catalytique de Vp16PDF vis-à-vis des peptides fMKL et fMTT est équivalente à celle obtenue avec le fMAS, tandis que celle pour les peptides fMPA et fMSN est légèrement moins bonne (Tableau I-2). Néanmoins, bien qu'une légère spécificité de substrat semble ressortir de ces résultats, celle-ci n'est pas significative car les mêmes tendances ont été obtenues avec la PDF d'*E. coli* (Tableau I-2). Si ces résultats ne révèlent pas pour l'instant une activité préférentielle de la PDF du phage pour ses propres protéines, il serait toutefois nécessaire de tester d'autres tripeptides correspondant aux N-terminaux d'autres protéines du phage afin d'avoir une vision plus exhaustive et pouvoir déterminer plus sûrement si Vp16PDFpourrait ou non favoriser la déformylation des protéines du phage.

	Vp16PDF				EcPDF			
Peptide	K _m	k _{cat}	$k_{\rm cat}$ / $K_{\rm m}$	k _{cat} /	K _m	$k_{_{ m cat}}$	$k_{\rm cat}^{}$ / $K_{\rm m}^{}$	k _{cat} /
	(mM)	(\sec^{-1})	$(\sec^{-1} M^{-1})$	$K_{\rm m}(\%)$	(mM)	(\sec^{-1})	$(\sec^{-1} M^{-1})$	$K_{\rm m}(\%)$
fMAS	2,3	19,6	8478	100	2,49	57	22800	100
fMKL	2,9	27,4	9448	111	0,19	34.4	86000	377
fMPA	1,43	5,3	3711	43,7	5,1	82	16080	70,5
fMSN	12	27,4	2286	26,9	5,8	88,6	15355	67,3
fMTT	1,01	9,04	8950	105	1,4	70,1	49366	216
fMAK	ND	ND	ND	ND	3,8	144,2	44808	205

Tableau I-2: Constantes enzymatiques de *Vp***16PDF et** *Ec***PDF pour différents tripeptides formylés.** Tableau comparatif des constantes catalytiques mesurées pour différents substrats entre *Ec*PDF et *Vp*16PDF. Efficacité catalytique pour le fMAS fixée arbitrairement comme 100% d'activité.

Les PDFs n'avant pas de spécificité de substrat, elles reconnaissent virtuellement n'importe quelle protéine du moment que celle-ci débute par une méthionine formylée ²²⁹, ce qui conduit à la déformylation de la quasi-totalité des protéines en cours de synthèse, la proportion allant jusqu'à 95% chez les bactéries ^{47,140}. De ce fait, l'ensemble des vingt acides aminés est représenté en N-terminal des protéines, notamment en deuxième position (voir Figure I-19 sur laquelle les protéomes des bactéries E. coli et V. parahaemolyticus ont été pris pour exemples). De manière étonnante, la nature du deuxième acide aminé dans les protéines codées par Vp16T est un peu différente. Aucun résidu Trp, Cys, Met ou Glu n'est trouvé en deuxième position (Figure I-19). De plus, le résidu Ala est particulièrement abondant tandis que le résidu Ser est sous-représenté (Figure I-19). Dans une moindre mesure, une Tyr est plus fréquemment retrouvée en deuxième position dans le protéome de Vp16T comparé aux deux génomes bactériens pris en exemple (Figure I-19). Cette tendance est partiellement retrouvée dans le protéome du cyanophage S-SSM7 : les résidus Trp et Cys ne sont jamais présents en deuxième position, et il plutôt rare d'avoir une His (Figure I-19). Ces particularités pourraient conduire à une spécificité de substrat inhabituelle. Bien que les tests préliminaires de spécificité de substrat ne l'indiquent pas (Tableau I-2), des études complémentaires seront nécessaires.

Par ailleurs, si le résidu en deuxième position n'a généralement pas d'influence pour les PDFs, elle en a une pour les méthionines aminopeptidases (MetAPs). En effet, il a été montré qu'une chaîne latérale peu encombrante en deuxième position (Gly, Ala, Pro, Ser, Cys, voire Thr et Val) permet aux MetAPs de cliver la Met initiale préalablement déformylée, tandis

qu'une chaîne latérale encombrante ne permet pas le clivage ¹³¹. La nature du deuxième acide aminé étant inhabituelle dans le protéome du phage Vp16T, nous nous sommes demandé quelle sera la conséquence quant au clivage de la Met initiatrice des protéines du phage lors de l'expression de ces protéines par la cellule hôte (le génome de Vp16T ne possédant a priori pas d'ORF codant une MetAP putative, l'excision de la Met initiatrice sera vraisemblablement assurée par la MetAP de l'hôte). Nous avons utilisé le logiciel Termi*N*ator (https://bioweb.i2bc.paris-saclay.fr/terminator3/) ¹⁸⁸ qui permet de prédire, pour un protéome donné, la proportion de protéines qui subissent la voie de la NME (c'est-à-dire perte de la formyl-méthionine). D'après cette prédiction, 41% des protéines du phage Vp16T devraient perdre leur formyl-Met, proportion très similaire à celle prédite pour les protéines des bactéries *E. coli* et *V. parahaemolyticus*, ainsi que pour le cyanophage S-SSM7 (respectivement 39, 36 et 41%). La nature atypique des extrémités N-terminales des protéines du phage Vp16T ne devrait donc pas avoir d'effet sur le clivage des Met N-ter, hypothèse qui reste toutefois à valider expérimentalement.



Figure I-19 : Fréquence des aminés retrouvés en seconde position dans le protéome d'*E. coli, V. parahaemolyticus, Vp***16T et S-SSM7.** Les fréquences de chaque acide aminé sont représentées en bleu, orange, gris et jaune pour les organismes *E. coli, V. parahaemolyticus, Vp***16T et S-SSM7** respectivement.

Conclusion

L'étude des séquences génomiques issues de programmes de séquençage récents a permis d'identifier la présence jusqu'alors insoupçonnée de séquences homologues de peptides déformylases chez un certain nombre de virus et bactériophages. Parmi ces séquences, celle provenant du phage Vp16T apparaît comme étant l'une des plus courtes identifiées à ce jour. L'analyse des alignements de séquences avec de nombreuses peptides déformylases indique que cette enzyme est la plus proche du sous-type 1B, comme celle d'*E. coli*. Néanmoins cette PDF est tronquée en C-terminal et ne possède donc pas l'hélice α caractéristique des PDFs de type 1B décrite comme permettant l'interaction avec le ribosome ⁹¹.

L'étude de sa structure et de sa stabilité a permis de montrer que la protéine a un repliement classique pour une PDF de type 1B ainsi qu'une stabilité similaire aux autres déformylases connues. Cette PDF est active *in vivo*, ayant la capacité de complémenter la déformylase endogène d'*E. coli*. De plus, les expérimentations *in vitro* indiquent que les constantes catalytiques sont similaires à celles obtenues pour d'autres déformylases actives et aucune spécificité de substrat n'a pu être observée. Néanmoins, une particularité réside dans les conditions de purification de l'enzyme. En effet, afin de substituer son métal naturel et de conserver son activité durant la purification, *Vp*16PDF nécessite d'être extraite et purifiée dans un tampon acide (pH 4,0) avec une forte concentration en nickel (80 mM). L'étude de son inhibition par l'actinonine, puissant inhibiteur des PDFs, révèle des constantes d'inhibition de l'ordre de grandeur de celles observées pour d'autres déformylases.

Nous pouvons ainsi conclure, à l'issue de ce chapitre, que la séquence homologue des PDFs identifiée chez le phage Vp16T code bien une peptide déformylase de type 1B, possédant des caractéristiques de structure, de stabilité et d'activité communes à un grand nombre de déformylases connues. J'ai par la suite cherché à savoir si Vp16PDF est capable d'interagir avec les ribosomes malgré l'absence de l'hélice α C-terminale caractéristique des PDFs de type 1B et, si oui, comment. Les résultats sont décrits dans le chapitre suivant.

Chapitre II : Caractérisation biochimique du complexe Vp16PDF/ribosome

J'ai montré dans le Chapitre I que l'ORF 60 identifiée dans le génome du bactériophage Vp16T, supposée coder une PDF ²¹⁸, code effectivement une protéine ayant une activité peptide déformylase, *in vitro* et *in vivo*. J'ai également montré que cette protéine (Vp16PDF) est globalement comparable aux autres PDFs connues, si ce n'est son extrémité C-terminale extrêmement courte, conduisant à l'absence de l'hélice α C-terminale typique des PDFs de type 1B auxquelles elle est affiliée. Or cette hélice permet vraisemblablement aux PDF1Bs d'interagir avec les ribosomes bactériens, au moins chez *E. coli* ⁹⁴. Nous nous sommes alors demandé si Vp16PDF est capable d'interagir avec les ribosomes malgré l'absence d'hélice α C-terminale et, si oui, comment. Quelles sont les régions de Vp16PDF et du ribosome impliquées dans l'interaction ? Quelle est l'affinité du complexe PDF:ribosome ? Quel est le rôle exact de l'hélice α C-terminale de la PDF d'*E. coli* ? Quel est le rôle de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse dans la formation du complexe ? J'ai tenté de répondre à ces questions en mettant en place toute une série d'expériences basées sur des approches biochimiques et structurales.

Les résultats obtenus au cours de la caractérisation biochimique et enzymatique de *Vp*16PDF (voir Chapitre I) ont montré qu'il est possible de préserver une bonne activité déformylase à condition de maintenir l'enzyme dans un tampon contenant une très forte concentration en nickel (80 mM). Néanmoins, compte tenu de l'influence des ions divalents sur la structure du ribosome et/ou sur l'interaction de ce dernier avec ses partenaires, ainsi que les problèmes techniques qui peuvent être engendrés par la haute concentration de nickel, j'ai décidé de travailler avec la protéine purifiée dans des tampons faiblement concentrés en nickel (5 mM) pour éviter toute sorte d'interférence avec le ribosome. La totalité des expériences présentées dans ce chapitre a été réalisée avec des ribosomes 70S d'*E. coli*. Pour les expériences de pontage chimique j'ai utilisé des ribosomes que j'ai purifiés au laboratoire et pour les expériences de sédimentation j'ai utilisé les ribosomes provenant d'un kit commercial (voir Matériels et Méthodes).

A – Vp16PDF interagit avec les ribosomes bactériens malgré l'absence de l'hélice α C-terminale typique des PDFs de type 1B

In vitro, la PDF d'*E. coli* (*Ec*PDF) interagit avec les ribosomes bactériens, et plus particulièrement avec la grande sous-unité, selon une stœchiométrie 1:1 et avec une affinité de l'ordre de 2 μ M ($K_d = 2,5 \pm 1,0 \mu$ M pour les 70S et $K_d = 1,8 \pm 0,9 \mu$ M pour les 50S selon Bingel-Erlenmeyer *et al.* ⁹¹, $K_d \sim 1,5 \mu$ M pour les 70S selon Bornemann *et al.* ¹³²). *Ec*PDF se

positionne sur le ribosome à proximité des protéines bL17, bL32 et uL22, c'est-à-dire près de l'extrémité du tunnel de sortie (voir Figure i.11 en Introduction) ; elle interagit directement avec la protéine uL22 ainsi que l'ARN ribosomal 23S, *via* son hélice α C-terminale ⁹¹. *Vp*16PDF étant une PDF très proche structuralement d'*Ec*PDF (voir Chapitre I section C5), mais ne possédant pas l'hélice α C-terminale qui permet à *Ec*PDF de se fixer au ribosome, mon premier objectif a donc été de déterminer si *Vp*16PDF est capable d'interagir avec les ribosomes malgré l'absence de cette hélice et, si oui, de déterminer avec quelle affinité. Pour cela j'ai mis au point un protocole inspiré de la technique de sédimentation sur couche de sucrose utilisée précédemment par Sandikci *et al.* ⁹⁴ (voir Matériels et Méthodes). Dans cette expérience, l'échantillon contenant le complexe PDF:ribosome préalablement formé est déposé à la surface d'une solution de sucrose et soumis à ultracentrifugation (voir Matériels et Méthodes). Les ribosomes se retrouvent alors dans le culot et les protéines solubles dans le surnageant. Un Western-blot suivi d'une immunodétection en utilisant les anticorps anti-*Vp*16PDF que nous avons produits (voir Chapitre I) est réalisé sur le culot afin de détecter ou non la présence de *Vp*16PDF co-sédimentée avec les ribosomes.

Dans un premier temps, j'ai voulu reproduire l'approche suivie par Sandikci *et al.* ⁹⁴, à savoir utiliser une concentration fixe de ribosomes et des concentrations croissantes de Vp16PDF. J'ai donc commencé par contrôler le comportement de Vp16PDF en absence de ribosomes. De manière surprenante, l'analyse par Western-blot a alors montré que la protéine sédimente malgré l'absence de ribosomes dans l'échantillon, de façon proportionnelle à la quantité de protéine testée (Figure II-1). Nous avons constaté le même comportement avec la protéine d'*E. coli*. Ce résultat signifiait que l'expérience ne pouvait pas être réalisée en présence d'une concentration constante de ribosomes et d'une concentration variable de protéine Vp16PDF.



Figure II-1 : Sédimentation de *Vp*16PDF en absence de ribosomes. Des concentrations croissantes de *Vp*16PDF (de 1 à 15 μ M) ont été déposées à la surface d'une couche de sucrose, puis les échantillons ont été centrifugés. Les culots ont alors été resuspendus puis analysés par Western-blot suivi d'une immunodétection en utilisant des anticorps anti-*Vp*16PDF.

Pour pouvoir m'affranchir de la capacité de Vp16PDF à sédimenter seule, j'ai donc modifié le protocole, en fixant la concentration de Vp16PDF (5 µM) et en augmentant progressivement la concentration en ribosomes (de 0,2 µM à 2 µM). Dans ces conditions, une fraction constante de protéine sédimentera indépendamment de la présence de ribosomes (voir ci-dessus), et l'augmentation de la quantité de PDF sédimentée en présence de ribosomes sera donc due à sa capacité à interagir avec les ribosomes et non pas à l'augmentation de la quantité de déformylase dans le mélange réactionnel. Comme attendu, une légère fraction de Vp16PDFsédimente en absence de ribosomes et une quantité plus importante de protéine sédimente à mesure que l'on augmente la quantité de ribosomes dans les échantillons (Figure II-2). Ce résultat indique une interaction PDF:70S qui semble spécifique, et signifie donc que l'absence d'hélice α C-terminale chez Vp16PDF n'empêche pas la protéine de se lier au ribosome.

La quantité de *Vp*16PDF co-sédimentée avec les ribosomes peut être quantifiée à partir du résultat de Western-blot (voir Matériels et Méthodes), permettant de représenter la quantité de protéine co-sédimentée en fonction de la concentration de ribosomes dans l'échantillon (Figure II-2B). On remarque qu'entre 0,2 μ M et 1,5 μ M de ribosome, la quantité de *Vp*16PDF sédimentée reste très faible (bien que supérieure à la quantité sédimentée en absence de ribosomes, voir Figure II-2A) alors que lorsque la concentration en ribosomes atteint 2 μ M, on observe une forte augmentation de la sédimentation de *Vp*16PDF (FigureII-2). L'affinité apparente est donc supérieure ou égale à 1-2 μ M, ce qui paraît comparables aux valeurs mesurées pour le complexe *Ec*PDF:*Ec*70S ^{91,132}. Aucun plateau correspondant à la quantité maximale de protéine qui peut co-sédimenter n'a pu être atteint et, pour des raisons techniques, la quantité de ribosomes testée n'a pas pu être augmentée. En effet, pour pouvoir ensuite comparer ces résultats avec ceux obtenus avec des ribosomes ayant une chaine polypeptidique précise, j'ai utilisé les ribosomes d'un kit commercial adapté pour la préparation des ribosomes bloqués, dont la concentration en ribosome est très faible. А



Figure II-2: Interaction de *Vp***16PDF avec les ribosomes 70S vides d'***E. coli.* **A**) Résultat typique montrant l'interaction *Vp*16PDF:70S qui a été mesurée par une expérience de co-sédimentation sur couche de 20% sucrose et analysée par gel SDS-PAGE 15% suivi d'un Western-blot en utilisant des anticorps anti-*Vp*16PDF. **B**) Quantification du signal de fluorescence et normalisation en quantité sédimentée de *Vp*16PDF (%) en fonction de la concentration en ribosome (μ M). La quantification provient de gels d'analyses ou l'on compare sur le même gel, la sédimentation de *Vp*16PDF en présence de ribosome possédant plusieurs longueurs de chaîne peptidique. C'est la raison pour laquelle le point à 1,5 μ M présent sur la figure A (qui représente une gamme de concentration de ribosome la plus large possible), ne figure pas sur la figure B.

B – L'absence de l'hélice α C-terminale chez *Vp*16PDF semble conduire à une localisation au ribosome différente de celle observée avec *Ec*PDF

Après avoir montré que Vp16PDF interagit avec des ribosomes bactériens vides, j'ai cherché à savoir quelles protéines ribosomales sont impliquées dans l'interaction. J'ai pour cela procédé à deux types d'approches: des expériences de pontage chimique couplées à des analyses par Western-blot et spectrométrie de masse, ainsi que des expériences de cristallisation visant à déterminer la structure du complexe Vp16PDF:ribosome par cristallographie des rayons X.

B.1 - Vp16PDF semble présenter trois sites de fixation au ribosome

Le cross-linking ou pontage chimique est une technique qui utilise un agent pontant (ou cross-linker) permettant de lier de manière covalente deux partenaires, par exemple des protéines, impliqués dans un complexe stable. Le complexe protéine-protéine ainsi formé peut alors être étudié par différentes approches dont la spectrométrie de masse. Dans le cadre de l'étude des interactions PDF:ribosome, cette technique a permis à Bingel-Erlenmeyer *et al.* de révéler une proximité spatiale entre la PDF d'*E. coli* et la protéine ribosomale bL17, située à proximité de l'extrémité du tunnel de sortie ⁹¹. J'ai voulu reproduire cette expérience et appliquer le protocole pour étudier la formation du complexe *Vp*16PDF:ribosome.

Afin de pouvoir comparer aisément les résultats obtenus avec *Ec*PDF ⁹¹, j'ai choisi d'utiliser comme décrit l'EDC (ou 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) comme agent pontant. Cette molécule possède deux extrémités réactives. L'une réagit avec le groupement carboxylate d'un aspartate ou glutamate pour produire un composé à fonction amine réactive mais qui est instable et donc sujet à l'hydrolyse. L'autre extrémité, si elle réagit rapidement avec l'amine primaire d'une lysine, forme alors une liaison amide avec l'EDC. L'EDC a la particularité d'être un agent pontant de longueur nulle, c'est-à-dire qu'il peut lier un aspartate ou glutamate avec une lysine qui sont très proches spatialement. D'autre part, à l'issue de la réaction de pontage, l'EDC n'existe plus, les deux chaînes latérales étant liées covalemment l'une à l'autre par une liaison amide. Cela génère donc des complexes protéiques dont la masse moléculaire est la simple addition de la masse des protéines liées, moins une molécule d'eau perdue lors de la formation de cette liaison amide.

A l'issue de la réaction de pontage chimique, une étape d'ultracentrifugation permet la sédimentation des ribosomes seuls ou complexés avec Vp16PDF, ce qui permet d'éliminer les contaminants de faibles poids moléculaires se trouvant dans le surnageant. Une digestion à la RNAse permet ensuite de dégrader l'ARN et de dissocier l'ensemble des ribosomes en protéines seules ou complexes covalents protéine-protéine. D'autre part, nous avons utilisé dans cette expérience une protéine Vp16PDF qui possède une étiquette Strep-tag insérée à son extrémité N-terminale, ou une étiquette 6xHis en C-terminal, permettant une étape de purification partielle de la protéine contenue dans le mélange réactionnel. Ainsi l'échantillon final analysé ne contient en théorie que la protéine Vp16PDF (éventuellement en complexe avec elle-même), en complexe covalent avec un ou plusieurs partenaires protéiques ribosomaux le cas échéant. Les protéines contenues dans l'échantillon sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, suivie par un transfert sur membrane et une

immunodétection en utilisant les anticorps anti-*Vp*16PDF. L'expérience a également été réalisée avec *Ec*PDF.

En présence de ribosomes mais en absence d'EDC (Figure II-3 A et B), une bande correspondant à *Ec*PDF ou *Vp*16PDF est observée, confirmant la co-sédimentation de chacune des deux protéines avec les ribosomes. En ajoutant de l'EDC aux mêmes échantillons, des bandes de plus hauts poids moléculaires apparaissent (Figure II-3A et B), que l'on ne retrouve pas lorsque l'EDC est ajouté à de la PDF seule (Figure II-3-A et B). Cela indique la formation de complexes impliquant l'une ou l'autre des deux PDFs, ce qui suggère, comme publié précédemment ⁹¹, la formation de complexes covalents entre les PDFs et des protéines ribosomales.



Figure II-3 : Analyse des produits de cross-linking entre la PDF et le ribosome 70S. A) Analyse du produit de crosslinking entre Strep-*Ec*PDF et les ribosomes 70S migré sur gel SDS-PAGE 12% puis Western-blot avec anticorps anti-*Ec*PDF. B) Analyse du produit de cross-linking entre His-*Vp*16PDF et les ribosomes 70S (panneau de gauche) et entre Strep-*Vp*16PDF et les ribosomes 70S (panneau de droite) migré sur gel SDS-PAGE 14% puis Western-blot avec anticorps anti-*Vp*16PDF. Les astérisques représentent les bandes protéiques contenant la PDF d'intérêt, liée à d'autre(s) protéine(s). L'étiquette Strep se trouve en N-terminal et l'étiquette His en C-terminal.

Une analyse des bandes de plus haut poids moléculaire par spectrométrie de masse a effectivement révélé la présence de protéines ribosomales au sein de ces bandes de hauts poids moléculaires (Figure 4A et B). La protéine bL17 a été identifiée dans les échantillons obtenus avec *Ec*PDF, confirmant les données de la littérature ⁹¹. Les protéines bL17, bL19, uL23, uL24, bL25 et bL32 ont été identifiées dans les échantillons obtenus avec His-*Vp*16PDF (Figure II-4A), et les protéines uL22, uL23, uL24, bL25, uL29, uL30, bL31 et bL32 ont été identifiées pour les échantillons obtenus avec Strep-*Vp*16PDF (Figure II-4B).Ces protéines sont toutes, pour la plupart, situées dans la région de l'extrémité du tunnel de sortie (Figure II-4C), ce qui est cohérent avec ce que l'on attend du mode de fixation de *Vp*16PDF sur le ribosome. De plus, ces résultats semble indiquer que nous aurions identifié un site de fixation de *Vp*16PDF

commun avec *Ec*PDF, situé à proximité du tunnel de sortie du peptide et impliquant la protéine bL17, mais également deux autres sites potentiels de fixation de *Vp*16PDF, également situés au voisinage du tunnel de sortie (Figure II-4C).



Figure II-4 : Analyse des produits de cross-linking entre Vp16PDF et les ribosomes 70S par spectrométrie de masse (NanoLC-/MS LTQ-Orbitrap). A) Analyse du produit de cross-linking entre His-Vp16PDF et les ribosomes 70S. Le gel SDS-PAGE 14% est coloré au Sypro ruby (panneau de gauche).Les données de spectrométrie de masse sur les échantillons du gel SDS-PAGE sont normalisées (en bleu les protéines retrouvées dans le contrôle, en rouge les protéines retrouvées dans l'échantillon contenant Vp16PDF). B) Analyse du produit de cross-linking entre Strep-Vp16PDF et les ribosomes 70S. Le gel SDS-PAGE 14% est coloré au Sypro ruby (panneau de gauche).Les données de spectrométrie de masse sur les échantillons du gel SDS-PAGE sont normalisées (en bleu les protéines retrouvées dans le contrôle, en rouge les protéines retrouvées dans l'échantillon contenant Vp16-PDF). L'étiquette Strep se trouve en N-terminal et l'étiquette His en C-terminal. C) Représentation des sites putatifs de fixation de Vp16PDF et EcPDF au ribosome, déterminés par spectrométrie de masse. Les cercles rouges représentent les sites de fixation identifiés pour Vp16PDF et le cercle bleu pour EcPDF. L'étoile blanche indique la position de la sortie du tunnel du peptide.

B.2 – Vers la structure cristalline d'un complexe *Vp*16PDF : ribosome

La résolution de la structure tridimensionnelle de complexes PDF:ribosome par la technique de cristallographie des rayons X permettrait d'identifier et décrire les interactions entre les ribosomes et les PDFs à un niveau atomique. Pour cela, il est nécessaire de produire des cristaux de complexe ribosome:PDF. Plutôt que de chercher de nouvelles conditions de cristallisation des ribosomes en complexe avec la PDF, approche qui s'avérait particulièrement ardue, nous avons choisi de partir de conditions de cristallisation de ribosomes bactériens connues et largement utilisées par différents laboratoires. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Marat Yusupov (IGBMC, Strasbourg), nous avons donc choisi de travailler à partir de conditions de cristallisation des ribosomes 70S de Thermus thermophilus qui ont permis de résoudre de nombreuses structures. J'ai donc purifié au laboratoire des ribosomes de T. thermophilus (voir Matériels et Méthodes) et j'ai ensuite suivi deux approches : la cocristallisation et le trempage. La co-cristallisation consiste à former un complexe ribosome:PDF en solution, puis ensuite à cristalliser ce complexe. Avec cette approche, des modifications du protocole de cristallisation peuvent possiblement être nécessaires par rapport au protocole utilisé pour la cristallisation des ribosomes seuls. En effet, le macrocomplexe ribosome:PDF étant différent du ribosome seul, les paramètres permettant la cristallisation ainsi que l'agencement des molécules au sein du cristal peuvent être différents. La technique de trempage quant à elle consiste à former des cristaux de ribosomes seuls puis à ajouter la protéine PDF dans la goutte de cristallisation contenant les cristaux de ribosomes stables. La PDF peut alors pénétrer dans les cristaux pour aller se fixer à son ou ses site(s) de liaison. Cette approche suppose que les canaux de solvant présents dans les cristaux de ribosomes vides sont suffisamment larges pour que la PDF puisse y diffuser. De plus le ou les site(s) de fixation de la PDF sur le ribosome doivent être accessibles, c'est-à-dire non impliqués dans des contacts cristallins. Nous avons donc analysé l'empilement cristallin des cristaux de ribosomes 70S de T. thermophilus obtenus à partir des conditions de cristallisation que nous avons choisi d'utiliser ^{18,239}. Cela nous a montré que la zone située autour de l'extrémité du tunnel de sortie n'est pas impliquée dans des contacts, ce qui signifie qu'elle est accessible à Vp16PDF.

Les cristaux ont été produits à 24°C par la technique de diffusion de phase-vapeur, en gouttes assises, avec une solution de cristallisation qui contient un mélange de deux PEG à concentrations égales, du thiocyanate de potassium ainsi qu'un tampon Tris ^{18,239} (voir Matériels et Méthodes). Par rapport à une purification de référence donnant de nombreux beaux

cristaux (ribosomes purifiés donnés par M. Yusupov), la préparation de ribosomes que j'ai obtenue a permis l'obtention de cristaux de ribosomes seuls présentant sensiblement les critères attendus, notamment en terme d'aspect et de taille (figure II-5A). J'ai donc procédé à des expériences de co-cristallisation et trempage, avec *Vp*16PDF mais également les protéines PDF et MetAP d'*E. coli* (*Ec*PDF et *Ec*MetAP). La co-cristallisation a produit des cristaux, de taille et d'aspect attendus (Figure II-5B). Cependant, rien n'indique la présence de l'une ou l'autre des protéines au sein des cristaux. Les expériences de trempage ont quant à elle donné des cristaux dont l'aspect n'est pas altéré (Figure II-5C), indiquant soit la fixation de la protéine sur les molécules de ribosomes cristallisés sans affecter l'empilement cristallin, soit qu'aucune protéine n'est rentrée dans les cristaux.



<u>Figure II-5</u>: Cristaux de ribosomes de *T. thermophilus*. A : Cristaux de ribosomes seuls, obtenus dans des conditions de cristallisation connues ^{18,239}. B : Cristaux obtenus par co-cristallisation avec un échantillon contenant des ribosomes et *Ec*PDF (gauche) ou *Ec*MetAP (milieu) ou *Vp*16PDF (droite). C : Cristaux de ribosomes après trempage avec *Ec*MetAP.

J'ai ensuite testé la diffraction des différents types de ribosomes obtenus, au synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette). J'ai pour cela procédé à une étape préalable de cryoprotection des cristaux (voir Matériels et Méthodes), selon le protocole utilisé par l'équipe de M. Yusupov²³⁹. Malheureusement, les cristaux ont été fortement altérés par ce traitement, allant même jusqu'à leur dissolution complète. J'ai malgré tout pu tester la diffraction des rayons X des cristaux qui restaient et qui ne semblaient pas endommagés. Les meilleurs cristaux ont diffracté jusqu'à 10

à 15Å de résolution, ce qui est très loin des 3Å attendus ²³⁹. Etant donné la qualité visuelle des cristaux avant le protocole de cryoprotection, nous avons alors supposé que c'était cette étape critique qui avait fortement altéré les cristaux. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons confié une de nos préparations de ribosomes à Axel Innis (IECB, Bordeaux). Dans ses mains, les ribosomes que nous avons produits ont donné des cristaux qui ont diffracté jusqu'à 3,5Å de résolution. C'est pourquoi, afin d'augmenter nos chances de résoudre des structures de complexes ribosome-protéine de la NME, nous avons décidé d'entamer une collaboration avec lui, en lui confiant l'étude des interactions PDF:ribosome par cristallographie des rayons X.

C – Rôle de l'hélice α des PDFs de type 1B et des résidus V₁₃₅T₁₃₆I₁₃₇ C-terminaux de *Vp*16PDF dans la formation du complexe PDF : ribosome

Ayant montré que Vp16PDF est capable d'interagir avec le ribosome malgré l'absence de l'hélice α supposée médier l'interaction, j'ai par la suite cherché à mieux comprendre le rôle joué par l'extrémité C-terminale des PDFs de type 1B dans la formation du complexe PDF:ribosome. Nous avons donc décidé de construire des protéines chimériques, à savoir une PDF de bactériophage Vp16T à laquelle on ajoute une région C-terminale hélicale mimant une PDF de type 1B classique et, inversement, une PDF d'*E. coli* dépourvue de son extrémité Cterminale, mimant Vp16PDF. J'ai alors testé l'effet des modifications apportées à chacune des deux PDFs par un test de complémentation fonctionnelle à 42°C, identique à celui réalisé au chapitre I. Dans ce test, les gènes codant les différentes constructions chimériques sont insérés dans un plasmide pBAD inductible à l'arabinose, lequel est utilisé pour transformer la souche PAL421Tr d'*E. coli* dont le gène chromosomique codant la PDF endogène a été inactivé (voir section B du Chapitre I et Matériels et Méthodes). Les bactéries possédant le plasmide codant la protéine d'intérêt sont déposées sur milieu gélosé supplémenté en arabinose et incubées à 42°C. Dans ces conditions, la déformylase endogène n'est pas exprimée, seule la protéine d'intérêt est induite.



Figure II-6 : Alignement de séquences de plusieurs PDFs appartenant aux différents types. Les PDFs 1B sont représentées par celle du phage VP16T de *V. parahaemolyticus (Vp*16PDF1B), d'*E. coli (Ec*PDF), de *A. thaliana (At*PDF1B) et du phage S-SSM7 (S-SSM7PDF1B). Les PDFs du type 1A sont représentées par celle d'*A. thaliana (At*PDF1A) et de *H. sapiens (Hs*PDF1A). Les PDFs de type 2 sont représentées par celles de *B. stearothermophilus (Bst*PDF2) et *S. aureus (Sa*PDF2).

Dans un premier temps, nous avons simplement souhaité ajouter à *Vp*16PDF les deux hélices C-terminales d'*Ec*PDF (η 3 et α 3) (Figure II-6 et II-7). Or le dernier résidu de *Vp*16PDF (I137) correspondant au premier résidu de l'hélice 3₁₀ η 3 d'*Ec*PDF (F143), et voulant être sûrs que cette région se replierait bien sous forme d'une hélice 3₁₀, nous avons choisi de conserver la séquence située en amont de cette hélice et avons donc substitué les trois derniers résidus de *Vp*16PDF par les trois résidus équivalents dans *Ec*PDF, soit le motif V₁₃₅T₁₃₆I₁₃₇ muté par le motif K₁₃₅L₁₃₆F₁₃₇. Cette chimère, appelée *Vp*16PDF(KLF)hélice, possède donc la séquence correspondant aux deux hélices C-terminales complètes d'*Ec*PDF, mais ne contient pas la séquence totale de *Vp*16PDF (Figure II-7A et B). De manière surprenante, cette chimère s'est avérée incapable de complémenter la souche *E. coli def* conditionnelle dans des conditions non permissives (Figure II-9A). Les contrôles étant conformes aux résultats attendus, à savoir la protéine *Vp*16PDF sauvage qui complémente à un niveau comparable à celui obtenu avec *Ec*PDF (Figure II-9A), ce résultat suggérait que cette chimère présentait une capacité de déformylation fortement diminuée *in vivo*.

Nous avons donc décidé de construire une deuxième chimère, où nous avons cette fois conservé les trois derniers résidus VTI de Vp16PDF, et ajouté la séquence C-terminale d'EcPDF en respectant exactement l'alignement de séquences (Figure II-6 et II-7A et B). Cette chimère, appelée Vp16PDF(VTI)hélice, possède alors la séquence complète de Vp16PDF additionnée en C-terminal de la séquence d'EcPDF allant du résidu M144 (situé au milieu de l'hélice $\eta3$) au

résidu terminal A169. Les expériences ont montré que cette chimère permettait la complémentation de la souche PAL421Tr (Figure II-9A), ce qui signifiait que cette chimère était capable, comme *Vp*16PDF ou *Ec*PDF sauvages, de déformyler des protéines *in vivo*.

Les résultats totalement opposés obtenus avec ces deux chimères nous ont conduits à regarder plus attentivement la séquence dans la région située autour de l'hélice $\eta 3$ d'*Ec*PDF. En alignant plusieurs séquences, et conformément à ce que nous avions déjà noté au Chapitre I (voir Figure I-1 et section A.1), nous avons remarqué que les résidus terminaux Thr et Ile de *Vp*16PDF sont plutôt inhabituels et qu'ils correspondent très généralement à des résidus Leu ou Met et Phe ou Tyr respectivement (Figure II-6).



Figure II-7: Structure du domaine C-terminal des versions chimériques de Vp16PDF. A) Protéines chimériques destinées à l'étude de l'impact de l'hélice α C-ter des PDF1B sur les propriétés de la protéine Vp16PDF. La numérotation des acides aminés correspond à la séquence d'EcPDF. B) Zoom sur la superposition des structures d'EcPDF et Vp16PDF au niveau du C-terminal. En bleu, structure du C-ter de Vp16PDF et les résidus C-terminaux associés. En marron, structure du C-ter d'EcPDF et les résidus C-terminaux associés. Les trois structures présentes à la droite correspondent aux C-ter des trois protéines chimères décrites. Les rectangles correspondent aux trois résidus de jonction entre la séquence de Vp16PDF et la séquence C-ter d'EcPDF.

Nous avons alors construit une dernière chimère, appelée Vp16PDF(VTF)hélice, dans laquelle nous avons remplacé le dernier résidu I137 de Vp16PDF par la séquence C-terminale d'*Ec*PDF à partir du résidu F143 (Figure II-7A et B). Cette chimère s'est montrée incapable de déformyler des protéines *in vivo* (Figure II-9A). La seule différence entre cette chimère et la précédente qui est active (Vp16PDF(VTI)hélice) étant le résidu I137 de Vp16PDF substitué par une Phe, ce résultat a mis en évidence le rôle crucial de ce résidu I137. Cependant, les tests d'activité *in vitro* sur extraits bruts ainsi que les tests de complémentation *in vivo* ne nous permettent pas de déterminer si ce résidu est impliqué dans l'interaction de l'enzyme avec le ribosome, et/ou dans l'activité catalytique. Des tests d'activité sur les protéines purifiées permettraient d'établir les constantes catalytiques des différentes chimères et ainsi déterminer si le résidu I137 possède un rôle dans la catalyse enzymatique. Des sédimentations en présence de ribosome détermineront si ce résidu est impliqué dans l'affinité de l'enzyme avec le ribosome.

En parallèle, des constructions de protéines mutantes d'*Ec*PDF ont également été réalisées afin de mimer la structure de *Vp*16PDF. Les résultats précédents ayant mis en évidence un rôle important des résidus VTI chez *Vp*16PDF, nous avons donc décidé dans un premier temps d'observer l'influence de ces résidus chez l'enzyme *Ec*PDF. Ainsi, nous avons construit un mutant d'*Ec*PDF au niveau du résidu F143, substitué par le résidu I137 de *Vp*16PDF, appelé *Ec*PDF(KLI). Un second mutant a également été construit, en remplaçant les résidus K₁₄₁L₁₄₂F₁₄₃ d'*Ec*PDF par les résidus V₁₃₅T₁₃₆I₁₃₇ de *Vp*16PDF appelé *Ec*PDF(VTI) (Figure II-8). Ces deux mutants permettront de déterminer l'influence de ces résidus dans l'activité catalytique et/ou l'interaction avec le ribosome. Dans un second temps, nous avons choisi d'étudier la forme courte d'*Ec*PDF, pour déterminer l'influence de l'hélice α dans l'interaction de l'enzyme avec le ribosome.



Figure II-8 : Protéines *Ec*PDF mutantes destinées à l'étude du rôle de l'hélice α C-ter. La numérotation des acides aminés est basée sur la séquence d'*Ec*PDF.

La construction de la forme courte d'*Ec*PDF, dépourvue de son extrémité C-terminale, a reposé sur des données biochimiques reliant l'activité de l'enzyme à la longueur de l'extrémité C-terminale ⁹². Si la délétion se fait après le résidu 145 (Figure II-8), la protéine conserve 100% de son activité, alors que si l'on tronque la protéine après le résidu 143, l'activité mesurée n'est que de 20%. Les délétions du domaine C-terminal ont donc été faites après le résidu 143 d'*Ec*PDF.

Le mutant $EcPDF(KLF)\Delta C$ -ter possède la séquence EcPDFwt mais avec une délétion du C-terminal, à partir du résidu 144. Le mutant $EcPDF(KLI)\Delta C$ -ter possède la séquence du mutant EcPDF(KLI) (variant 1 à 143) mais avec délétion du domaine C-ter à partir du résidu 144. Le mutant $EcPDF(VTI)\Delta C$ -ter possède la séquence du mutant EcPDF(VTI) mais avec délétion du domaine C-ter à partir du résidu 144 (Figure II-8). Ainsi, ces mutants vont permettre de comprendre le rôle que peut avoir l'hélice α dans l'affinité et la localisation des protéines au ribosome, ainsi que la fonction des résidus V₁₃₅T₁₃₆I₁₃₇ C-terminaux de *Vp*16PDF.

L'expérience de complémentation fonctionnelle a été réalisée avec les mutants d'*Ec*PDF chez qui j'ai testé les différentes délétions de l'extrémité C-terminale décrites ci-dessus (Figure II-9B). De manière surprenante, l'ensemble des constructions s'est avéré capable de complémenter la souche PAL421Tr, ce qui signifie que la délétion des hélices C-terminales d'*Ec*PDF n'affecte pas la capacité de déformylation de l'enzyme (Figure II-9B). De même, la substitution des résidus KLF par KLI et VTI, qu'ils soient avant l'hélice α C-terminale (dans les constructions *Ec*PDF(KLI) et *Ec*PDF(VTI)) ou directement en C-terminal (*Ec*PDF(KLI) Δ C-ter et *Ec*PDF(VTI) Δ C-ter) ne diminue pas la capacité des cellules à complémenter la PDF endogène (Figure II-9B). Les constructions étant fonctionnelles, nous pouvons supposer que les protéines sont solubles et correctement exprimées. Elles seront donc purifiées, et pourront servir d'outil pour observer l'interaction et la localisation au ribosome des PDFs mutantes. Nous déterminerons ainsi si l'absence de l'hélice α C-terminale modifie la capacité d'interaction de l'enzyme, et le rôle que peuvent avoir les résidus VTI (présents en C-terminal de *Vp*16PDF) dans ces interactions.



Figure II-9 : Déformylation in vivo des versions chimères de la protéine Vp16PDF (ajout d'hélice α en C-terminal) et des versions mutantes de la protéine EcPDF (suppression de l'hélice α en C-terminal) par un test de complémentation fonctionnelle. Des gouttes de dilutions successives de 10 en 10 prélevées sur une culture liquide poussée une nuit à 30°C sont déposées sur milieu gélosé. Les bactéries de la souche PAL421Tr contiennent le plasmide pMAK portant le gène codant EcPDF wt, et sont transformées avec un plasmide pBAD vide ou portant les gènes codant pour les protéines chimères et mutantes. A) Test de complémentation fonctionnelle réalisé sur les protéines Vp16PDF chimères. Les boîtes contenant 0,5% de glucose sont incubées une nuit à 30°C. Les boîtes contenant 0,5% de glucose et celles contenant l'arabinose sont incubées une nuit à 30°C. Le milieu gélosé contient toujours 50µg/mL d'ampicilline.

Afin de déterminer si le défaut de déformylation observé *in vivo* avec la chimère Vp16PDF(KLF)hélice pouvait avoir un lien avec une perte d'activité enzymatique, j'ai voulu tester l'activité déformylase*in vitro*de cette chimère, à comparer à celle des autres chimères qui, elles, complémentent. J'ai donc produit les différentes chimères en suivant le protocole utilisé pour l'expression de la protéine sauvage et sa purification sous forme active. Des aliquotes de cultures bactériennes ont alors été resuspendus dans un tampon 50 mM MES-KOH pH4,0 contenant 80 mM de nickel, tampon déterminé comme permettant le maintien de l'activité déformylase de <math>Vp16PDF (voir chapitre I). Il est à noter que les mutants d'*Ec*PDF étant fonctionnels *in vivo* (Figure II-9B), je n'ai pas testé leur activité *in vitro*.



Figure II-10: **Test d'expression des protéines** *Vp***16PDF chimériques**. Analyse sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. NI pour non-induit; I-ins pour fraction insoluble d'échantillon induit; I-sol pour fraction soluble d'échantillon induit. Les protéines chimères ont été produites selon le même protocole que celui utilisé pour la forme sauvage. Les constructions ne possèdent pas d'étiquette.

Le niveau d'expression et la solubilité des chimères se sont avérés comparables, si ce n'est supérieur, à ceux obtenus pour Vp16PDF sauvage (Figure II-10), et j'ai donc procédé à des mesures d'activité enzymatique des différentes chimères.

J'ai pour cela utilisé le test d'activité couplé qui m'avait préalablement servi à déterminer les constantes cinétiques de la protéine sauvage (voir Chapitre I). Avant de purifier les protéines recombinantes, j'ai commencé par tester l'activité enzymatique sur les fractions solubles des aliquotes préparés ci-dessus. Ces premiers résultats ont montré que les trois chimères ont une activité déformylase *in vitro* mesurable. Néanmoins, la chimère Vp16PDF(VTI)hélice semble légèrement plus active que <math>Vp16PDF wt tandis que les chimères Vp16PDF(KLF)hélice et <math>Vp16PDF(VTF) hélice ont une activité légèrement inférieure à celle de Vp16PDF wt (Figure II-11). Ces résultats préliminaires devront être confirmés en mesurant précisément l'activité enzymatique *in vitro* des protéines purifiées (y compris en regardant la spécificité de substrat des différentes chimères), mais il apparaît déjà que les variations d'activité semblent être corrélées avec les résultats obtenus par l'approche de complémentation, notamment une baisse d'activité enzymatique associée à une complémentation moins bonne (Tableau II-1).



Figure II-11: Test d'activité déformylase réalisé sur fractions solubles d'extraits bruts, exprimant Vp16PDF ou les protéines chimériques. Les activités de Vp16PDF, Vp16PDF(KLF)hélice, Vp16PDF(VTI)hélice et Vp16PDF(VTF) hélice sont exprimées par μ g de protéines totales dans l'extrait brut soluble.

Constructions	Complémentation fonctionnelle à 42°C	Activité in vitro
Vp16PDF	+++	+++
Vp16PDF(KLF)hélice	-	+
Vp16PDF(VTI)hélice	+++	++++
Vp16PDF(VTF)hélice	-	+

Tableau II-1 : Bilan de l'activité *in vivo* et *in vitro* des constructions de *Vp*16PDF sauvage et des différentes chimères.

L'ensemble de ces résultats indique que le simple ajout des hélices 3_{10} et α C-terminales d'*Ec*PDF à la déformylase de phage ne perturbe en rien son activité. En revanche, ils mettent en lumière le rôle crucial joué par le tout dernier résidu Ile137 dans l'activité de *Vp*16PDF. Il n'est toutefois pas exclu que cet acide aminé puisse également jouer un rôle dans la formation du complexe *Vp*16PDF:ribosome, ce qu'il faudra déterminer en testant la capacité des différentes chimères à former des complexes avec les ribosomes, comme j'ai pu le faire avec *Vp*16PDF sauvage.

D – L'affinité de Vp16PDF pour le ribosome semble être influencée par la longueur du polypeptide naissant

Après avoir montré que la PDF d'*E. coli* interagit avec des ribosomes vides ⁹¹, le groupe de Bernd Bukau a montré que la protéine est également capable d'interagir avec des ribosomes en cours de synthèse, plus précisément avec des ribosomes possédant une chaîne peptidique de 40 acides aminés fusionnée à une séquence d'arrêt appelée SecM ⁹⁴. Toutefois, la présence de cette chaîne naissante ne modifie pas l'affinité d'*Ec*PDF pour le ribosome ($K_d = 1,8 \pm 0,9 \mu M$), ce qui suggère un rôle passif du polypeptide naissant dans la formation du complexe PDF:ribosome ^{91,94}. Cependant, les expériences n'ayant été menées qu'avec une seule longueur de polypeptide, il serait nécessaire de tester d'autres longueurs de chaînes afin de déterminer clairement son rôle.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que V_p16PDF semble avoir un comportement différent d'*EcPDF vis-à-vis* de l'interaction avec le ribosome (voir parties précédentes). Nous nous sommes donc demandé quelle pouvait être l'influence de la chaîne peptidique dans la formation du complexe V_p16PDF :ribosome. Pour cela, j'ai produit des ribosomes bloqués en cours de traduction et regardé l'interaction avec V_p16PDF .

Les ribosomes bloqués (ou RNC pour « ribosome nascent chain ») ont été produits en utilisant comme matrice de départ un ADN contenant une séquence particulière en C-terminal, appelée séquence d'arrêt SecM, permettant de bloquer le ribosome en cours de synthèse. Chez E. coli, cette séquence fait naturellement partie d'un opéron secM-secA et permet de réguler l'expression de la protéine SecA via la protéine SecM, en réponse au statut de la cellule ²⁴⁰. Dans des conditions cellulaires normales, la séquence Shine-Dalgarno située en amont du gène secA est masquée dans une structure tige-boucle formée par l'ARNm, rendant impossible la fixation directe de ribosomes sur cette séquence, conduisant à la répression de l'expression de SecA (Figure II-12A). Il a été montré que lorsque le ribosome traduit l'ARNm de l'opéron secM-secA, il marque une pause en 3' de la séquence codante de secM, permettant la déstructuration de la tige-boucle, démasquant ainsi la séquence Shine-Dalgarno, ce qui permet la traduction de la séquence codante de secA située en aval. Ce processus conduit à un faible niveau basal de protéine SecA dans la cellule. La reprise de la traduction de la séquence codante de *secM* est induite par la prise en charge de l'extrémité N-terminale de la protéine SecM en cours de synthèse par une particule SRP, qui adresse le complexe ribosome:ARNm:SecM vers la membrane plasmique (Figure II-12A). SecM peut alors traverser la membrane plasmique grâce au translocon SecYEG, qui fonctionne de concert avec la protéine SecA (Figure II-12A);
par ce biais, la protéine SecA est synthétisée directement à proximité de la membrane plasmique, où elle exercera son rôle. Le ribosome se dissocie et la structure tige-boucle se reforme (Figure II-12A). Dans des cas de déficience en protéines de sécrétion, la pause du ribosome se prolonge, ce qui conduit à la surproduction de la protéine SecA (Figure II-12B).



Figure II-12 : Principe de fonctionnement de l'opéron *secM-secA*. A) Régulation de l'expression de SecA en conditions normales. L'opéron contient la séquence codante de SecM suivi de la séquence codante de SecA. Les deux séquences sont séparées par une structure tige-boucle de l'ARNm qui rend inaccessible la séquence Shine-Dalgarno (SD) qui précède le gène *secA*. Une séquence d'arrêt particulière bloque le ribosome à la fin de la séquence *secM*. Cela permet de déstabiliser la structure tige-boucle de l'ARNm et permet ainsi à d'autres ribosomes de venir traduire la séquence *secA* en se fixant directement à la séquence SD ainsi démasquée. Lors de la traduction de *secM*, le complexe ribosome:ARNm:SecM est adressé à la membrane par une particule SRP et le peptide naissant est pris en charge par le complexe SecA-SecYEG. L'interaction avec ces autres facteurs lève la pause du ribosome, aboutissant à la terminaison de la traduction du gène *secM*, suivi de la dissociation du ribosome. B) Régulation SecM-dépendante de l'expression de SecA dans des conditions déficientes en protéines de la vie de sécrétion. La pause au niveau de la séquence d'arrêt dure plus longtemps, permettant d'augmenter la quantité de protéine SecA synthétisée. Figure réalisée d'après Nakatogawa et Ito, 2004 ²⁴⁰.

Il a été montré que la pause du ribosome pendant la traduction de *secM* est induite par une séquence protéique de 17 acides aminés (F₁₅₀XXXXWIXXXXGIRAGP₁₆₆, Figure II-13A) située dans la région C-terminale de la protéine ²⁴¹. Lorsque ce motif dit « séquence d'arrêt » traverse le tunnel de sortie du ribosome, il est capable d'adopter une conformation compacte et d'interagir avec les composants du tunnel de sortie, au niveau d'une région appelée point de constriction (Figure i.3 et II-13B) ²³. Des interactions spécifiques avec les protéines ribosomales uL4 et uL22 ainsi que l'ARN 23S (Figure II-13B) modifient la conformation globale du ribosome ²⁵, qui fait alors une pause pendant la traduction. Bien que des expériences biochimiques et des données de cryo-microscopie électronique aient conduit à l'identification de certains résidus impliqués dans la reconnaissance de la séquence SecM, la voie entière d'interaction des résidus qui relient SecM au ribosome n'a pas encore été établie de façon concluante. Néanmoins, il semblerait que ce soit l'ARNt-P166 qui reste bloqué dans le site A du PTC (« peptidyl transferase center »), empêchant sa translocation vers le site P et retardant ainsi l'incorporation de la Pro166 après la Gly165 du polypeptide en cours de synthèse ^{24,242,243}. Cette séquence d'arrêt peut fonctionner de façon indépendante au reste de la séquence de SecM et peut donc être fusionnée à n'importe quelle protéine d'intérêt ²⁴¹. D'autres motifs riches en séquences XPPX, capables d'induire un blocage des ribosomes en cours de traduction plus au moins fort, ont été identifiés dans d'autres protéines ²⁴⁴. Cela permet de produire des ribosomes bloqués en cours de traduction, la longueur de la protéine produite étant modulable.



Figure II-13 : Séquence d'arrêt SecM et interaction avec l'ARNr et les protéines ribosomales. A) Séquence d'arrêt SecM. Les résidus conservés à travers les séquences SecM sont représentés en couleur. En rouge les résidus qui interagissent avec les protéines ribosomales, et en vert les résidus qui interagissent avec l'ARNr 23S. **B) Représentation d'une chaîne naissante avec séquence SecM dans le tunnel de sortie du peptide**. La séquence d'arrêt situé en C-terminal de SecM se compacte en créant des interactions avec le ribosome. *Droite* : zoom sur les interactions protéiques entre les résidus de la séquence SecM et les protéines ribosomales uL4 et uL22. Figures d'après Woolhead *et al*, 2006 et Fedyakina *et al*, 2011 ^{23,125}.

Dans le but d'étudier l'influence du polypeptide naissant dans la formation du complexe Vp16PDF:ribosome, la séquence d'arrêt SecM a été fusionnée en C-terminal de la protéine β -galactosidase d'*E. coli*. Cette protéine est substrat aussi bien de la PDF que de la MetAP et elle ne possède pas de signal d'adressage pouvant être clivé, le N-terminal est donc approprié pour notre étude. De plus, cette séquence possède plusieurs domaines, lui conférant ainsi la possibilité d'avoir des formes de repliements co-traductionnels intermédiaires. Enfin, toutes les méthionines sauf la méthionine initiatrice ont été substituées par mutagénèse dirigée, la séquence ne possède donc pas d'autres méthionines à part la méthionine initiatrice, ce qui est important pour déterminer le ratio de ribosome bloqués (voir Matériels et Méthodes).

Différentes constructions ont été réalisées et introduites dans un vecteur pET-22b(+), compatible avec le système de traduction *in vitro* utilisé. Ces constructions ont été pensées pour générer des RNC contenant des peptides naissants dont l'extrémité N-terminale reste confinée à l'intérieur du tunnel de sortie du ribosome, ou émerge à peine à la surface du ribosome, ou encore soit totalement à l'extérieur du ribosome. Etant connu que la longueur moyenne du tunnel de sortie du ribosome bactérien est d'environ 80-100Å ^{13,14}, qui correspond à un peptide naissant de 30 à 60 acides aminés (30 à 40 si le polypeptide adopte une conformation totalement étendue, 40 à 60 s'il se replie sous forme d'hélice α) ^{15–17}, et compte-tenu également que la séquence d'arrêt SecM contient 17 résidus, des fragments N-terminaux de β -galactosidase contenant les 3, 8, 18, 25, 36, 54, 78, 88 et 239 premiers résidus ont été fusionnés à la séquence d'arrêt SecM. Cela a donné les constructions notées SecMX où X comprend le fragment de la β -galactosidase suivi de la séquence SecM, soit SecM20, SecM25, SecM35, SecM42, SecM53, SecM71, SecM95, SecM105 et SecM256 (Figure II-14).



Figure II-14 : Représentation schématique de la séquence de la β -galactosidase et des différentes constructions disponibles. Les constructions comprennent la séquence de la β -galactosidase et la séquence de pause SecM.

Les ribosomes bloqués en cours de traduction ont été produits en faisant de la traduction *in vitro* à l'aide d'un kit commercial. Le plasmide pET-22b(+) contenant le gène codant l'une ou l'autre des constructions SecMX est ajouté dans le kit, qui contient tous les composants nécessaires pour les étapes de transcription et traduction (voir Matériels et Méthodes). A l'issue de la réaction, les ribosomes bloqués sont produits et peuvent être utilisés directement. Le rendement de production des ribosomes bloqués a été estimé au laboratoire en utilisant de la méthionine marquée à l'isotope ³⁵S (³⁵S-Met), ce qui a montré des différences importantes selon les constructions : obtention de 17%, 12%, 40%, 26%, 90%, 32%, 52%, 49% de RNC pour les constructions SecM20, 25, 35, 42, 53, 71, 95 et 105 respectivement après 150 min de réaction. J'ai choisi pour mes études de commencer à travailler avec les constructions SecM35 (40%) et SecM53 (90%).

J'ai alors procédé à des expériences de sédimentation *in vitro* afin de regarder l'affinité de Vp16PDF pour ces ribosomes, en utilisant le même protocole que précédemment (gamme de concentrations de ribosomes croissantes et concentration constante d'enzyme, voir section A). Comme pour les expériences précédentes réalisées avec des ribosomes vides, les mélanges réactionnels contenant les ribosomes bloqués et Vp16PDF ont été fractionnés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20% et le contenu des culots a été analysé par Western-blot suivi d'une immunodétection en utilisant des anticorps anti-Vp16PDF. Comme précédemment, une légère sédimentation de la protéine en absence de ribosome a pu être observée (Figure II-15A et B). Les expériences réalisées avec chacune des deux constructions SecM35 et SecM53 ont montré une interaction entre Vp16PDF et les ribosomes bloqués en cours de traduction, avec un signal bien plus fort pour SecM53 par rapport aux ribosomes vides ou bloqués avec la construction SecM35 (Figure II-15B), de façon reproductible.



Figure II-15: Interaction de *Vp*16PDF avec des ribosomes bloqués SecM35 et SecM53. A) Test de sédimentation entre *Vp*16PDF et 70S-SecM35. Gel représentatif des analyses sur gel SDS-PAGE puis Westernblot avec des anticorps anti-*Vp*16PDF. B) Test de sédimentation entre *Vp*16PDF et 70S-SecM53. Gel représentatif des analyses sur gel SDS-PAGE puis Westernblot avec des anticorps anti-*Vp*16PDF.

La quantification des bandes obtenues par Western-blot permet de regarder la proportion de protéine sédimentée en fonction de la concentration en ribosomes. A partir des différents tests de sédimentations réalisés, j'ai alors normalisé les résultats pour pouvoir comparer les données obtenues. J'ai pour cela représenté la quantité de Vp16PDF sédimentée sous forme de pourcentage en fonction de la concentration de ribosomes (Figure II-16). Les expériences de sédimentation ont alors été reproduites avec comme témoin constant 5µM de Vp16PDFsédimentée en présence de 2µM de ribosome et l'ensemble des valeurs de fluorescence de chacune des bandes a ensuite été exprimé en pourcentage à partir de cette référence 100%.

En comparant la proportion de *Vp*16PDF qui sédimente selon « l'état » du ribosome utilisé, nous observons que le profil de sédimentation de *Vp*16PDF est le même selon qu'elle co-sédimente en présence de ribosome 70S vides ou de ribosomes 70S-SecM35 (Figure II-16). C'est à partir de 1,5 μ M de ribosome que l'on observe une augmentation significative de la sédimentation. Néanmoins, ne pouvant excéder 2 μ M de ribosome dans ce test, les résultats ne nous permettent pas de visualiser un plateau maximum de sédimentation de PDF et le *K*_d ne peut donc pas être déterminé. On peut toutefois estimer une affinité apparente, avec un *K*_d supérieur ou égal à 2 μ M.

Les résultats concernant la co-sédimentation de *Vp*16PDF avec les ribosomes 70S-SecM53 sont quant à eux significativement différents. En effet, la quantification du signal de *Vp*16PDF indique qu'en présence de ces ribosomes, une quantité importante de PDF sédimente, quantité supérieure à celle observée lors de la sédimentation avec les autres constructions de ribosomes (Figure II-16). Nous pouvons observer qu'en présence de 0,5 μ M de ribosome, la quantité maximale de PDF sédimente, puisqu'en augmentant la gamme de concentration de ribosome jusqu'à 2 μ M, la quantité de *Vp*16PDF sédimentée reste la même. Le plateau étant apparemment atteint, le *K*_d est d'environ 0,25 μ M.



Figure II-16: Comparaison de la sédimentation de *Vp*16PDF en fonction de différentes constructions de ribosomes. Sédimentation de *Vp*16PDF selon qu'elle est incubée en présence de 70S vides, de 70S-SecM35 ou de 70S-SecM53. Les résultats sont exprimés en pourcentage de signal de *Vp*16PDF. On considère comme 100% le signal correspondant à la sédimentation de *Vp*16PDF en présence de 2 μ M de 70S-SecM53.

Conclusion

Je me suis intéressé dans ce chapitre à la capacité de Vp16PDF à interagir avec les ribosomes, et j'ai amorcé la caractérisation de cette interaction (affinité, protéines ribosomales et motifs de Vp16PDF impliqués). J'ai pu montrer que Vp16PDF interagit avec les ribosomes vides malgré l'absence d'hélice α en C-ter dû à une extrémité C-terminale très courte, avec une affinité dans la gamme du micromolaire. Cette donnée suggère que l'hélice α C-ter des PDFs de type 1B n'est pas le seul déterminant permettant aux PDFs d'interagir avec le ribosome, et permet de proposer que les autres types de déformylases (types 1A, 2 et 3) peuvent également interagir avec le ribosome. Les données issues des expériences de pontage chimique et d'analyse en spectrométrie de masse m'ont également permis d'observer que Vp16PDF pourrait posséder plusieurs sites de fixation au ribosome, localisés à proximité du tunnel de sortie du peptide. L'étude de l'interaction des protéines chimères et mutants d'*Ec*PDF nous permettra de savoir si l'hélice α (ou les résidus charnière VTI de Vp16PDF) jouent un rôle dans cette localisation.

Enfin, nous avons constaté que l'affinité de V_p 16PDF semblait plus importante pour le ribosome lorsque celui-ci avait synthétisé une chaîne peptidique de 53 acides aminés. Ces données suggèrent donc que l'affinité de V_p 16PDF pour le ribosome est fortement influencée par la longueur de la chaîne naissante qui devient un élément clé pour le recrutement de Vp16PDF au ribosome. Ainsi, ces données nous laissent supposer que la protéine Vp16PDFn'est peut-être pas présente sur le ribosome dès le début de la traduction, mais qu'elle intervient lorsque la chaîne émerge du tunnel de sortie du peptide. L'étude de l'interaction de Vp16PDFavec d'autres formes de ribosomes bloqués en cours de traduction nous permettra de déterminer le stade de la traduction le plus favorable à l'intervention de cette enzyme.

Chapitre III : Caractérisation de l'expression de Vp16PDF chez E. coli

Dans les chapitres précédents, j'ai pu montrer que Vp16PDF est capable de complémenter une souche bactérienne (PAL421Tr) déficiente pour le gène *def* endogène à des températures non permissives (42°C), confirmant une activité déformylase *in vivo* de cette protéine. Néanmoins, nous nous sommes aperçus que l'incubation des mêmes boîtes à 30°C induit une inhibition de la croissance bactérienne. Ces résultats inattendus, jamais observés avec aucune autre PDF, nous ont conduits à réaliser une caractérisation plus approfondie de cet effet inhibiteur associé à l'expression de Vp16PDF dans plusieurs souches bactériennes.

A – La surexpression de *Vp*16PDF dans *E. coli* inhibe la croissance bactérienne à basse température

A.1 – L'expression de Vp16PDF inhibe la croissance bactérienne

Comme observé précédemment dans les tests de complémentation de la souche PAL421Tr (voir Figure I-3 du Chapitre I), à 30°C et en présence de glucose, seule *Ec*PDF dont le gène est contenu dans le plasmide pMAK est exprimée et toutes les bactéries poussent de la même façon (Figure III-1A). De même, à 42°C et en présence d'arabinose, seules les bactéries exprimant une PDF fonctionnelle portée par le plasmide pBAD inductible à l'arabinose peuvent pousser, confirmant que *Vp*16PDF assure pleinement une activité peptide déformylase *in vivo* (Figure III-1B). Pourtant, nous avons constaté une inhibition de croissance de la souche PAL421Tr quand des boîtes identiques avaient été incubées à 30°C au lieu de 42°C. Cette inhibition augmente avec la concentration d'arabinose et se manifeste déjà à des concentrations très faibles (Figure III-1C).

Afin de mieux comprendre cet effet inhibiteur, les bactéries PAL421Tr ont ensuite été cultivées en milieu liquide contenant de l'arabinose, et incubées à 30°C. Le suivi de la croissance bactérienne au cours du temps a montré une inhibition significative après 2h de culture, suivi d'un arrêt quasi-total de la croissance à 7h de culture, uniquement en présence de Vp16PDF (Figure III-1D, courbe rouge à comparer au contrôle (courbe noire) dans lequel les bactéries expriment uniquement *Ec*PDF, codée à la fois par les plasmides pBAD et pMAK).

L'ensemble de ces résultats indique une inhibition de la croissance bactérienne induite par l'expression de *Vp*16PDF.



Figure III-1: Croissance bactérienne à 30°C et 42°C lors de l'expression de *Vp*16PDF dans la souche PAL421Tr. Des gouttes de dilutions successives de 10 en 10 prélevées sur une culture liquide poussée une nuit à 30°C sont déposées sur milieu gélosé. Les bactéries de la souche PAL421Tr contiennent le plasmide pMAK portant le gène codant *Ec*PDF wt, et sont transformées avec un plasmide pBAD vide ou portant les gènes codant *Ec*PDF ou *Vp*16PDF wt. A) Croissance sur milieu solide à 30°C avec ampicilline et 0,5% de glucose pour inhiber l'expression de la protéine codée par le pBAD. Seule *Ec*PDF, codée par le pMAK, est exprimée. Les boîtes sont incubées 20h. Ce contrôle permet de vérifier que la même quantité de cellules est déposée pour chacun des échantillons. B) Croissance sur milieu solide à 42°C avec ampicilline et une concentration croissante d'arabinose afin d'induire l'expression du gène porté par le plasmide pBAD. Les boîtes sont incubées 20h. C) Croissance sur milieu solide à 30°C avec ampicilline et des concentrations croissante d'arabinose pour l'expression de la protéine codée par le pBAD. Les boîtes sont incubées 20h. D) Croissance bactérienne en milieu liquide à 30°C. Utilisation de milieu LB avec 1% d'arabinose, pour l'expression de la protéine codée par le pBAD (indiqué sur les courbes). Les cellules expriment toutes *Ec*PDF codée par le pMAK.

A.2 – L'inhibition de la croissance bactérienne n'est pas due à une compétition entre *Vp*16PDF et *Ec*PDF mais dépend de la température

Suite aux résultats précédents et afin de déterminer si l'effet inhibiteur de la croissance observé chez les bactéries exprimant Vp16PDF serait dû à la co-expression avec EcPDF, j'ai réalisé un nouveau test de complémentation fonctionnelle en utilisant cette fois une souche de bactéries PAL421Tr ayant perdu le plasmide pMAK705 contenant le gène codant EcPDF après plusieurs cycles de repiquage des cellules à 42°C (souche appelée PAL421Tr Δ pMAK). Par conséquent, ces cellules n'expriment pas EcPDF mais uniquement Vp16PDF codée par le plasmide pBAD, quelle que soit la température d'incubation, dès lors que de l'arabinose est présent dans le milieu de culture. L'expérience a montré une inhibition très forte de la croissance bactérienne à 30°C, de même intensité que celle observée lorsque les deux protéines EcPDF et Vp16PDF sont exprimées simultanément (Figure III-2A panneau de droite, deux lignes du bas). Ces résultats signifient que l'effet inhibiteur sur la croissance n'est pas dû à une éventuelle compétition entre les deux déformylases mais uniquement à l'expression de Vp16PDF. Par ailleurs, cet effet est dépendant de la température puisqu'il est également observé à 25°C (Figure III-2A panneau de gauche), mais pas à 37 ou 42°C (Figure III-2B).

	2% Arabinose		
Plasmides présents dans les cellules			PDFs exprimées
	25°C	30°C	
pMAK705-EcPDF + pBAD vide			EcPDF
pMAK705-EcPDF + pBAD-EcPDF			EcPDF
pMAK705-EcPDF + pBAD-Vp16PDF		 O O 	EcPDF + Vp16PDF
pBAD-Vp16PDF		0 iv	Vp16PDF
			-
	37°C	42°C	
pMAK705-EcPDF + pBAD vide	000 -	0031	Pas de PDFs
pMAK705-EcPDF + pBAD-EcPDF	00008:		EcPDF
	the second se		

Figure III-2 : Test de croissance de bactéries *E. coli* sur milieu solide, exprimant soit *Vp*16PDF et *Ec*PDF simultanément, soit uniquement *Vp*16PDF, à différentes températures et en présence d'arabinose. A) A 25° C et 30° C, la souche PAL421Tr exprime le gène *Ec*PDF porté par le pMAK705-*Ec*PDF. La souche PAL421Tr Δ pMAK (dernière ligne pour chacune des boîtes) ne possède plus le pMAK705-*Ec*PDF, elle n'exprime donc pas *Ec*PDF mais uniquement *Vp*16PDF porté par le pBAD induit avec les 2% d'arabinose. B) A 37°C et 42°C le plasmide pMAK705-*Ec*PDF (thermosensible) n'est plus présent dans les cellules. Le gène porté par le pBAD est toujours induit par l'arabinose présent dans le milieu (2%). La souche PAL421Tr Δ pMAK (dernière ligne pour chacune des boîtes) ne possède plus le pMAK705-*Ec*PDF, elle n'exprime donc pas *Ec*PDF mais uniquement *Vp*16PDF porté par le pBAD.

00008;

Vp16PDF

A.3 – L'inhibition de croissance est indépendante du fond génétique des

bactéries

pBAD-Vp16PDF

Afin de vérifier si l'inhibition de croissance provoquée par Vp16PDF ne dépend pas du fond génétique de la souche bactérienne utilisée, nous avons choisi d'étudier la croissance d'autres souches d'*E. coli*. Les tests précédents ayant montré qu'il n'y avait pas de compétition entre *Ec*PDF et *Vp*16PDF, il n'était donc pas nécessaire d'utiliser des souches dont le gène de déformylase endogène a été délété, et l'expérience a donc simplement consisté à transformer de nouvelles souches bactériennes (MG1655, W3110, MC4100 et JM101Tr, voir Matériels et Méthodes tableau MM-1) avec le plasmide pBAD contenant le gène codant *Vp*16PDF. Les bactéries ont alors été cultivées à 30°C en utilisant un milieu LB contenant différentes concentrations d'arabinose. Comme observé dans la souche PAL421Tr, l'expression de la protéine *Vp*16PDF induit une inhibition de la croissance bactérienne de chacune des souches testées, effet d'autant plus marqué que la concentration en arabinose est forte (Figure III-3A). L'effet inhibiteur est là encore dépendant de la température puisqu'il n'est pas observé à 37°C (Figure III-3B). De même, l'inhibition de croissance provoquée par l'expression de *Vp*16PDF a pu être observée sur des cultures en milieu liquide pour les deux souches MG1655 et JM101Tr (Figure III-3C).



Figure III-3: Effet de l'expression de *Vp*16PDF sur la croissance cellulaire de différentes souches d'*E. coli* sauvages. A) Effet de l'expression de *Vp*16PDF à 30°C chez différentes souches d'*E. coli* : MG1655, W3110, Jm101Tr et MC4100. Les bactéries sont cultivées sur des milieux de culture solides (LB agar), avec ampicilline et différentes concentration d'arabinose (0,2% et 1%). B) La même expérience a été réalisée à 37°C avec les souches MG1655, W3110, Jm101Tr. C) Cinétique de croissance des souches MG1655 et Jm101Tr en milieu LB liquide avec 2% d'arabinose. Effet de l'expression de *Vp*16PDF à 30°C chez différentes souches *E. coli*, MG1655 et Jm101Tr en milieu liquide (LB) avec ampicilline et 1% d'arabinose.

A.4 – L'inhibition de la croissance bactérienne induite par l'expression de *Vp*16PDF nécessité une forme active de l'enzyme

L'ensemble des résultats précédents montre que Vp16PDF provoque un ralentissement significatif de la croissance bactérienne, et ce à basse température. De plus, l'inhibition est indépendante de la souche bactérienne utilisée et n'est pas la conséquence d'une compétition avec la PDF naturellement exprimée par la bactérie. Je me suis alors demandé si l'inhibition observée pouvait avoir un lien avec l'activité enzymatique peptide déformylase de Vp16PDF. J'ai pour cela effectué des tests de complémentation en utilisant deux mutants catalytiques de Vp16PDF, E128A et Q47K. J'ai choisi de muter les résidus E128 et Q47 car les résidus équivalents chez EcPDF (E133 et Q50) sont impliqués dans l'affinité pour le substrat et dans le mécanisme catalytique de déformylation^{130,180,190} (voir Introduction Figure i.22). En effet le mutant E133A d'*Ec*PDF est inactif *in vivo* (il ne complémente pas à 42°C) et *in vitro* ($K_m =$ 0,011 mM vs 6,2 mM pour la wt; activité relative k_{cat}/K_m inférieure à 0,5% de l'activité obtenue avec EcPDF sauvage) 130, de même que le mutant Q50A d'EcPDF dont les paramètres cinétiques indiquent clairement une perte d'efficacité catalytique mais dont l'affinité pour le substrat est inaltérée ¹³⁰. Afin de vérifier que les mutations E128A et O47K introduites dans Vp16PDF provoquent bien une inactivation de la protéine, le test de complémentation fonctionnelle a d'abord été effectué à 42°C. Comme attendu par homologie avec EcPDF, chacune des deux mutations inactive la fonction peptide déformylase de Vp16PDF, l'empêchant de complémenter les bactéries PAL421Tr (Figure III-4 à 42°C). En revanche, lorsque le test est réalisé à 30°C, les bactéries possédant les versions mutées de Vp16PDF ont une croissance normale et équivalente à celle des bactéries exprimant *EcPDF* sauvage (aucun effet inhibiteur n'est observé, voir Figure III-4 à 30°C). Cela signifie que l'effet inhibiteur de Vp16PDF sur la croissance des bactéries est lié à l'activité enzymatique de la protéine, c'est-à-dire à sa fonction de déformylation des protéines d'E. coli en cours de synthèse.



Figure III-4: Influence de l'activité deformylase de *Vp***16PDF sur la croissance des bactéries** PAL421Tr. A 42°C, seule la déformylase codée par le pBAD est exprimée. A 30°C, les cellules expriment la déformylase codée par le pBAD, ainsi que la déformylase endogène d'*E. coli* codée par le pMAK705.

A.5 L'isoleucine terminale de *Vp*16PDF joue un rôle crucial dans l'effet inhibiteur exercé par l'expression de la protéine

Etant donné qu'une des différences majeures entre Vp16PDF et EcPDF réside à l'extrémité C-terminale de ces deux protéines, nous avons décidé d'évaluer la possibilité que cette région (incluant l'hélice α Cter) ait un impact sur l'effet inhibiteur de la protéine Vp16PDF à des températures inférieures à 30°C. Ainsi, dans le but d'identifier les déterminants responsables de l'effet inhibiteur de Vp16PDF, nous avons d'abord analysé l'effet à 30°C des versions chimériques de Vp16PDF, qui possèdent à leur extrémité C-terminale différents fragments issus de l'hélice α C-terminale d'EcPDF, (chimères précédemment utilisées pour les tests de complémentation fonctionnelle, voir chapitre II section C.1 et Figure II-7).

Comme attendu, Vp16PDF wt inhibe la croissance bactérienne à 30°C (Figure III-5). Au contraire, la chimère Vp16PDF(KLF)hélice ne provoque pas d'inhibition de croissance (Figure III-5). Or, j'ai montré que cette chimère est très peu active *in vivo* (voir Chapitre II Figure II-10A), ce qui signifie qu'elle n'est pas capable d'exercer pleinement son activité déformylase. Cela peut être dû à un défaut d'activité enzymatique et/ou une incapacité de se lier au ribosome, hypothèses qui seront testées en purifiant la protéine recombinante. Les cellules exprimant la chimère Vp16PDF(VTI)hélice ne montrent pas non plus d'inhibition de croissance en présence d'arabinose à 0,2%, et une légère inhibition pour des concentrations en arabinose plus élevées, comparable à celle observée avec Vp16PDF(KLF)hélice (Figure III-5). Cependant, d'après les tests préliminaires d'activité et de complémentation fonctionnelle, cette protéine est très active (voir Chapitre II Figure II-10A). Il semble donc que l'ajout de l'hélice α en C-terminal, sans modification des trois derniers résidus VTI de la protéine, supprime l'effet inhibiteur de croissance provoqué par Vp16PDF. Enfin, les cellules exprimant Vp16PDF(VTF)hélice ont une croissance inhibée, le phénotype n'étant pas drastique mais intermédiaire entre celui observé pour Vp16PDF wt et les deux autres chimères (Figure III-5). L'inhibition est d'autant plus forte que la concentration en arabinose augmente et donc la quantité de protéine chimère exprimée (Figure III-5).



Figure III-5: Test de croissance de bactéries exprimant les protéines peptides déformylases chimères sur milieu solide à 30°C. Les boîtes sont supplémentées soit en glucose (pour ne pas exprimer le gène du pBAD) soit avec différentes concentrations d'arabinose (pour exprimer le gène du pBAD). Elles sont incubées 24h à 30°C. La souche utilisée est Jm101Tr.

D'après mes résultats, la présence de l'hélice $\alpha 3$ d'*Ec*PDF à l'extrémité C-terminale de *Vp*16PDF constitue un élément essentiel dans l'effet inhibiteur de la protéine *Vp*16PDF. En effet, la présence de l'hélice $\alpha 3$ d'*Ec*PDF à l'extrémité C-terminale de *Vp*16PDF n'altère pas l'activité déformylase *in vivo* et *in vitro* mais supprime de façon drastique l'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne à 30°C.

L'effet inhibiteur est également aboli avec les chimères Vp16PDF(KLF)hélice et Vp16PDF(VTF)hélice. Néanmoins, l'absence de complémentation fonctionnelle *in vivo* et la faible activité *in vitro*, observées avec ces deux dernières chimères, nous laissent suggérer que l'absence d'inhibition à 30°C est reliée à une baisse d'activité déformylase des deux chimères reproduisant la situation déjà observée avec les mutants E128A et Q47K. Si c'est le cas, les trois derniers résidus $V_{135}T_{136}I_{137}$ de Vp16PDF seraient des éléments déterminants pour l'activité enzymatique de la protéine. En effet, si nos données enzymatiques sont confirmées, cela impliquera que la substitution des résidus VTI en résidus KLF diminue fortement l'activité et la complémentation à 42°C, mais n'inhibe pas la croissance bactérienne (comparer les chimères Vp16PDF(KLF)hélice et Vp16PDF(VTI)hélice, Tableau III-1). Par ailleurs, la simple substitution de l'I137 en Phe suffit à diminuer fortement l'activité (comparer les chimères Vp16PDF(VTF)hélice et Vp16PDF(VTI)hélice, Tableau III-1).

Cependant, la présence de la séquence VTI et l'absence de l'hélice $\alpha 3$ sont des conditions nécessaires mais pas suffisantes pour transposer l'effet inhibiteur à toute autre PDFs. En effet, les versions chimériques d'*Ec*PDF, construites pour mimer *Vp*16PDF (Chapitre II Figure II-9), ne provoquent aucune inhibition de croissance. Ainsi, bien que les différents chimères soient fonctionnellement actives (Chapitre II), ni la délétion des hélices $\eta 3$ et $\alpha 3$ d'*Ec*PDF, ni la mutation des résidus KLF en VTI, ne provoquent une inhibition de croissance (Figure III-6).

Construction	Complémentation fonctionnelle (42°C)	Activité in vitro	Croissance à 30°C
Vp16PDF	+++	+++	
Vp16PDF(KLF)hélice	+	+	+++
Vp16PDF(VTI)hélice	+++	+++	+++
Vp16PDF(VTF)hélice	-	+	+



Figure III-6 : Test de croissance à 30°C des bactéries PAL421Tr transformées avec des versions mutées d'*EcPDF* au niveau de la région C-terminale. Les gouttes de cultures de dilutions successives au dixième sont déposées sur boîte LB agar supplémentée avec 1% d'arabinose pour l'expression des protéines. L'incubation des boîtes est faite à 30°C durant 17h.

L'ensemble combiné de ces résultats met en lumière le lien entre les différentes particularités structurales de Vp16PDF et les conséquences de son expression dans une bactérie à des températures inférieures à 30°C. En particulier, l'extrémité C-terminale très courte est directement responsable de l'inhibition de la croissance bactérienne par la protéine Vp16PDF, vraisemblablement *via* un mode de fixation au ribosome différent de celui de la protéine d'*E*. *coli*. En effet, l'ajout à l'extrémité C-terminale de Vp16PDF de l'hélice $\alpha 3$ d'*Ec*PDF n'altère

pas l'activité déformylase de la protéine mais suffit à restaurer la croissance bactérienne. Néanmoins, d'autres facteurs spécifiques de la protéine Vp16PDF, non encore identifiés, semblent être nécessaires pour pouvoir reproduire l'effet inhibiteur dans d'autres PDFs.

B – La surexpression de *Vp*16PDF dans *E. coli* perturbe l'intégrité de l'enveloppe bactérienne

B.1 – L'expression de Vp16PDF altère la structure de l'enveloppe

bactérienne

Après avoir observé les cinétiques de croissance des bactéries exprimant Vp16PDF et remarqué une mort cellulaire précoce à 30°C (voir ci-dessus), nous avons décidé d'observer l'apparence des cellules afin de voir s'il était possible de déceler des particularités phénotypiques permettant de nous éclairer sur les conséquences physiologiques de l'expression de Vp16PDF. Ainsi, des bactéries de la souche JM101Tr ont été transformées avec le plasmide pBAD contenant le gène codant *Ec*PDF ou *Vp*16PDF et mises en culture liquide à 30°C en présence d'arabinose. Des aliquotes ont alors été prélevés à 5h et à 24h de culture (Figure III-1D) et traités avec du iodure de propidium (IP), un agent intercalant utilisé comme marqueur de la viabilité cellulaire. En effet, à cause de sa lipophobie élevée, l'IP ne peut pénétrer dans les cellules viables possédant une bonne intégrité membranaire. L'observation des échantillons au microscope photonique a montré que les cellules exprimant Vp16PDF sont moins nombreuses que celles exprimant EcPDF et qu'une forte proportion semble lysée (Figure III-5A), conduisant à une forte mortalité cellulaire (Figure III-5B). De plus, l'observation des mêmes échantillons (après 5h de culture) en microscopie électronique à transmission a montré que les bactéries exprimant Vp16PDF ont un aspect anormal, déformé, notamment au niveau de l'enveloppe bactérienne (Figure III-5C, panneaux de gauche). En effet, les trois structures de l'enveloppe bactérienne (membrane externe, périplasme et membrane interne) sont bien visibles et différenciées dans les cellules contrôles, mais sont confondues dans les cellules exprimant la protéine Vp16PDF (Figure III-5C, panneaux de droite).



Figure III-5: Taux de mortalité et aspect des cellules bactériennes (Jm101Tr) exprimant soit *Ec*PDF soit *Vp*16PDF à 30°C, en milieu liquide LB, avec 2% d'arabinose. A) Observation des cellules bactériennes au microscope photonique, exprimant *Ec*PDF ou *Vp*16PDF, après 5h et 24h de culture. B) Taux de mortalité des cellules après 5h et 24h de culture. C) Observation au microscope électronique à transmission des cellules après 5h de culture. A 30°C les cellules expriment toutes *Ec*PDF codée par le pMAK. En présence d'arabinose, les cellules expriment le gène *Ec*PDF ou *Vp*16PDF porté par le pBAD.

B.2 – L'expression de *Vp*16PDF accroît la sensibilité à l'action bactériolytique de détergents et antibiotiques

Les bactéries ayant une enveloppe altérée peuvent présenter des phénotypes de sensibilité accrue à différentes molécules comme les détergents et les antibiotiques. Afin de confirmer l'altération de l'enveloppe de la bactérie *E. coli* induite par *Vp*16PDF, nous avons donc choisi de tester l'effet d'un détergent (SDS) et d'un antibiotique (vancomycine) sur la croissance des bactéries JM101Tr exprimant la protéine. Le SDS est un détergent anionique puissant qui a un effet dénaturant sur les membranes ²⁴⁵, via la dénaturation des protéines membranaires hydrophobes. Toutefois, à basse concentration, la croissance de bactéries sauvages n'est que peu affectée par le SDS, au contraire des bactéries dont la paroi est altérée. La vancomycine est un antibiotique qui inhibe la synthèse du peptidoglycane des bactéries à

Gram positif. Elle n'a aucun effet sur les bactéries à Gram négatif dont le peptidoglycane est plus fin et présent dans l'espace périplasmique; elle est en outre trop grosse pour passer à travers les porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

Des tests sur milieu gélosé supplémenté en arabinose et SDS ou vancomycine ont été effectués. Les expériences ont été réalisées à 30°C et 37°C. Comme attendu, en absence de SDS ou vancomycine, toutes les bactéries poussent normalement à 37°C, indépendamment du gène porté par le pBAD, car aucune inhibition induite par Vp16PDF wt n'est observée à cette température sur milieu solide (Figure III-6, panneaux de gauche). En revanche, en présence de SDS ou de vancomycine faiblement concentrés, la croissance des bactéries exprimant la forme active de V_p 16PDF est inhibée alors que les bactéries exprimant EcPDF ou les formes inactives de Vp16PDF (mutants E128A et Q47K, voir Figure III-4) ne sont pas affectées (Figure III-6). Cela signifie que l'expression de Vp16PDF wt induit un phénotype de sensibilité au SDS ou à la vancomycine, ce qui confirme que l'intégrité de la membrane externe est altérée suite à l'expression de cette protéine. Notons également que seule la forme active de Vp16PDF induit ce défaut de croissance, indiquant encore une fois que le phénotype est lié à l'activité enzymatique de la protéine. Les mêmes effets mais plus intenses ont été obtenus à 30°C (données non montrées). Ainsi, l'effet de la vancomycine pourrait indiquer une altération de la structure des porines de la membrane externe des bactéries, lui permettant alors de pénétrer dans l'espace périplasmique et ainsi dégrader le peptidoglycane, conduisant à l'éclatement des bactéries par choc osmotique.



Figure III-6: Effet d'un détergent et d'un antibiotique sur la croissance de bactéries Jm101Tr qui expriment *Vp*16PDF. A) Effet du SDS sur la croissance des bactéries JM101Tr exprimant *Vp*16PDF (induction de la protéine avec 0,2% arabinose à 37°C). B) Effet de la vancomycine sur la croissance des bactéries JM101tr exprimant *Vp*16PDF (induction de la protéine avec 0,2% arabinose à 37°C).

C – L'expression de *Vp*16PDF interfère avec le repliement *de novo* des protéines

L'expression de la protéine Vp16PDF mime les phénotypes observés dans les cellules bactériennes qui ont perdu la chaperonne Trigger Factor (TF). En effet le mutant Δtig manifeste aussi un défaut de croissance à 30°C²⁴⁶. Le fait qu'aucun phénotype ne soit visible à des températures plus élevées dans le mutant Δtig a été expliqué par l'expression induite en réponse à des stress, notamment thermiques, d'autres « heat shock proteins » (Hsp) qui ne rendent plus le TF essentiel ²⁴⁶. De plus, le mutant Δtig manifeste également une susceptibilité accrue au SDS et à la vancomycine, due à une diminution des protéines OMPs (« Outer Membrane Proteins »)^{105,247}. En effet, le TF a été montré comme jouant un rôle crucial dans la biogenèse des OMPs. Cela nous a amenés à suggérer que l'expression de Vp16PDF pourrait provoquer des défauts dans la biogenèse des OMPs, y compris les porines. Notons également que le phénotype induit par l'expression de Vp16PDF a aussi été observé pour des mutants d'E. coli dans les gènes Sec qui constituent les principaux processus de transport des protéines de la membrane dans les bactéries ^{248,249}. De manière intéressante, nous avons constaté que les cellules exprimant Vp16PDF étaient sensibles aux inhibiteurs de SecA (Figure III-7) et la protéine induit la formation d'agrégats intracellulaires (voir paragraphe suivant), suggérant que Vp16PDF pourrait également interférer avec la translocation des protéines via la voie Sec.



Figure III-7 : Croissance bactérienne en présence de NaN₃. L'azide de sodium est un inhibiteur de la voie Sec. Souche Jm101Tr, induction des protéines avec arabinose, croissance à 37°C.

Chez les bactéries, le repliement de la majorité des protéines nouvellement synthétisées est assuré par le trigger factor (TF) et une proportion non négligeable de protéines (~30%) nécessite ensuite l'intervention d'autres chaperons moléculaires (DnaK/DnaJ et/ou GroEL/GroES) (Figure III-8A). Ces voies ne sont pas indépendantes mais au contraire étroitement liées, avec l'existence d'autres voies connectées incluant la voie SecA/SecB (Figure III-8B). Ainsi, une bactérie déficiente en l'un ou l'autre de ces facteurs met en place des voies de contournement afin de pouvoir assurer malgré tout le repliement des protéines naissantes ²⁴⁶.



Figure III-8 : Les différentes voies métaboliques impliquées dans le repliement et l'adressage des protéines chez la bactérie. A) Facteurs impliqués dans le repliement des protéines. Le TF est la première enzyme à intervenir, ensuite le système GroES/EL et/ou le système des Hsp70 DnaK/J permettent le repliement des protéines *de novo*, ou en condition de stress. D'après Pechmann *et al*, 2013 ²⁵⁰. **B**) Rôles des différentes voies de chaperons moléculaires dans le repliement et l'adressage des protéines. La synthèse de protéines *de novo* (au centre), la voie cytosolique (à droite), la voie Sec (en bas), la voie TAT (en haut), et l'adressage à la membrane via un peptide signal en C-ter (à gauche). Les abréviations pour les chaperons sont : Trigger factor (TF), DnaK/DnaJ/DnaE (KJE), GroES/GroEL (ESL), Sec A (A), SecB (B) et les protéines de maturation redox (REMPs) ; IM signifie membrane interne. Une flèche verte indique une implication prouvée, une flèche noire remplie indique une interaction démontrée et une flèche en pointillée une interaction possible. D'après Castanié-Cornet *et al*, 2014 ²⁴⁶.

A la lumière de toutes ces données, nous avons émis l'hypothèse que V_p16PDF pourrait perturber le repliement et/ou l'adressage co-traductionnel des protéines à la membrane, ce qui est cohérent avec les expériences de pontage chimique entre V_p16PDF et le ribosome qui ont montré que cette déformylase atypique pourrait interagir avec le ribosome, à proximité du tunnel de sortie du peptide (Chapitre II Figure II-4) au niveau des zones d'interaction du TF (protéines ribosomales uL23, uL24 et uL29) et de SecA (protéines ribosomales uL22, uL23 et uL24. J'ai ainsi cherché à comprendre le possible dialogue entre V_p16PDF , TF, SecA et d'autres possibles facteurs co-traductionnelles impliqués dans le repliement et translocation des chaînes naissantes.

Nous avons alors choisi d'étudier l'influence de Vp16PDF dans plusieurs contextes mutants. Nous avons choisi des mutants de chaperons moléculaires fournis par l'équipe de Pierre Genevaux, en l'occurrence un mutant KO dans le gène codant pour le chaperon Trigger Factor (mutant Δtig), un mutant KO dans le gène codant pour la protéine d'adressage SecB (mutant $\Delta secB$) et un double mutant KO dans les gènes TF et SecB (mutant $\Delta tig/\Delta secB$) (voir les caractéristiques de ces souches, toutes dérivées de la souche sauvage MG1655, dans le chapitre Matériels et Méthodes). Ces mutants sont viables car le repliement des protéines en cours de synthèse est assuré par différents facteurs plus ou moins interchangeables et les bactéries peuvent donc s'adapter sans trop de désordres métaboliques ²⁴⁶. J'ai utilisé ces souches mutantes pour exprimer Vp16PDF (gène codant porté par le plasmide pBAD) en présence d'arabinose. J'ai alors regardé l'effet de l'expression de Vp16PDF sur la croissance des souches mutantes, ainsi que l'accumulation d'agrégats dans ces contextes mutants (voir paragraphe suivant).

L'expérience a confirmé que l'expression de Vp16PDF provoque l'inhibition de la croissance bactérienne de la souche MG1655 sauvage (Figure III-9A panneau « wt »), comme cela avait déjà été observé (voir Figure III-1 et III-3). De manière intéressante, nous avons observé que la délétion du gène codant TF (Δtig) ou SecB ($\Delta secB$) a considérablement aggravé la toxicité exercée par l'expression de Vp16PDF, l'inhibition ayant été observée sur milieu solide (Figure III-9A) et en cultures liquides (Figure III-9B). En revanche, l'effet inhibiteur sur milieu solide est nettement moins prononcé chez le double mutant $\Delta tig/\Delta secB$ (Figure III-9A), et inexistant dans les conditions expérimentales testées en culture liquide (Figure III-9B). De plus, la surexpression de TF ou SecB dans les souches $\Delta secB$ et Δtig , respectivement, supprime l'effet inhibiteur de Vp16PDF (Figure III-9C).



Figure III-9 : Caractérisation préliminaire *in vivo* de l'effet bactéricide induit par *Vp*16PDF. A) Test de croissance sur milieu solide de la souche MG1655. Des gouttes de culture bactérienne avec dilutions successives au dixième sont déposées sur boîtes LB agar, supplémentées avec 0,35% d'arabinose pour l'expression des gènes présents dans le pBAD. B) Test de croissance en milieu liquide de la souche MG1655. Culture en milieu LB supplémenté avec 2% d'arabinose, incubée à 28°C. En bleu : bactéries avec plasmide vide ; en orange : bactéries exprimant *Ec*PDF ; en gris : bactéries exprimant *Vp*16PDF. C) Utilisation de la souche MG1655 transformée avec un plasmide pBAD inductible à l'arabinose, permettant l'expression de *Ec*PDF ou *Vp*16PDF et avec un plasmide p29SEN inductible à l'IPTG, permettant l'expression de *Ec*CTF ou *Ec*SecB.

Ces résultats suggèrent que l'expression de Vp16 PDF interfère préférentiellement avec la voie SecB/TF. Le fait que le double mutant $\Delta tig/\Delta secB$, démontré précédemment comme adressant les pré-protéines *via* un mode de translocation co-traductionnelle plus spécifique et indépendante de SecB ^{105,248,251}, est moins sensible à l'expression de *Vp*16PDF que les deux simples mutants suggère encore plus que *Vp*16PDF interfère en effet avec la voie Sec.

D – L'expression de Vp16PDF dans E. coli conduit à l'accumulation d'agrégats

Des travaux antérieurs ont montré que des mutations dans le gène codant SecB induisent l'accumulation de protéines de la voie de sécrétion dans des agrégats cytosoliques ^{248,252}. Dans le but de mieux comprendre les dommages causés par Vp16PDF j'ai donc décidé d'analyser l'agrégation des protéines en réponse à son expression.

Des bactéries *E. coli* W3110 transformées avec le plasmide pBAD contenant le gène codant *Ec*PDF ou *Vp*16PDF ont été mises en culture liquide dans un milieu supplémenté en arabinose et incubées à 30°C (voir Matériels et Méthodes). Dans ces conditions, l'expression de l'une ou l'autre des deux PDFs est induite, et la croissance bactérienne inhibée en réponse à l'expression de *Vp*16PDF (voir Figure III-1B et C). D'autre part, les cultures ont été arrêtées à une DO⁶⁰⁰ égale à 1, c'est-à-dire avant que l'inhibition de croissance ne soit visible (voir Figure III-1D), puis les agrégats protéiques extraits (voir Matériels et Méthodes). L'analyse des surnageants de lyse ou des fractions insolubles a montré des profils électrophorétiques équivalents pour des bactéries ayant exprimé *Ec*PDF ou *Vp*16PDF, similaires à celui obtenu avec des bactéries n'ayant surexprimé aucune protéine (Figure III-10). Cela indique que l'accumulation des profils électrophorétiques a révélé que les bactéries exprimant *Vp*16PDF montrent un pattern de ces agrégats différent de celui surexprimant *Ec*PDF ou le plasmide vide (Figure III-10).



Figure III-10 : Analyse du profil électrophorétique des fractions solubles, insolubles et des agrégats obtenus à partir de cellules exprimant *Vp*16PDF à 30°C. Analyse sur gel SDS-PAGE 14%. La souche utilisée est W3110, mise en culture jusqu'à une $DO^{600} = 1$ en présence d'arabinose 2% pour exprimer le gène présent dans le pBAD.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec la souche MG1655 (Figure III-11A et B). Une analyse quantitative du gel (voir Matériels & Méthodes) a ensuite été réalisée pour affiner ces observations. L'apparition d'un plus grand nombre de pics a confirmé la présence de nombreuses protéines, potentiellement nouvelles, agrégées en réponse à l'expression de <Vp16PDF (Figure III-11C, panneau du bas à comparer aux panneaux du haut et du milieu). Par ailleurs, l'accumulation d'agrégats semble toucher des protéines de tous poids moléculaires, avec toutefois une accumulation sensiblement plus marquée pour des tailles inférieures à 40 kDa environ. Enfin, les cellules exprimant *Ec*PDF contiennent, comme celles n'exprimant aucune PDF, des protéines agrégées dont la grande majorité des bandes protéiques ne dépasse pas une intensité supérieure à 7500 u.a (Figure III-11C). Seuls trois pics de protéines dépassent cette valeur, pour atteindre une intensité comprise entre 30000 et 45000 u.a. Les cellules ayant exprimé Vp16PDF présentent quant à elles des bandes protéiques dont l'intensité est supérieure à 7500 u.a, atteignant pour un grand nombre d'entre elles une valeur supérieure à 15000 u.a (Figure III-11C).



Figure III-11 : Analyse sur gel SDS-PAGE coloré au Sypro du contenu des agrégats de cellules MG1655 exprimant *Ec*PDF ou *Vp*16PDF, cultivées en milieu liquide à 30°C avec 2% d'arabinose. A) Profil électrophorétique des échantillons du surnageant de lyse. Un même volume d'échantillon est déposé dans chaque puits (expérience permettant de vérifier que l'on va extraire les agrégats à partir d'une même quantité de cellules). B) Profil électrophorétique des échantillons d'agrégats. C) Quantification des bandes protéiques observées sur le gel SDS-PAGE 14% des agrégats. Les bandes bleu et rouge servent de repères: la bande bleue correspond à une intensité de 7500 u.a et la bande rouge à une intensité de 20000 u.a.

J'ai par la suite analysé les agrégats produits en réponse à l'expression de Vp16PDF, dans chacune des souches mutants MG1655 testées précédemment (*i.e.*, Δtig , $\Delta secB$ et $\Delta tig/\Delta secB$). En absence de toute expression de PDF (bactéries transformées avec le plasmide pBAD vide), nous avons confirmé que les bactéries $\Delta secB$ contiennent naturellement plus d'agrégats protéiques que les bactéries MG1655 wt (Figure III-12, voir les gels ainsi que leur quantification), ce qui est la conséquence directe de la mutation. Au contraire, les bactéries Δtig montrent un profil électrophorétique d'agrégats relativement similaire à celui observé dans les cellules sauvages (Figure III-12). Nos résultats montrent également que la surexpression de Vp16PDF augmente considérablement l'accumulation d'agrégats de protéines dans le mutant $\Delta secB$ par rapport à la souche de type sauvage, reflétant peut-être la synergie *in vivo* décrite cidessus. Enfin, l'accumulation d'agrégats est nettement moindre dans le mutant $\Delta tig/\Delta secB$ et comparable à celle observée dans les cellules exprimant le plasmide vide ou la PDF d'*E. coli* (voir Figure III-12) en accord avec la suppression de l'effet toxique de l'expression de Vp16PDF dans cette souche $\Delta tig/\Delta secB$.

Les résultats obtenus jusqu'ici ne nous permettent pas de déterminer la nature des protéines présentes dans les agrégats. Une analyse par spectrométrie de masse devrait nous permettre d'identifier précisément les protéines agrégées et de déterminer si les défauts de synthèse protéique touchent toutes les protéines, ou seulement certaines espèces protéiques, comme des protéines membranaires, ce que l'on peut supposer. J'ai préparé les échantillons sur les agrégats provenant de la souche sauvage, en vue de réaliser prochainement l'analyse par spectrométrie de masse.

Conclusion:

Dans ce chapitre, j'ai montré que l'expression de *Vp*16PDF provoque à basse température ($\leq 30^{\circ}$ C) une inhibition de la croissance cellulaire. Les cellules ont un taux de mortalité supérieur à celui des contrôles, et montrent une altération de la paroi. De plus les cellules accumulent une plus grande quantité de protéines dans les agrégats. L'ensemble des études réalisées, incluant aussi les mutants des protéines TF et SecB, nous suggèrent que l'expression de la protéine active *Vp*16PDF interfère préférentiellement avec la voie engageant SecB et TF. Enfin, il apparaît que si l'on ajoute l'hélice α C-terminale d'*Ec*PDF à *Vp*16PDF, le phénotype d'inhibition de croissance à 30°C n'est plus observable.



Figure III-12 : Analyse sur gel SDS-PAGE 14% coloré au Sypro du contenu des agrégats extraits de cellules MG1655 sauvage et mutantes, exprimant *Ec*PDF ou *Vp*16PDF, cultivées en milieu liquide à 30°C avec 2% d'arabinose. Les souches mutantes Δtig , $\Delta secB$ et $\Delta tig/\Delta secB$ sont dérivées de la souche MG1655 wt. Le profil électrophorétique des échantillons d'agrégats est représenté à gauche, la quantification des bandes protéiques observées sur le gel SDS-PAGE des agrégats à droite. Les bandes bleu et rouge servent de repères: la bande bleue correspond à une intensité de 7500 a.u. et la bande rouge à une intensité de 20000 a.u. .

L'existence des peptide déformylases (PDFs) a été prouvée dans les années 1960, par la mise en évidence de la réaction de déformylation de la méthionine initiatrice chez les bactéries ¹⁸⁶, mais ce n'est que dans les années 1990 que ces enzymes ont pu être purifiées et caractérisées ²²⁹. Jusqu'au début des années 2000, il était admis que seules les bactéries possédaient des peptides déformylases, mais il a ensuite été démontré qu'elles étaient également présentes dans les organites (chloroplastes et mitochondries) des cellules eucaryotes ²²⁵. Leur caractère essentiel a alors été démontré chez tous ces organismes, procaryotes et eucaryotes ¹⁷⁷. Depuis, les programmes massifs de séquençage qui ont émergé au cours de la dernière décennie ont révélé la présence jusque-là insoupçonnée de gènes codant potentiellement des PDFs chez un grand nombre de virus, et plus particulièrement des virus marins ^{218,219}. Ces nouvelles données semblent confirmer le caractère universel de la déformylation mais soulèvent de nombreuses questions quant au(x) rôle(s) joué(s) par les PDFs virales, si elles sont exprimées et fonctionnelles, dans les cycles de réplication virale. Ainsi, la compréhension de la nature et de la fonction de ces PDFs nécessite leur caractérisation.

Au début de ma thèse, les PDFs pouvaient être classées en trois grandes familles, appelés types 1, 2 et 3, avec deux sous-types 1B et 1A. Les premières séquences de PDFs virales identifiées ont été comparées aux PDFs connues jusqu'alors, indiquant leur appartenance au type 1, et plus particulièrement au type 1B dont le représentant est la PDF d'*E. coli*^{218,219}. Les PDFs codées par les bactériophages Vp16T et Vp16C²¹⁸ semblaient alors particulièrement proches de la PDF d'E. coli, au contraire des PDFs codées par d'autres virus marins qui faisaient partie d'une autre sous-branche du type 1B (voir Figure I.1B du Chapitre I)²¹⁹. En parallèle, une analyse phylogénétique réalisée par un autre laboratoire ²²⁵ a toutefois proposé que les PDFs des bactériophages Vp16T et Vp16C n'appartiendraient pas à la même sous-classe que les autres PDFs virales et ne seraient même pas apparentées aux PDFs de type 1B (voir Figure 3B de Frank et al. 2003)²²⁵. Ainsi, étant donnée la difficulté à classer les nouvelles séguences de PDFs virales par rapport aux séquences des PDFs connues jusqu'alors et bien caractérisées, et grâce au nombre croissant de séquences de PDFs découvertes et disponibles à ce jour, nous avons décidé de construire un nouvel arbre phylogénétique, plus précis. Nous avons pour cela utilisé 263 séquences de PDFs, sélectionnées pour représenter la diversité des séquences de PDFs et comprenant également les séquences virales nouvellement découvertes. Les séquences ont été

extraite de génomes complètement séquencés ou de génomes pour lesquels le séquençage était presque complet. Les séquences ont été alignées avec Clustal X ²⁵³ et l'arbre a été construit avec PHYLIP. De manière intéressante, une nouvelle classification a pu être établie, comprenant trois sous-classes de PDF1 (types 1A, 1B et 1C), une classe 2, une classe 3 et une nouvelle classe 4 (Figure D-1). Les PDFs de type 1A contiennent des séquences provenant de bactéries, de plantes, d'animaux et de champignons. Les PDFs de type 2 contiennent uniquement des séquences provenant de bactéries et champignons. On retrouve les PDFs d'amibes, d'archées, de kinetoplastes et de bactéries dans le groupe des PDFs de type 1C. Enfin, dans ce nouvel arbre phylogénétique, les PDFs identifiées dans les génomes des bactériophages *Vp*16T et *Vp*16C se retrouvent, comme la plupart des autres PDFs virales, dans la sous-classe de type 1B. En revanche, les séquences reconstruites des PDFs virales d'origine marine appartiendraient à une branche plus éloignée, constituant une nouvelle classe de PDFs, appelée type 4, et incluant par ailleurs les PDFs de certain Apicomplexes (Figure D-1).

Devant la difficulté à classer les PDFs virales identifiées au cours des dernières années, il est apparu nécessaire de caractériser ces enzymes afin d'en comprendre leurs spécificités. Cette caractérisation était d'autant plus importante que l'analyse de l'ensemble des PDFs virales a montré des séquences dont l'extrémité C-terminale est très courte, tronquée quelques résidus après le motif conservé 3 (voir Figure I.1A du Chapitre I). Cette observation est très surprenante car il a été proposé que c'est justement cette région de la PDF d'*E. coli* qui serait en interaction directe avec le ribosome au cours du processus de déformylation des protéines en cours de synthèse *in cellulo*⁹¹. Nous avons donc décidé de caractériser la PDF virale du bactériophage Vp16T, qui nous est apparu comme la PDF active ayant la séquence la plus courte connue à ce jour. Entre-temps, au cours de ma thèse, la caractérisation de la PDF du cyanophage S-SMM7 a été publiée ²²⁵. La résolution de sa structure a confirmé son affiliation au type 1B, avec un cœur globulaire dépourvu de l'hélice α C-terminale typique de la PDF d'*E. coli* en raison de sa séquence tronquée en C-terminal, et sa caractérisation enzymatique a par ailleurs montré une protéine ayant une activité déformylase très faible.

143


Figure D-1 : Arbre phylogénétique des peptides déformylases. L'arbre a été réalisé à partir de 263 séquences. L'alignement a été fait avec Clustal X, et l'arbre phylogénétique construit avec PHYLIP. Le sous-groupe 1B comprend des PDFs provenant de bactéries, de plantes, de champignons, d'algues, d'apicomplexes, de bactériophages (en rouge) et d'amibes. Le sous-groupe 1C ne comprend que des PDFs d'archées. Le sous-groupe 1A contient des PDFs de bactéries, d'animaux, de plantes et de champignons. Le groupe des PDFs de type 2 comprend les enzymes de bactéries et de champignons. Le groupe de PDFs de type 3 comprend les bactéries, les amibes, les kinétoplastes et les archées. Le groupe de type 4 contient des déformylases de bactériophages (en rouge) et d'apicomplexes.

Durant ma thèse, j'ai montré que le gène homologue de peptide déformylase identifié chez le phage Vp16T code bien pour une enzyme à activité déformylase, et j'ai donc cherché à purifier cette enzyme pour procéder à sa caractérisation. Or il est connu que la purification de PDFs pleinement actives est souvent difficile car la Cys conservée du motif II qui participe au mécanisme enzymatique est très sujette à l'oxydation, via l'oxydation du métal catalytique ^{192,193}. La préservation de l'activité est toutefois possible en forçant l'incorporation dans le site actif du cation divalent adéquat au moment de la lyse des bactéries qui servent à la surexpression de la protéine recombinante, mais rien ne permet a priori de prévoir quelles seront les meilleures conditions de purification ^{194,195,229}. Trouver les conditions idéales de purification d'une nouvelle PDF permettant de disposer d'une enzyme pleinement active peut donc être difficile. La mise au point des conditions de purification idéales pour le maintien de l'activité enzymatique de Vp16PDF s'est avérée particulièrement ardue, et la composition des tampons retenue est tout à fait inhabituelle.

Pour commencer, j'ai montré qu'il était nécessaire d'utiliser une très forte concentration de nickel (80 mM) pour disposer d'une enzyme pleinement active. Nous avons également constaté que la stabilité de la protéine semblait dépendre de la présence d'ions nickel dans le milieu. Ce comportement est inhabituel et nécessitera d'investiguer le rôle de ce métal pour mieux comprendre la fonction de l'enzyme. On sait toutefois que lorsque les PDFs sont purifiées sans ajout artificiel de métal, elles contiennent le plus souvent du Fe²⁺, celui-ci étant vraisemblablement le métal naturellement présent au sein du site actif de la plupart des PDFs *in cellulo* ^{190,193} Rien ne nous permet actuellement de savoir quel serait le métal naturellement présent chez *Vp*16PDF. Cependant, le Fe²⁺ n'étant présent qu'en très faible quantité dans les océans, nous pouvons supposer que les déformylases infectant des micro-organismes marins n'utilisent pas cet ion pour le mécanisme de catalyse.

J'ai également montré qu'il fallait purifier la protéine recombinante dans un tampon de bas pH (4,0) pour préserver l'activité enzymatique. De plus, là encore, la stabilité de la protéine semble influencée par le pH du milieu environnant. Ce comportement est probablement lié au point isoélectrique particulier de la protéine, qui est relativement élevé par rapport à celui de la plupart des PDFs connues (7,0 contre 4,5-5,0). Ce pI élevé est du à un nombre anormalement bas de résidus chargés négativement, ce qui conduit à une répartition des charges en surface atypique. En effet, la résolution de la structure de *Vp*16PDF a montré que sa surface est globalement moins chargée que d'ordinaire, en particulier autour du site de fixation du ligand. Cette particularité structurale ne trouve pas d'explication à ce jour, mais pourrait entrer en jeu lors de l'interaction avec le ribosome.

Grâce à la mise au point de tampons adaptés spécifiquement à la purification de la protéine Vp16PDF, j'ai alors pu passer d'une forme faiblement active à une forme dont l'activité est tout à fait comparable à celle obtenue avec d'autres PDFs connues ($k_{cat} = 20 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 2,3 \pm 0,3 \text{ mM}$, $k_{cat}/K_m = 8478 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, voir Chapitre I). Les données d'activité, *in vivo* et *in vitro*, indiquent donc que la peptide déformylase codée par le bactériophage Vp16T est très probablement exprimée lors de l'infection de l'hôte, et assure une fonction de déformylation dans la cellule. Dans ce cas, quels sont ses substrats ? A-t-elle une préférence pour les protéines codées par le bactériophage, est-elle capable de déformyler les protéines de l'hôte ? Est-elle capable d'interagir avec le ribosome ? Si oui, agit-elle de concert ou au contraire en compétition avec la PDF de l'hôte ? Quel est le rôle d'une PDF virale dans le cycle d'infection ?

Les travaux publiés en 2013 par Frank et al. suggèrent que la PDF codée par le cyanophage S-SSM7 déformylerait préférentiellement les protéines de l'hôte S. elongatus impliquées dans la photosynthèse ²²⁵. La protéine chloroplastique D1 serait particulièrement substrat de la PDF du cyanophage. La PDF codée par le bactériophage contribuerait alors à maintenir un environnement cellulaire favorable pour mener à bien sa réplication. En effet, la littérature commence à documenter de façon plus importante le rôle des AMGs chez les virus (auxiliary metabolic genes) dont la fonction est d'optimiser le métabolisme de la cellule hôte pendant l'infection ²⁵⁴. L'existence de protéines de photosystème codées par les virus marins est d'ailleurs un bon exemple de cette stratégie adoptée par les phages ^{220,255,256}. Mais la fonction des AMGs ne semble pas concerner uniquement le mécanisme de photosynthèse des cellules hôtes, mais pourrait posséder une grande variété de fonction, comme le métabolisme du carbone ²⁵⁷, la synthèse des acides nucléigues ²⁵⁸ ou la tolérance aux stress ²⁵⁹. Par la suite, j'ai donc tout naturellement cherché à déterminer si l'enzyme de phage avait des spécificités de substrat, dirigées vers ses propres protéines, ou vers celles de son hôte. J'ai pour cela réalisé des tests d'activité avec différents peptides formylés correspondant au N-terminal des principales protéines codées par le phage ²¹⁸. Cette approche n'a pas montré de spécificité de substrat particulière de Vp16PDF (voir Chapitre I), ce qui semble indiquer que cette enzyme n'a pas pour fonction de déformyler préférentiellement les protéines du phage. En parallèle, l'analyse en spectrométrie de masse sur le protéome N-terminal d'E. coli exprimant Vp16PDF n'a pas non plus montré de différence de spécificité de l'enzyme du bactériophage. Néanmoins, il est

possible que *Vp*16PDF ait une spécificité de substrat dirigée vers d'autres protéines codées par son génome, ce que nous n'avons pas encore testé.

La résolution de la structure de Vp16PDF a montré que la protéine adopte un repliement global classique, et qu'en raison de sa séquence tronquée en C-terminal, elle est dépourvue de l'hélice α C-terminale typique des PDFs de type 1B, comme *Ec*PDF. Or la littérature indique qu'*Ec*PDF interagit avec le ribosome grâce à son hélice α en C-terminal ⁹¹. Il nous est donc apparu crucial de déterminer si une PDF active dépourvue d'hélice a C-terminale avait la capacité d'interagir avec le ribosome. J'ai alors réalisé des études d'interaction entre Vp16PDF et les ribosomes d'E. coli. De façon surprenante, Vp16PDF interagit bien avec les ribosomes 70S, avec une affinité de l'ordre du micromolaire, ce qui est comparable à ce qui avait été publié avec *Ec*PDF ^{91,132} (voir Chapitre II). Cela signifie que, contrairement à ce qui a pu être proposé jusqu'alors, l'hélice a des PDFs n'est pas l'unique déterminant permettant aux peptides déformylases d'interagir avec le ribosome, et remet donc en question la théorie actuellement admise ^{91,94,126,132}. Cela permet également d'extrapoler que les autres types de PDFs (1A et 2), dont l'extrémité C-terminale adopte un repliement différent ^{47,93}, peuvent également interagir avec le ribosome, selon des mécanismes moléculaires qui restent à investiguer. Les travaux menés pendant ma thèse ne nous ont pas permis de déterminer précisément quels résidus de *Vp*16PDF sont impliqués lors de la formation du complexe, mais j'ai malgré tout pu montrer que la région C-terminale de la protéine, et plus particulièrement ses deux derniers résidus, jouent un rôle clé dans la fonction de la protéine. L'étude plus approfondie des chimères que j'ai construit permettra alors de mieux comprendre comment une PDF sans hélice α C-terminale parvient à se lier au ribosome.

J'ai en parallèle cherché à identifier les protéines ribosomales impliquées dans l'interaction avec Vp16PDF. Il en est ressorti que Vp16PDF viendrait se fixer au niveau de la protéine ribosomale uL22, tout comme EcPDF ⁹¹. Cependant, nos données indiquent qu'elle pourrait également cibler deux autres sites de fixation, l'un au niveau des protéines ribosomales uL29/uL24/uL23 et l'autre au niveau des protéines uL25/uL30. Ce résultat, bien qu'il doive être confirmé en utilisant les protéines chimériques, est très intéressant dans la mesure où il indique que c'est probablement l'absence d'hélice α chez la peptide déformylase qui entraîne une relocalisation de l'enzyme. Nous ne savons pas ce qui motive cette PDF à interagir préférentiellement sur l'un ou l'autre des sites, ou si deux particules pourraient se fixer simultanément sur le ribosome, comme ce qui semble être le cas pour la protéine d'adressage SecA ¹²⁴.

Nous avons également voulu nous intéresser au rôle joué par le peptide naissant. Pour cela, j'ai préparé des ribosomes bloqués en cours de traduction, en utilisant la protéine β -galactosidase à laquelle nous avons fusionné une séquence d'arrêt SecM à son extrémité C-terminale. Les résultats sont préliminaires mais montrent clairement une différence d'affinité de *Vp*16PDF selon la longueur de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. L'affinité semble en effet meilleure lorsque le peptide naissant émerge du tunnel de sortie du ribosome comparé à des ribosomes vides ou dont le peptide naissant est encore confiné dans le tunnel de sortie. Ce résultat est en accord avec une étude précédente qui montrait une affinité is pour un ribosome vide ou contenant un très court peptide ⁹⁴. L'affinité la plus importante a été obtenue avec un peptide naissant contenant au total 53 résidus d'acides aminés, ce qui est cohérent avec la distance de 13Å mesurée entre l'extrémité du tunnel de sortie et le positionnement putatif du site actif d'*Ec*PDF lorsque celle-ci est fixée au ribosome ⁹¹. Cependant, ces résultats ont été obtenus avec *Vp*16PDF, qui ne contient pas l'hélice C-terminale d'*Ec*PDF et qui semble se positionner différemment. La même approche devra donc être appliquée avec *Ec*PDF.

Les peptides déformylases ayant une affinité très faible pour le ribosome (de l'ordre du micromolaire : $K_d = 2.5 \pm 1.0 \mu M$ selon Bingel-Erlenmeyer *et al* ⁹¹, $K_d \sim 1.5 \mu M$ selon Bornemann et al ¹³², et une affinité apparente de l'ordre de 1 à 2 µM selon notre étude sur Vp16PDF, voir Chapitre II) et étant moins abondantes dans la cellule que les ribosomes (environ 1300 PDFs par cellule ¹⁹⁴ contre environ 50000 ribosomes), il apparaît peu probable que l'enzyme se fixe sur le ribosome et « attende » que le peptide émerge. De plus, étant donné que la plupart des facteurs qui agissent sur le peptide naissant dès sa sortie du ribosome interviennent au niveau d'une plateforme commune d'interaction, située à proximité du tunnel de sortie du peptide (incluant les protéines ribosomales bL17, bL22, bL32, uL24, uL29 et uL23) ^{22,126}, tout semble indiquer que le peptide naissant sert de signal pour favoriser l'intervention de la PDF. Cette hypothèse peut être soutenue par le fait qu'il a été suggéré que le peptide en cours de synthèse sert de signal pour le recrutement du TF^{107,108} et de la SRP^{22,138}. Cependant il est encore difficile de savoir si la PDF peut se lier au ribosome de façon simultané avec le TF ^{94,132}. Notons qu'une compétition semble exister entre la PDF et la MetAP. Ces données confortent ainsi l'hypothèse d'une intervention séquentielle de plusieurs facteurs des modifications cotraductionnelles du N-terminal, et donc de la peptide déformylase, motivée possiblement par la taille et la nature du peptide naissant.

Concernant les autres types de ribosomes, aucune donnée n'est actuellement disponible. Les ribosomes chloroplastiques, bien qu'ils possèdent des protéines spécifiques, présentent les mêmes protéines faisant partie de la plateforme commune d'interaction des ribosomes bactériens⁷. Les chloroplastes contiennent des PDFs de type 1B, dont la structure présente une extrémité C-terminale sous forme d'hélice α , et nous pouvons donc raisonnablement supposer que le mécanisme d'interaction est le même que celui décrit chez les procarvotes ⁹¹. Quant à la régulation du mécanisme de déformylation au niveau du ribosome mitochondrial, il est probable que le mécanisme soit différent. En effet, bien que certaines protéines ribosomales universelles et appartenant à la plateforme commune d'interaction soient présentes, des protéines mitochondriales spécifiques y sont également présentes. Ainsi, nous ne pouvons pas prédire la localisation de la PDF1B dans cet environnement. De plus, les mitochondries contiennent également des PDF1A, dont le domaine C-terminal n'est pas structuré en hélice α ^{158,189}, et dont nous ne connaissons pas le mode d'interaction. Enfin, il a été suggéré que le ribosome mitochondrial possédait un second tunnel de sortie du peptide $^{8-11}$. Dans ce contexte, il est difficile d'imaginer le déroulement de la régulation des modifications co-traductionnelles des protéines qui émergent au niveau de ce second tunnel.

Enfin, nous ne savons pas non plus pourquoi certains organismes possèdent deux types différents de peptides déformylases. Une première hypothèse se dirige sur leur capacité à fixer des ions métalliques différents ^{183,185}. Des conditions de stresses pouvant modifier l'homéostasie dans la cellule, et ainsi la disponibilité de certains types d'ions, il est probable que les organismes qui possèdent plusieurs types de PDF, peuvent continuer à contrôler la déformylation de leur protéome, même lorsque les conditions métaboliques changent. La seconde hypothèse pourrait se diriger vers leur capacité à interagir avec le ribosome, lorsque celles-ci possèdent des structures différentes du domaine C-terminal. Nous pouvons noter la présence de peptides déformylases chez les archées, qui ne possèdent pas de méthionines formylées ²²⁴. Dans ce cas, nous ne connaissons pas le rôle de ces PDFs putatives.

De manière très intéressante, j'ai montré que la PDF du bactériophage Vp16T provoque, lorsqu'elle est exprimée à des températures inférieures ou égales à 30°C, un phénotype d'inhibition de la croissance bactérienne et d'accumulation de protéines sous forme d'agrégats. Notons que les protéines chimères que j'ai construit, possédant la séquence de Vp16PDFadditionnée de l'hélice α C-terminale d'*Ec*PDF, ne montrent pas de phénotype d'inhibition de croissance (voir chapitre III). Cela suggère donc que le phénomène d'inhibition est directement lié à l'absence d'hélice α chez *Vp*16PDF. Il n'est toutefois pas exclu que les deux derniers résidus de la protéine puissent jouer un rôle dans le phénomène d'inhibition, point qui sera investiguer en étudiant l'accumulation d'agrégats lorsque les bactéries expriment non pas *Vp*16PDF mais ses chimères.

Nous avons également montré que les cellules exprimant Vp16PDF à 30°C présentent une altération inattendue de l'enveloppe bactérienne. Ce phénotype a été confirmé en cultivant les cellules sur des milieux astringents, contenant un antibiotique, la vancomycine, ou un détergent, le SDS. Les cellules exprimant Vp16PDF présentent un phénotype de sensibilité accrue au SDS et la vancomycine, montrant une inhibition de croissance, reflet d'une perméabilité de l'enveloppe bactérienne plus importante.

Les conséquences physiologiques de l'expression de la PDF du bactériophage ressemblent très fortement a ce qui est observé chez des mutants des voies d'adressage des protéines membranaires, comme SecB^{252,260} et TF^{105,261}. Etant donné que Vp16PDF semble se fixer au ribosome à proximité de l'extrémité du tunnel de sortie du peptide naissant, nous supposons que cette protéine pourrait bloquer une ou plusieurs voies de repliement ou d'adressage du peptide en cours de synthèse, aboutissant à des protéines qui s'agrègent, à cause de leurs défauts de repliement et/ou d'adressage. Nos données indiquant que le phénotype d'inhibition de croissance provoqué par Vp16PDF à 30°C n'est que peu, ou pas observable dans un contexte double mutant $\Delta tig/\Delta secB$, alors qu'il est intensifié dans un contexte simple mutant Δtig ou $\Delta secB$, supportent l'hypothèse du lien entre Vp16PDF et la voie TF/SecB. Dans ce contexte double mutant, d'autres voies d'adressage des protéines doivent être mise en place, voies dans lesquelles Vp16PDF n'intervient pas. Cela peut être dû au fait que les protéines concernées sont prises en charge de façon post-traductionnelle, ou bien parce que les facteurs impliqués dans un contexte où la voie TF/SecB ne fonctionne pas ne possèdent pas les mêmes zones d'interaction sur le ribosome, et n'entrent donc pas en compétition avec Vp16PDF. Les différentes voies d'adressage des protéines sont complexes, composées d'un grand nombre de facteurs, dont plusieurs peuvent être interchangeables. Les données sont nombreuses, mais il reste pourtant encore beaucoup à découvrir, tant ce mécanisme semble complexe et finement régulé.

Les phages sont incapables de se reproduire par leurs propres moyens, et dépendent donc de l'hôte pour se multiplier. L'étape la plus critique est la réplication de leur matériel génétique, qui nécessite d'utiliser et de mobiliser la machinerie de traduction cellulaire. A l'issue de ce processus de réplication du génome ainsi qu'à l'assemblage de la particule virale, les phages provoquent le plus souvent la lyse de la cellule hôte, ce qui permet la libération des particules virales en vue de leur propagation. La phase lytique intervient au moment adéquat du cycle de réplication virale, ce qui permet au phage d'utiliser suffisamment longtemps le métabolisme de l'hôte ²⁶². L'enveloppe bactérienne étant une barrière difficile à franchir, l'une des stratégies principales utilisées par les phages pour « sortir » de la cellule est la perméabilisation de cette enveloppe. Un certain nombre de phages utilisent alors un couple de deux protéines, appelées endolysines et holines ^{262,263}. Ces protéines sont codées par le génome du phage. Les holines permettent de perméabiliser la membrane plasmique en y créant des pores. Les endolysines ont alors la possibilité d'atteindre le peptidoglycane afin de le dégrader. L'enveloppe bactérienne est aussitôt fragilisée, ce qui provoque la lyse bactérienne et la libération des particules virales.

Le cycle lytique du phage Vp16T n'est pas décrit, mais son génome ne semble pas contenir de gènes codant des endolysines ou holines ²¹⁸, au contraire d'autres phages infectant la bactérie Vibrio parahaemolyticus ²⁶⁴. En revanche, nous avons observé que la peptide déformylase codée par Vp16T interfère avec la voie de repliement et d'adressage TF/Sec, provoque l'accumulation de protéines sous forme d'agrégats, et déstabilise l'enveloppe bactérienne, aboutissant pour finir à la lyse des cellules. Par ailleurs, la sensibilité des bactéries à l'antibiotique vancomycine suggère une fragilisation de la membrane externe en réponse à l'expression de Vp16PDF (voir Chapitre III). Sachant que les mutants de la voie TF présentent un défaut de synthèse de protéines membranaires, notamment les porines OMPs ^{105,246,249}, nous pouvons poser l'hypothèse que nous trouverons une accumulation plus importante d'OMPs dans les agrégats provoqués par l'expression de V_p 16PDF. Nos résultats semblent alors indiquer que le phage Vp16T utiliserait un mécanisme tout à fait original de lyse, alternatif à celui des holines/endolysines, induit par la PDF. Cette enzyme pourrait alors jouer un double rôle. Celui d'assurer un taux de déformylation optimal dans la cellule, bénéfique pour le bon déroulement de la traduction des protéines de l'hôte, comme celui de ses propres protéines, mais également celui de fragiliser l'enveloppe bactérienne en perturbant une voie de repliement et d'adressage des protéines membranaires, afin de pouvoir libérer les particules virales lors de la phase lytique.

Enfin, comme décrit dans l'introduction, les peptides déformylases sont des cibles thérapeutiques intéressantes ^{130,197,199}. De nos jours, les inhibiteurs sont dirigés vers le site actif de l'enzyme. L'approfondissement des connaissances quant au mode d'interaction de ces enzymes avec le ribosome pourrait permettre la synthèse de nouveaux inhibiteurs, dirigés non pas vers le site actif, mais vers le(s) domaine(s) d'interaction avec le ribosome. Depuis maintenant presque un siècle, la thérapie phagique est utilisée pour lutter contre les infections bactériennes ²⁶⁵. L'étude et la compréhension des mécanismes d'infection des phages est donc d'une grande importance d'un point de vue thérapeutique. Ainsi toute découverte de fonction enzymatique jusqu'alors insoupçonnée chez les phages pourrait être importante pour l'utilisation de ce type de thérapie.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

A-Techniques de biologie moléculaire :

A.1-Souches bactériennes

Les souches d'*E. coli* utilisées pour la biologie moléculaire sont répertoriées dans le Tableau MM-1.

Souche	Génotype	Source
DH5a	fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Invitrogen
Tg1	K-12 supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5, ($r_{K}\bar{m}_{K}$)	Lucigen
NEB Turbo	F' proA ⁺ B ⁺ lacl ^q ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb- 210::Tn10)Tet ^s endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	Novagen

Tableau MM-1 : Souches d'E. coli utilisées pour la biologie moléculaire.

A.2 – Protocole

1) Ensemble des constructions plasmidiques.

Le gène de 417 pb codant la protéine *Vp*16PDF wt a été synthétisé par l'entreprise GeneArt et cloné dans un vecteur pBAD/*Myc*-HisA (Invitrogen) en utilisant les sites de restriction BspHI et PstI (l'utilisation de ces sites de restriction exclut l'étiquette 6xHis contenue dans le plasmide). L'ORF60 présente dans le génome du bactériophage *Vp*16T étant très riche en GC ²¹⁸, la séquence nucléotidique codant *Vp*16PDF a été conçue avec optimisation de codons pour une expression optimale en système bactérien (voir la séquence nucléotidique et protéique de *Vp*16PDF wt dans le Tableau MM-2). Le plasmide a été introduit dans la souche d'*E. coli* K12 (dam+ et dcm+) pour être amplifié puis a été purifié. Le plasmide lyophilisé (5µg) nous a ensuite été envoyé, lequel a alors été resuspendu dans 50 µL d'eau milliQ.

Le gène de 495 pb codant la chimère Vp16PDF(KLF)hélice a également été synthétisé par l'entreprise GeneArt, également avec optimisation de codons. Le gène contient la séquence codante d'*Ec*PDF (K₁₄₁LFMDYLSPLKQQRIRQKVEKLDRLKARA₁₆₉) fusionnée en Cterminal du gène codant Vp16PDF (après le 134ème résidu, voir Tableau MM-2) ; il a été cloné dans le vecteur pBAD/*Myc*-HisA avec les sites de restriction NcoI et XhoI (l'utilisation de ces sites de restriction exclut l'étiquette 6xHis contenue dans le plasmide).

Les gènes de 495 pb codant les chimères Vp16PDF(VTI)hélice et Vp16PDF(VTF)hélice ont été obtenus par mutagénèse dirigée (voir la procédure paragraphe 2) à partir du gène codant Vp16PDF(KLF)hélice présent dans le plasmide pBAD/*Myc*-HisA, de façon à remplacer les résidus K₁₃₂L₁₃₃F₁₃₄ par V₁₃₂T₁₃₃I₁₃₄ ou V₁₃₂T₁₃₃F₁₃₄ respectivement.

Les mutants d'*Ec*PDF ont également été obtenus par mutagénèse dirigée ; notons que la version sauvage d'*Ec*PDF est également nommée *Ec*PDF(KLF) pour mettre l'accent sur les résidus qui sont mutés par la suite. *Ec*PDF(KLI) et *Ec*PDF(VTI) ont été produits par la substitution des résidus K₁₄₁L₁₄₂F₁₄₃ d'*Ec*PDF par K₁₄₁L₁₄₂I₁₄₃ ou V₁₄₁T₁₄₂I₁₄₃ respectivement.Les versions tronquées et mutées d'*Ec*PDF, *Ec*PDF(KLF) Δ C-ter, *Ec*PDF(KLI) Δ C-ter et *Ec*PDF(VTI) Δ C-ter, ont été construites respectivement à partir des gènes codant *Ec*PDF wt, *Ec*PDF(KLI) et *Ec*PDF(VTI) dans lesquels un double codon stop a été inséré après le codon correspondant au 144ème acide aminé.

Le gène sauvage codant *Ec*PDF était présent initialement dans un plasmide pBAD/*Myc*-HisA ainsi que dans un plasmide pET-22b(+). Toutes les mutations ont été effectuées à la fois dans les gènes contenus dans le plasmide pBAD/*Myc*-HisA mais également dans ceux contenus dans le pET-22b(+).

L'ensemble des constructions utilisées au cours de ce travail est répertorié dans les tableaux MM-2 et MM-3.

Tableau MM-2: Séquences génomiques et protéiques de Vp16PDF dans ses versions wt et chimériques.

Version de Vp16PDF	Séquence génomique	Séquence protéique
wt	ATGAAAATTCTGAAAGATGATGCACCGGAACTGCATGCAATTGCAGCCGAAGTTCCGCATGGTGAAGATGTTAAAGATCTGGTTCTGGA TATGACCGCAGCAATGACCGCAGCCGGTGGTATTGGTCTGGCAGGTAATCAGGTTGGTGTTCTGAAACGTATTATTGTTCTGCGTTGCC CGACCTTTAAAGGTTGTGTTATTAATCCGATTATTACCCGTCATACCGATGGTCATGTTTATAGTCCGGAAGGTTGTCTGAGCTATCCG GGTAAAACCGTTGCAAAAAAACGTCGTAATAAAGTTGTGGTGGAAGGCTATGATATGGATTGGCAGCCGATTACCATTGCAGCAAAAGG TCTGACCGCATTTTGTCTGCAACATGAAATTGATCATCTGAATGGCGTGACCATTTAATAA	MKILKDDAPE LHAIAAE <i>VP</i> H GEDVKDLVLD MTAAMTAAGG IGLAGNQVGV LKRIIVLRCP TFKGCVINPI ITRHTDGHVY SPEGCLSYPG KTVAKKRRNK VVVEGYDMDW QPITIAAKGL TAFCLQHEID HLNGVTI
<i>Vp</i> 16PDF(KLF)hélice	ATGAAAATCCTGCATGATGATGCACCGGAACTGCATGCCATTGCAGCCGAAGTTCCGCATGGTGAAGATGTTAAAGATCTGGTTCTGGA TATGACCGCAGCAATGACAGCAGCCGGTGGTATTGGTCTGGCAGGTAATCAGGTTGGTGTTCTGAAACGTATTATTGTTCTGCGTTGTC CGACATTTAAAGGCTGTGTTATTAACCCGATTATCACCCGTCATACCGATGGTCATGTTTATAGTCCGGAAGGTTGTCTGAGCTATCCG GGTAAAACCGTTGCAAAAAAACGTCGTAATAAAGTGGTGGTGGAAGGCTATGATATGGATTGGCAGCCGATTACCATTGCCGCAAAAGG TCTGACCGCATTTTGTCTGCAGCATGAAATTGATCATCTGAACGGCGTAACGATAATGGATTATCTGAGTCCGCTGAAACAGCAGCGTA TTCGTCAGAAAGTTGAAAAACTGGATCGTCTGAAAGCACGTGCCTAATAA	MKILKDDAPE LHAIAAE <i>VP</i> H GEDVKDLVLD MTAAMTAAGG IGLAGNQVGV LKRIIVLRCP TFKGCVINPI ITRHTDGHVY SPEGCLSYPG KTVAKKRRNK VVVEGYDMDW QPITIAAKGL TAFCLQHEID HLNGKLFMDY LSPLKQQRIR QKVEKLDRLK ARA
<i>Vp</i> 16PDF(VTI)hélice	ATGAAAATCCTGAAAGATGATGCACCGGAACTGCATGCCATTGCAGCCGAAGTTCCGCATgGTGAAGATGTTAAAGATCTGGTTCTGGA TATGACCGCAGCAATGACAGCAGCCGGTGGTATTGGTCTGGCAGGTAATCAGGTTGGTGTTCTGAAACGTATTATTGTTCTGCGTTGTC CGACATTTAAAGGCTGTGTTATTAACCCGATTATCACCCGTCATACCGATGGTCATGTTTATAGTCCGGAAGGTTGTCTGAGCTATCCG GGTAAAACCGTTGCAAAAAAACGTCGTAATAAAGTGGTGGTGGTGGAAGGCTATGATATGGATTGGCAGCCGATTACCATTGCCGCAAAAGG TCTGACCGCATTTTGTCTGCAGCATGAAATTGATCATCTGAACGGCGTAACGATAATGGATTATCTGAGTCCGCTGAAACAGCAGCGTA TTCGTCAGAAAGTTGAAAAACTGGATCGTCTGAAAGCACGTGCCTAATAA	MKILKDDAPE LHAIAAEVPH GEDVKDLVLD MTAAMTAAGG IGLAGNQVGV LKRIIVLRCP TFKGCVINPI ITRHTDGHVY SPEGCLSYPG KTVAKKRRNK VVVEGYDMDW QPITIAAKGL TAFCLQHEID HLNGVTIMDY LSPLKQQRIR QKVEKLDRLK ARA
<i>Vp</i> 16PDF(VTF)hélice	ATGAAAATCCTGAAAGATGATGCACCGGAACTGCATGCCATTGCAGCCGAAGTTCCGCATGGTGAAGATGTTAAAGATCTGGTTCTGGA TATGACCGCAGCAATGACAGCAGCCGgtGGTATTGGTCTGGCAGGTAATCAGGTTGGTGTTCTGAAACGTATTATTGTTCTGCGTTGTC CGACATTTAAAGGCTGTGTTATTAACCCGATTATCACCCGTCATACCGATGGTCATGTTTATAGTCCGGAAGGTTGTCTGAGCTATCCG GGTAAAACCGTTGCAAAAAAACGTCGTAATAAAGTGGTGGTGGAAGGCTATGATATGGATTGGCAGCCGATTACCATTGCCGCAAAAGG TCTGACCGCATTTTGTCTGCAGCATGAAATTGATCATCTGAACGGCGTAACGTTCATGGATTATCTGAGCTCGCAGAACAGCAGCGTA TTCGTCAGAAAGTTGAAAAACTGGATCGTCTGAAAGCACGTGCCTAA	MKILKDDAPE LHAIAAEVPH GEDVKDLVLD MTAAMTAAGG IGLAGNQVGV LKRIIVLRCP TFKGCVINPI ITRHTDGHVY SPEGCLSYPG KTVAKKRNK VVVEGYDMDW QPITIAAKGL TAFCLQHEID HLNGVTFMDY LSPLKQQRIR QKVEKLDRLK ARA

Les résidus mutés sont représentés en rouge. L'extrémité C-terminale d'*Ec*PDF qui est ajoutée à la séquence de *Vp*16PDF est représentée en vert.

Tableau MM-3: Séquences génomiques et protéiques d'*Ec*PDF dans ses versions wt et mutantes.

Version de <i>Ec</i> PDF	Séquences génomiques	Séquences protéiques
wt (protéine également appelée <i>Ec</i> PDF(KLF)	ATGTCAGTTTTGCAAGTGTTACATATTCCGGACGAGCGGCTTCGCAAAGTTGCTAAACCGGTAGAAGAAGTGAATGC AGAAATTCAGCGTATCGTCGATGATATGTTCGAGACGATGTACGCAGAAGAAGGTATTGGCCTGGCGGCGAACCCAGG TTGATATCCATCAACGTATCATTGTTATTGATGTTTCGGAAAACCGTGACGAACGGCTAGTGTTAATCAATC	MSVLQVLHIP DERLRKVAKP VEEVNAEIQR IVDDMFETMY AEEGIGLAAT QVDIHQRIIV IDVSENRDER LVLINPELLE KSGETGIEEG CLSIPEQRAL VPRAEKVKIR ALDRDGKPFE LEADGLLAIC IQHEMDHLVG KLFMDYLSPL KQQRIRQKVE KLDRLKARA
<i>Ec</i> PDF(KLI)	ATGTCAGTTTTGCAAGTGTTACATATTCCGGACGAGCGGCTTCGCAAAGTTGCTAAACCGGTAGAAGAAGTGAATGC AGAAATTCAGCGTATCGTCGATGATATGTTCGAGACGATGTACGCAGAAGAAGGTATTGGCCTGGCGGCAACCCAGG TTGATATCCATCAACGTATCATTGTTATTGATGTTTCGGAAAACCGTGACGAACGGCTAGTGTTAATCAATC	MSVLQVLHIP DERLRKVAKP VEEVNAEIQR IVDDMFETMY AEEGIGLAAT QVDIHQRIIV IDVSENRDER LVLINPELLE KSGETGIEEG CLSIPEQRAL <i>VP</i> RAEKVKIR ALDRDGKPFE LEADGLLAIC IQHEMDHLVG KLIMDYLSPL KQQRIRQKVE KLDRLKARA
<i>Ec</i> PDF(VTI)	ATGTCAGTTTTGCAAGTGTTACATATTCCGGACGAGCGGCTTCGCAAAGTTGCTAAACCGGTAGAAGAAGTGAATGC AGAAATTCAGCGTATCGTCGATGATATGTTCGAGACGATGTACGCAGAAGAAGGTATTGGCCTgGCGGCAACCCAGG ttGATATCCATCAACGTATCATTGTTATTGATGTTTCGGAAAACCGTGACGAACGGCTAGTGTTAATCAATC	MSVLQVLHIP DERLRKVAKP VEEVNAEIQR IVDDMFETMY AEEGIGLAAT QVDIHQRIIV IDVSENRDER LVLINPELLE KSGETGIEEG CLSIPEQRAL VPRAEKVKIR ALDRDGKPFE LEADGLLAIC IQHEMDHLVG VTIMDYLSPL KQQRIRQKVE KLDRLKARA

<i>Ec</i> PDF(KLF)ΔC-ter	ATGGCAGTTTTGCAAGTGTTACATATTCCGGACGAGCGGCTTCGCAAAGTTGCTAAACCGGTAGAAGAAGTGAATGCA GAAATTCAGCGTATCGTCGATGATATGTTCGAGACGATGTACGCAGAAGAAGGTATTGGCCTGGCGGCAACCCAGGTT GATATCCATCAACGTATCATTGTTATTGATGTTTCGGAAAACCGTGACGAACGGCTAGTGTTAATCAATC	MAVLQVLHIP DERLRKVAKP VEEVNAEIQR IVDDMFETMY AEEGIGLAAT QVDIHQRIIV IDVSENRDER LVLINPELLE KSGETGIEEG CLSIPEQRAL
	GAGAAAGTTAAAATTCGCGCCCTTGACCGCGACGGTAAACCATTTGAACTGGAAGCAGACGGTCTGTTAGCCATCTGT ATTCAGCATGAGATGGATCACCTGGTCGGCAAACTGTTTTAATAA	<i>VP</i> RAEKVKIR ALDRDGKPFE LEADGLLAIC IQHEMDHLVG <mark>KLF</mark>
<i>Ec</i> PDF(KLI)ΔC-ter	ATGGCAGTTTTGCAAGTGTTACATATTCCGGACGAGCGGCTTCGCAAAGTTGCTAAACCGGTAGAAGAAGTGAATGCA GAAATTCAGCGTATCGTCGATGATATGTTCGAGACGATGTACGCAGAAGAAGGTATTGGCCTGGCGGCAACCCAGGTT GATATCCATCAACGTATCATTGTTATAAGCGGCGAAACAGGCATTGAAGAAGGTTGCCTGTCGATCCCTGAACAACGT GCTTTAGTGCCGCGCGCAGAGAAAGTTAAAATTCGCGCCCTTGACCGCGACGGTAAACCATTTGAACTGGAAGCAGAC GGTCTGTTAGCCATCTGTATTCAGCATGAGATGGATCACCTGGTCGGCAAACTGATTTAATAA	MAVLQVLHIP DERLRKVAKP VEEVNAEIQR IVDDMFETMY AEEGIGLAAT QVDIHQRIIV IDVSENRDER LVLINPELLE KSGETGIEEG CLSIPEQRAL VPRAEKVKIR ALDRDGKPFE LEADGLLAIC IQHEMDHLVG KLI
<i>Ec</i> PDF(VTI)∆C-ter	ATGGCAGTTTTGCAAGTGTTACATATTCCGGACGAGCGGCTTCGCAAAGTTGCTAAACCGGTAGAAGAAGTGAATGCA GAAATTCAGCGTATCGTCGATGATATGTTCGAGACGATGTACGCAGAAGAAGGTATTGGCCTGGCGGCAACCCAGGTT GATATCCATCAACGTATCATTGTTATTGATGTTTCGGAAAACCGTGACGAACGGCTAGTGTTAATCAATC	MAVLQVLHIP DERLRKVAKP VEEVNAEIQR IVDDMFETMY AEEGIGLAAT QVDIHQRIIV IDVSENRDER LVLINPELLE KSGETGIEEG CLSIPEQRAL VPRAEKVKIR ALDRDGKPFE LEADGLLAIC IQHEMDHLVG VTI

Les acides aminés mutés par rapport à la version sauvage sont représentés en rouge. La séquence protéique correspondant à la séquence sauvage d'*Ec*PDF est représentée en vert.

2) Mutagénèse dirigée

La mutagenèse dirigée est utilisée pour substituer, déléter ou ajouter un petit nombre d'acides aminés. Pour cela nous avons utilisé le kit QuickChange Mutagenesis site-directed de avec Stratagene. Les amorces été conçues le serveur PrimerX ont (http://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/protein 1.cgi) dont les paramètres par défaut ont été modifiés: le pourcentage de G/C doit être compris entre 30% à 60%, la longueur de 25 à 70 pb, le $T_{\rm m}$ de la région appariée compris entre 50 et 55°C, et il est également préférable que l'oligonucléotide se termine par un nucléotide G ou C (ce qui évite des appariements non spécifiques). La température de déshybridation des brins doit-être comprise entre 75 et 85°C. On prépare le mix réactionnel suivant : 5 µL de « 10X reaction buffer » auquel on ajoute 25 ng d'ADN, 15 pmoles de chacun des oligonucléotides (voir Tableaux MM-4 et MM-5), 0,2 mM de dNTP mix (Agilent) et H₂O pour compléter à 49 µL. On ajoute alors 1 µL de PfuUltra HF DNA polymerase (concentration initiale 2,5 U/µl, Agilent). Une première incubation de 1 min à 95°C est réalisée, suivie du programme PCR suivant : 45 sec à 95°C pour désapparier les brins d'ADN, puis 1 min à 55°C pour hybrider les amorces sur l'ADN et enfin 9 min à 72°C pour permettre à la polymérase de répliquer le plasmide ; 18 cycles de PCR sont nécessaires pour obtenir le matériel final. A la fin des 18 cycles, une dernière incubation de 10 min à 72°C est réalisée. On ajoute ensuite 1µL de l'enzyme DpnI (Thermofisher Scientific) qui permet de digérer les brins matrices méthylés qui n'ont pas incorporé les mutations. L'incubation se fait durant 2h à 37°C. Les plasmides sont alors utilisés pour transformer la souche bactérienne NEB turbo. Les clones obtenus sont mis en préculture afin de réaliser une extraction plasmidique et un séquençage des plasmides par l'entreprise GATC Biotech.

Constructions	Séquences des amorces
Vp16PDF(VTI)hélice	CTGAACGGCGTAACGATAATGGATTATCTGAGTCCGCTG CAGCGGACTCAGATAATCCATTATCGTTACGCCGTTCAG
Vp16PDF(VTF)hélice	CTGAACGGCGTAACGTTTATGGATTATCTGAGTCCGCTG CAGCGGACTCAGATAATCCATAAACGTTACGCCGTTCAG

Tableau MM-4 : Couples d'amorçes utilisés pour la mutation des résidus V₁₃₂T₁₃₃I₁₃₄ de *Vp*16PDF avec hélice.

Les séquences des amorces (ThermoFisher Scientific), dans les sens « forward » puis « reverse », sont présentées de 5' en 3'. Les nucléotides correspondant aux acides aminés mutés sont représentés en rouge.

Constructions	Séquences des amorces
<i>EcPDF</i> (KLI)	CACCTGGTCGGCAAACTGATTATGGATTATCTGTCACC GGTGACAGATAATCCATAATCAGTTTGCCGACCAGGTG
<i>EcPDF</i> (VTI)	CACCTGGTCGGCGTCACCATC ATGGATTATCTGTCACC CAGCGGTGACAGATAATCCTAGATGGTGACGCCGACCAGG
<i>Ec</i> PDF(KLF)ΔC-ter	CCTGGTCGGCAAACTGTTTTAGGATTATCTGTCACCGCTG CAGCGGTGACAGATAATCCTAAAACAGTTTGCCGACCAGG
<i>Ec</i> PDF(KLI)∆C-ter	GATGGATCACCTGGTCGGCAAACTGATCTAGGATTATCTGTCACCGCTGAAACAAC GTTGTTTCAGCGGTGACAGATAATCCTAGATCAGTTTGCCGACCAGGTGATCCATC
<i>Ec</i> PDF(VTI)ΔC-ter	CAGCATGAGATGGATCACCTGGTCGGCGTCACCATCTAGGATTATCTGTCACCGCT GAAACAAC GTTGTTTCAGCGGTGACAGATAATCCTAGATGGTGACGCCGACCAGGTGATCCATC TCATGCTG

Tableau MM-5 : Couples d'amorçes utilisés pour la mutation des résidus 141 à 143 d'EcPDF wt.

Les séquences des amorces (ThermoFisher Scientific), dans les sens « forward » puis « reverse », sont présentées de 5' en 3'. Les nucléotides correspondant aux acides aminés mutés sont représentés en rouge.

3) Sous-clonage des gènes des chimères de *Vp*16PDF présentes dans le plasmide pBAD vers le vecteur pET-16b

Les gènes des protéines chimériques étaient initialement présents dans un plasmide pBAD, utilisé pour réaliser les tests de complémentation fonctionnelle (voir plus loin). Cependant, afin de pouvoir surexprimer les protéines et les purifier, il a été nécessaire de souscloner ces gènes dans un plasmide d'expression, permettant d'obtenir des quantités plus importantes de protéines. Les gènes ont donc été sous-clonés dans le vecteur pET-16b (Novagen, carte du plasmide en annexe).

Le mélange réactionnel pour l'amplification par PCR est le suivant : 3 ng de plasmide, 50 pmoles de chacun des oligonucléotides (voir Tableau MM-6), 1 mM de dNTP (Agilent), 5 µL de tampon de réaction 10X, 1 µL de *Pfu* DNA polymerase (Agilent, 2,5 unités/µL) dans 50 µL final. Le programme PCR se compose d'une étape de dénaturation à 95°C durant 1 min, puis 1 min d'hybridation à 55°C et une étape de synthèse à 72°C durant 2 min. On réalise 30 cycles de dénaturation/hybridation/polymérisation, et à la fin des cycles, une dernière incubation de 10 min à 72°C est réalisée. Les amorces utilisées pour amplifier les gènes (voir Tableau MM-6) insèrent des sites BspHI et XhoI aux extrémités 5' et 3' respectivement. On purifie les produits de PCR avec un kit spécifique (QIAquick PCR purification kit de Qiagen). Une fois purifiés, les produits de PCR sont alors digérés par les enzymes BspHI et XhoI, durant 20 min à 37°C. Le plasmide vide pET-16b est digéré avec l'enzyme XhoI ainsi qu'avec l'enzyme NcoI qui génère des extrémités compatibles avec celles générées par BspHI. Pour la ligation, nous

Matériels et Méthodes

avons utilisé 300 ng de pET-16b digéré, 220 ng de produit de PCR purifié et digéré, 2 µL de T4 DNA ligase (Invitrogen, 1 unité/ μ L) et 2 μ L de tampon 10X dans un volume finale de 20 µL. Les échantillons sont incubés à 22°C durant 4h. Suite à la ligation, le produit de réaction est transformé dans des bactéries thermocompétentes DH5a (voir protocole de transformation). Les clones obtenus sont alors criblés par PCR. Pour cela, nous réalisons pour chaque colonie une réaction de 25 µL final, comprenant 1,5 µL de tampon 10X, 0,2 mM de dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 µL d'amorce T7 promoteur et T7 terminateur à,4 pmol/µL et 0,1 µL de Taq Polymerase (Eurobio Taq, 0,5U). Le mix est tout d'abord préparé dans un volume final de 15 µL. En parallèle une colonie du clone à cribler est piquée avec une pointe et mélangée dans 10 µL d'eau (on repique également ce clone sur boîte LB agar contenant 25 µg/mL d'ampicilline que l'on incube la journée à 37°C). On ajoute ensuite les 10 µL contenant la colonie diluée dans le mix PCR de 15 µL, pour obtenir un volume finale de réaction de 25 µL. On utilise ensuite le programme PCR suivant pour amplifier le plasmide présent dans la colonie : 3 min à 94°C pour désapparier les brins d'ADN, puis des cycles comprenant 30 sec à 94°C, 30 sec à 52°C pour hybrider les amorces sur l'ADN et enfin 3 min à 72°C pour permettre à la polymérase de répliquer le plasmide. Il faut réaliser 30 cycles de PCR pour obtenir le matériel final. A la fin des 30 cycles, une dernière incubation de 10 min à 72°C est réalisée. Le produit de PCR est alors analysé sur gel d'agarose 1%. Les clones positif sont alors mis en préculture dans 5 mL de milieu LB liquide avec 25 µg/mL d'ampicilline et incubés la nuit à 37°C. On réalise le lendemain une extraction des plasmides (voir extraction de plasmide avec le kit miniprep). Les ADN purifiés sont alors envoyés à l'entreprise GATC Biotech pour être séquencés.

Constructions	Séquences
Vp16PDF(KLF)hélice	TA <u>CGACTCATG</u> AAAATCCTGAAAGATGATGCACCGG ACCTGT <u>CTCGAG</u> TTATTAGGCACGTGCTTTCAGACG
Vp16PDF(VTI)hélice	TA <u>CGACTCATG</u> AAAATCCTGAAAGATGATGCACCGG ACCTGT <u>CTCGAG</u> TTATTAGGCACGTGCTTTCAGACG
Vp16PDF(VTF)hélice	TA <u>CGACTCATG</u> AAAATCCTGAAAGATGATGCACCGG ACCTGT <u>CTCGAG</u> TTATTAGGCACGTGCTTTCAGACG

Tableau MM-6 : Couples d'amorces permettant le transfert des gènes codant les chimères de *Vp*16PDF du plasmide pBAD/*Myc*-HisA vers le vecteur pET-16b.

Les séquences des amorces, dans les sens « forward » puis « reverse », sont présentées de 5' en 3'. Les sites de restriction sont soulignés. Les codons d'initiation et de terminaison sont indiqués respectivement en rouge et vert.

4) Préparation des cellules thermocompétentes

Les bactéries thermocompétentes ont été préparées selon la méthode d'Inoue.

Tampon et milieu

<u>Milieu SOB</u> : 2% bactotryptone, 0,5% extrait de levures, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH6,4. Le milieu est autoclavé.

<u>Tampon TB</u>: 10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7. Le tampon est filtré et non autoclavé.

Protocole

On réalise une préculture de la souche souhaitée (voir tableau MM-1) dans 7 mL de milieu LB contenant les antibiotiques appropriés le cas échéant. La préculture est alors incubée la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm). Ensuite, on ensemence les cultures dans du milieu SOB avec 250 μ L de préculture et l'antibiotique si nécessaire. La culture est réalisée à 18°C sous agitation (170 rpm). Lorsque la DO⁶⁰⁰ est voisine de 0,6, la culture est mise 10 min dans la glace. On centrifuge alors la culture à 2500 g, 10 min à 4°C. La re-suspension du culot se fait de manière douce dans 80 mL de TB froid. On laisse reposer 10 min dans la glace. On centrifuge de nouveau l'échantillon à 2500 g, 10 min à 4°C. On resuspend cette fois le culot dans 20 mL de TB froid. On ajoute du DMSO à 7% final. On laisse reposer 10 min dans la glace. On réalise des aliquotes de 200 μ L que l'on plonge dans l'azote liquide. Les bactéries thermocompétentes sont ensuite stockées à -80°C.

Pour les souches MG1655 wt et mutantes (Tableau MM-8), le protocole de préparation des cellules thermocompétentes est le suivant :On réalise une culture de 30 mL de milieu LB, avec 300 μ L de 1M MgSO₄, 50 μ g/mL d'ampicilline et 300 μ L de préculture (incubée la nuit à 37°C). La culture est incubée 2h à 37°C (DO⁶⁰⁰ environ égale à 0,4). On centrifuge la culture durant 5 min à 5000 rpm à 4°C puis on resuspend le culot dans 10 mL de 0,1 M CaCl₂ froid, puis on laisse reposer 20 min dans la glace.On centrifuge alors la solution bactérienne à 6000 rpm, à 4°C durant 5 min puis on reprend le culot dans 1 mL de 0,1 M CaCl₂ contenant 15% de glycérol. On aliquote ensuite 100 μ L par tube.

• Test de compétence des cellules

Pour effectuer un test de compétence on réalise une transformation avec le plasmide de contrôle pUC19 possédant un gène de résistance à l'ampicilline et on étale les bactéries transformées sur boîte LB agar + 50 μ g/mL d'ampicilline.

On compte les colonies et on utilise la formule suivante :



L'efficacité (CFU) correspond au nombre de clones obtenus par µg de plasmide transformé. FD correspond au facteur de dilution, si on réalise des dilutions.

5) Transformation bactérienne par choc thermique

Les transformations bactériennes par choc thermique ont été réalisées avec des bactéries thermocompétentes. Pour cela, on utilise 50 μ L de bactéries thermocompétentes décongelées lentement dans la glace, dans lesquelles on ajoute environ 100 ng de plasmide. On laisse reposer quelques minutes dans la glace, puis on place le mélange durant 2 min à 42°C. Suite au choc thermique, les tubes sont replacés dans la glace durant 5 min. On ajoute alors 1 mL de milieu LB et on incube les tubes durant 1h à 37°C avec agitation, permettant ainsi aux bactéries de se régénérer. Le mélange de transformation est ensuite dilué au dixième et au centième, puis déposé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar, auxquelles on a préalablement ajouté le ou les antibiotiques correspondant à la résistance du plasmide (100 μ g/mL d'ampicilline et/ou 34 μ g/mL de chloramphénicol). Les boîtes sont ensuite incubées durant la nuit à 37°C.

6) Extraction d'ADN plasmidique (minipreps)

Les plasmides répliqués dans les bactéries DH5a ont été extraits et purifiés avec le kit QIAprep Spin Miniprep High-Yield de Qiagen. Pour cela, une colonie bactérienne préalablement transformée avec le plasmide d'intérêt est inoculée dans 5 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié et incubée durant 12 à 16h à 37°C. La préculture est ensuite centrifugée 15 min à 4400 rpm. Le surnageant est évacué et le culot est resuspendu dans 250 μ L de tampon P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0 plus de 5 min dans le tampon de lyse. On ajoute ensuite 350 μ L de tampon de neutralisation N3 (4,2 M Gu-HCl, 0,9 M acétate de potassium, pH4,8) et on mélange tout de suite l'échantillon par inversion afin de précipiter l'ADN génomique. Une centrifugation de 10 min à 13000 rpm (4°C) permet de culoter l'ADN génomique et de récupérer le surnageant contenant le matériel plasmidique, qui est alors déposé sur une colonne QIAprep spin. Une centrifugation à 13000 rpm est faite durant 1 min à température ambiante. On ajoute 750 μ L de tampon PE (10mM Tris-HCl pH7,5, 80% éthanol), et l'on refait la même centrifugation que précédemment (la centrifugation peut être répétée encore une fois afin d'éliminer les restes de tampon). Enfin, on place la colonne dans un tube Eppendorf, on ajoute 30 μ L d'eau milliQ et on laisse reposer 1 min à température ambiante. Une dernière centrifugation à 13000 rpm est réalisée et permet d'éluer l'ADN plasmidique. Une mesure de la concentration est réalisée au Nanodrop puis les plasmides sont stockés à -20°C.

7) Séquençage

Les séquençages ont été réalisés par l'entreprise GATC Biotech, à partir de 20 μ L de plasmide à une concentration comprise entre 50 ng/ μ L et 80 ng/ μ L. Dans le cas des constructions disponibles dans le pET-16b , les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont les primers de GATC correspondant au T7 promoteur. Dans le cas des constructions disponibles dans le pBAD/*Myc*-HisA, les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont les primers de GATC correspondant au pBAD promoteur.

B-Techniques de biochimie

B.1 Purification des protéines Vp16PDF et chimères

Les différentes protéines d'intérêt ont été exprimées sous forme recombinante dans *E*. *coli*, en utilisant les souches répertoriées dans le tableau MM-7.

Tableau MM-7 :

Souche	Génotype	Source
PAL421Tr	galK rpsL fms∆1 recA56 srl-300 ::Tn10	Meinnel <i>et al.</i> , 1994 ²²⁶
Rosetta2(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cam ^R)	Novagen

1) Test d'expression et de solubilité

Après transformation de bactéries Rosetta2(DE3)pLysS avec un plasmide pET contenant la protéine d'intérêt (vecteur pET-22b pour les mutants d'*Ec*PDF ou pET-16b pour les chimères de Vp16PDF, voir plus haut), un clone est mis en préculture dans 5 mL de milieu LB supplémenté avec 50 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol. La préculture est incubée la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, on ensemence 100 mL de milieu 2YT avec 2 mL de préculture, supplémenté en ampicilline 50 µg/mL et chloramphénicol 34 µg/mL. La culture est incubée à 37°C sous agitation à 180 rpm, jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600nm (DO⁶⁰⁰) de 0,6-0,8. L'expression de la protéine d'intérêt est alors induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 0,5 mM, et la culture est poursuivie 4-5h à 37°C sous agitation. Par la suite, les différents prélèvements sont dilués afin que chaque échantillon ait la même absorbance à 600nm (c'est-à-dire la même quantité de bactéries dans chaque échantillon) et centrifugés pendant 15 min à 4400 rpm (4°C). Les culots bactériens sont alors resuspendus dans 1,5 mL de tampon de lyse(tampon 50 mM MES-KOH à pH7,5,5,5 ou 4 suivant la protéine d'intérêt, et contenant différentes concentrations en NiCl₂ - 5 mM, 20 mM ou 80 mM), puis transférés dans un tube Eppendorf de 2 mL afin d'être lysés par sonication (3 séries de 20 pulsations par échantillon, à 50% de la puissance maximale, avec 1 min de repos dans la glace entre chaque série de pulsations). L'extrait brut soniqué est alors séparé en deux aliquotes de 750 µL. L'un des aliquotes est analysé sur gel SDS-PAGE 14% (après l'avoir centrifugé 20 min à 8000 rpm pour éliminer les débris cellulaires) afin d'observer l'expression globale de la protéine. L'autre aliquote va être traité de façon à séparer les protéines solubles et insolubles. Pour cela, une centrifugation à 14000 rpm durant 20 min est réalisée (4°C). Le surnageant correspond à la fraction soluble et le culot à la fraction insoluble. Ce culot est resuspendu dans 20 µL de tampon de lyse, et les deux fractions, soluble et insoluble, sont analysées sur gel SDS-PAGE 14%.

2) Purification de Vp16PDF (forme peu active)

Des bactéries PAL421Tr thermocompétentes sont transformées par choc thermique avec le plasmide pBAD/*Myc*-His A contenant le gène codant *Vp*16PDF wt. Les bactéries transformées sont étalées sur boîte LB agar contenant 100 μ g/mL d'ampicilline et incubées environ 24h à 37°C. Des précultures de 20 mL, contenant 50 μ g/mL d'ampicilline, sont inoculées à partir d'un clone et incubées durant la nuit à 37°C. Par la suite, 2 L de milieu LB contenant 50 μ g/mL d'ampicilline et 0,2% d'arabinose (pour l'induction de la protéine) sont inoculés avec la préculture. La culture est réalisée en utilisant 10 erlens de 2 L contenant chacun 200 mL de

culture et est incubée à 37° C sous agitation à 180 rpm durant 7h, jusqu'à obtention d'une $DO^{600} = 2,0$. On centrifuge ensuite la solution bactérienne 20 min à 8000 rpm et 4°C (rotor JA-10, centrifugeuse Beckman Coulter). On resuspend ensuite le culot dans 40 mL de tampon de lyse 50 mM MES-KOH pH 5,5 ; 5 mM NiCl₂. Si besoin, le culot resuspendu peut être conservé à -80°C.

La solution bactérienne est lysée par un casseur de cellules (Microfluidizer), en réalisant 2 passages successifs à 15000 Psi, puis centrifugée 30 min à 15000 rpm (4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est filtré avec une seringue équipée d'un filtre 0,45 μ m afin de s'assurer qu'aucun débris susceptible de boucher les conduits de l'AKTA durant la purification ne soit encore présent.

La purification se fait par chromatographie échangeuse de cations, en utilisant 23 mL de résine SP-Sepharose Fast Flow packée dans une colonne (GE Healthcare life science). La colonne est équilibrée avec le même tampon que celui utilisé pour la lyse, que l'on nomme tampon A (50 mM MES-KOH pH5,5; 5 mM NiCl₂). Une fois l'échantillon injecté, l'élution à 4°C se fait avec un tampon 50 mM MES-KOH pH5,5 ; 5 mM NiCl₂ ; 1M KCl (que l'on nomme tampon B). Pour cela, une première étape d'élution est réalisée en passant 6 volumes de colonne avec 15% de tampon B. Une autre étape consiste ensuite à réaliser un gradient de 15% à 60% de tampon B durant 8 volumes de colonnes, à 2 mL/min. Des fractions de 4 mL sont récoltées et analysées sur gel SDS-PAGE 14% puis on récupère celles qui contiennent Vp16PDF (environ 35 mL). Il faut ensuite concentrer les protéines avec les unités d'ultrafiltration AmiconUltra 3 kDa-15mL (Merck Millipore) en les centrifugeant à 4000g, jusqu'à obtention d'environ 11 mL. Une centrifugation 10 min à 15000 rpm à 4°C permet d'éliminer les protéines précipitées. Cet échantillon est alors injecté sur une colonne Superdex 75 Prepgrade de 120 mL (GE Healthcare) L'élution de l'échantillon est réalisée avec 1,5 volumes de colonne de tampon A à 1,5 mL/min. Les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% et l'ensemble des fractions d'intérêt sont rassemblées (environ 15 à 20 mL total). Un second passage de l'échantillon est réalisé sur la colonne Superdex 75 Prepgrade (dans les mêmes conditions que précédemment) afin d'augmenter le degré de pureté de la protéine. Après analyse des fractions sur gel SDS-PAGE 14%, les fractions d'intérêt sont rassemblées et concentrées avec les tubes Amicon Ultra 3kDa-15 mL, à 4000g à 4°C, jusqu'à obtention d'environ 500 µL. L'échantillon est alors centrifugé 10 min à 15000 rpm à 4°C afin d'éliminer les protéines précipitées. Un dosage de Bradford permet alors de mesurer la concentration de la protéine. On réalise ensuite des aliquotes et la protéine est conservée à -80°C. La protéine purifiée est finalement dialysée la nuit à 4°C contre : - 1 L de tampon 50 mM MES-KOH pH5,5, 5 mM NiCl₂, 50% glycérol. La protéine est alors stockée à -20°C et sera utilisée pour des tests d'activité.

- 1 L de tampon 50 mM MES-KOH pH5,5, 5 mM NiCl₂. La protéine est alors stockée à -80°C et sera utilisée pour des tests d'interaction.

Remarque : Il est impératif d'utiliser de la verrerie en plastique et non en pyrex pendant toutes les étapes de purification afin d'éviter tout relargage de métaux qui pourraient se fixer au site actif de l'enzyme à la place du nickel ¹⁹⁴.

3) Purification de *Vp*16PDF (forme pleinement active)

Des bactéries Rosetta2(DE3)pLysS thermocompétentes sont transformées par choc thermique avec le plasmide pET16b/*Vp*16PDF. Les bactéries transformées sont étalées sur boîte LB agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol et incubées environ 24h à 37°C. Des précultures de 20 mL de milieu LB, contenant 50 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol, sont inoculées à partir d'un clone et incubées durant la nuit à 37°C. Par la suite, 2 L de milieu 2YT contenant 50 µg/mL d'ampicilline et 34 µg/mL de chloramphénicol sont inoculés avec la préculture de façon à avoir DO⁶⁰⁰ = 0,2. La culture est réalisée en utilisant 10 erlens de 2 L contenant chacun 200 mL de culture et est incubée à 37°C sous agitation à 150 rpm. L'expression de la protéine est induite lorsque les bactéries atteignent une DO⁶⁰⁰ = 0,5-0,6, avec l'ajout de 0,5 mM IPTG. On laisse pousser les bactéries 3h à 37°C et 150 rpm, puis on centrifuge la solution bactérienne 20 min à 8000 rpm et 4°C (rotor JA-10, centrifugeuse Beckman Coulter). On resuspend ensuite le culot dans 40 mL de tampon de lyse 50 mM MES-KOH pH 4,0 ; 80 mM NiCl₂. Si besoin, le culot resuspendu peut être conservé à -80°C.

La solution bactérienne est lysée par un casseur de cellules (Microfluidizer), en réalisant 2 passages successifs à 15000 Psi, puis centrifugée 30 min à 15000 rpm (4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est filtré avec une seringue équipée d'un filtre 0,45 μ m afin de s'assurer qu'aucun débris susceptible de boucher les conduits de l'AKTA durant la purification ne soit encore présent.

Le protocole permettant de purifier *Vp*16PDF sous forme active consiste à utiliser des tampons de lyse et de purification à pH4 et avec 80 mM de NiCl₂. Ainsi, le tampon de lyse est le suivant : MES-KOH 50 mM pH4, 80 mM de NiCl₂. L'étape de purification sur colonne SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare life science) est réalisée selon le même protocole que celui

utilisé pour la forme inactive, mais en présence de tampons de composition différente. La colonne est équilibrée avec le tampon de lyse et l'élution se fait avec le tampon 50 mM MES-KOH pH4, 80 mM NiCl₂, 1 M KCl. Les fractions d'élution sont analysées sur gel SDS-PAGE 14% et celles contenant la protéine sont rassemblées. L'échantillon peut alors être concentré jusqu'à environ 5 mL avec les tubes Amicon Ultra 3 kDa-15 mL, à 4000g à 4°C. L'échantillon est alors centrifugé 10min à 15000 rpm à 4°C, afin d'éliminer les protéines précipitées.

La protéine purifiée est finalement dialysée la nuit à 4°C contre :

 - 1 L de tampon 50 mM MES-KOH pH4,0, 80 mM NiCl₂, 50% glycérol. La protéine est alors stockée à -20°C et sera utilisée pour des tests d'activité.

4) Dosage des protéines par la méthode de Bradford

On réalise tout d'abord une gamme étalon avec de la protéine BSA (solution stock 1 mg /mL). Dans des cuves de spectrophotomètre, on ajoute 200 μ L de réactif de Bradford (BioRad), des quantités de BSA allant 1 μ g à 10 μ g, et on complète avec de l'eau jusqu'à un volume final de 1 mL (ajouter du NiCl₂ dans la gamme si la protéine à doser en contient). On mélange bien l'échantillon et on laisse incuber 15 min à température ambiante. On réalise en parallèle de la gamme étalon de BSA, une gamme de la protéine à doser. Pour cela, dans un volume de 1 mL, on ajoute différents volumes de protéines, 200 μ L de réactif de Bradford et on complète avec de l'eau. Après avoir mélangé, on laisse incuber les échantillons 15 min à température ambiante. On réalise alors une mesure de l'absorbance à 595 nm de chacun des échantillons de la gamme étalon ce qui permet de tracer la droite qui relie l'absorbance en fonction de la concentration de protéine contenue dans l'échantillon. On réalise les mêmes mesures d'absorbance avec les échantillons dont la concentration de protéine est inconnue, et on reporte les valeurs sur la courbe de la gamme étalon. On peut alors déterminer la concentration en protéine de l'échantillon.

5) Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée à partir du protocole de Laemmli ²⁶⁶. Le gel d'électrophorèse se compose d'un gel de concentration (3,6% d'acrylamide) et d'un gel de séparation (entre 10% et 15% d'acrylamide selon la taille des protéines que l'on souhaite observer), et contenant 0,1% de SDS. Les gels de concentration et de séparation sont préparés avec le système Mini-PROTEAN de Biorad. Une quantité déterminée de protéines est mélangée avec du tampon de charge (2X : 100mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycérol, 8% β -mercaptoéthanol, 0,1% bleu de bromophénol; pH 6,8) et chauffée

durant 5 min à 95°C. Les échantillons à analyser sont déposés dans les puits du mini-gel, ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder 26616 de Thermo Scientific). La migration s'effectue dans un tampon Tris-Glycine-SDS pH8,3 (25 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, 192 mM Glycine) et se déroule sous une tension de 100V jusqu'à ce que les protéines passent le gel de concentration, puis 200V pour le gel de séparation jusqu'à la sortie du front de migration du gel.

Pour réaliser les gels SDS-PAGE, il faut utiliser un bécher pour préparer la solution pour le gel de séparation (14% acrylamide, 0,378 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,14% APS, 0,1% TEMED) (volume final de 5 mL). On commence par ajouter le tampon Tris, puis l'acrylamide, le SDS, l'APS et l'eau. Ajouter à la fin le TEMED qui va accélérer la réaction de polymérisation. On mélange à la pipette et on dépose doucement la solution entre les deux vitres du Mini-PROTEAN System de Biorad. On ajoute doucement 200 µL d'isopropanol après avoir déposé le gel de séparation afin d'aplanir le niveau et d'éliminer les éventuelles bulles. Il faut ensuite attendre une heure que le gel polymérise. Ensuite on penche le système de façon à évacuer l'isopropanol et on essuie les résidus avec du papier propre. On prépare alors dans un bécher la solution pour le gel de concentration (3,6% acrylamide, 0,12 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1%, SDS, 0,2%, APS, 0,1% TEMED) (volume final 5 mL). Tout comme le gel de séparation, on ajoute le TEMED uniquement à la fin. On dépose alors la solution entre les vitres, au-dessus du gel de séparation préalablement polymérisé, jusqu'à la limite supérieure des vitres. On dépose alors le peigne contenant les puits, entre les deux vitres. Il faut être précautionneux afin de ne pas insérer de bulles dans le gel.

6) Western-blot suivi d'une immunodétection

Préparation des anticorps :

Les anticorps anti-*Vp*16PDF ou anti-*Ec*PDF ont été produits à partir de lapins à l'animalerie de l'INAF au CNRS de Gif-sur-Yvette.

Pour chaque série d'anticorps, 500 μ L de protéine à 1 mg/mL additionnés de 500 μ L d'adjuvant de Freund ont été injectés à deux lapins en parallèle, à J0, J14, J28 et J43 (adjuvant complet pour la première injection, incomplet pour les injections suivantes). Des prélèvements sanguins ont été réalisés dans l'artère médiane à J0 et J37 pour les anticorps anti-*Vp*16PDF, et J0, J36 et J64 pour les anticorps anti-*Ec*PDF Un dernier prélèvement intracardiaque a été effectué à J58 pour les anticorps anti-*Vp*16PDF, et J81 pour les anticorps anti-*Ec*PDF.

Pour chaque prélèvement, il faut récupérer le sérum contenant les anticorps. Pour cela, il faut casser 2-3 pipettes Pasteur en verre à l'intérieur de chacun des tubes de prélèvement et les incuber 1h à 37°C dans une étuve. On centrifuge alors l'échantillon durant 20 min à 2000 rpm à température ambiante et on récupère la partie supérieure du sérum ainsi obtenue. Des aliquotes de 500 μ L sont stockés à -80°C.

Précipitation des anticorps au sulfate d'ammonium :

On décongèle lentement (dans de la glace) les anticorps stockés à -80°C (durant environ 3h). Pour 1 mL d'échantillon, on centrifuge 30 min à 14000 g. On récupère le surnageant et on le précipite avec 40% d'ammonium sulfate (243 mg) pendant 1h à 4°C. On centrifuge de nouveau 1h à 14000 g et on resuspend ensuite le culot avec 1 mL de tampon phosphate (Na₂/Na) 20 mM pH 7,2. On effectue une dialyse toute la nuit contre 500 mL de ce même tampon. On détermine alors la concentration en anticorps (une DO²⁸⁰ de 1,35 correspond à une concentration en IgG de 1 mg/mL).

Produits utilisés pour le Western-blot :

Tampon de transfert : 192 mM Glycine, 25 mM Tris-base, 0,05% SDS, 20% Methanol.

PBS 5X: 750 M NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄.

Tween20 (Sigma P-7949)

Lait en poudre (GE Healthcare)

Membrane PVDF (GE Healthcare)

Anticorps primaires dilués dans un tampon PBS-Tween20 0,3%-lait 0,25% :

Anticorps anti-EcTF: dilution 1: 15000

Anticorps anti-EcMetAP (lapin 361): dilution 1:5000-10000

Anticorps anti-EcPDF (lapin 363): dilution 1:10000

Anticorps anti-Vp16PDF (lapin 342): dilution 1: 5000-10000

Anticorps secondaires dilués dans un tampon PBS-Tween20 0,3%-lait 0,25% :

Goat anti-rabbit IgG-Cy5 : dilution 1 :1000 (Amersham)

Protocole

Le principe du Western-blot est d'identifier une protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps primaires dirigés spécifiquement contre cette protéine. Un anticorps secondaire auquel est greffée une sonde fluorescente, dirigé contre l'anticorps primaire, permet alors de détecter la protéine par fluorescence. Les échantillons sont déposés sur gel SDS-PAGE à 15% d'acrylamide (voir électrophorèse en conditions dénaturantes). La migration se fait à 100V, dans un tampon Tris-Glycine-SDS. Le gel est alors récupéré et rincé dans du tampon de transfert après élimination du stacking (gel de concentration). Le sandwich permettant le transfert des protéines depuis le gel vers la membrane est réalisé, en appliquant le gel contre un morceau de membrane PVDF préalablement activée dans du méthanol, le tout entre plusieurs feuilles de papier Whatman. L'ensemble est placé dans une cassette, laquelle est placée dans la cuve remplie de tampon de transfert. Un courant constant de 30V est appliqué durant la nuit en chambre froide. Le transfert effectif des protéines sur la membrane est aisément vérifiable grâce à l'utilisation de marqueurs de poids moléculaires colorés (ThermoFisher Prestained protein ladder 26616).

La membrane est ensuite récupérée et lavée rapidement à l'eau puis avec du tampon PBS 1X. La saturation de la membrane permettant d'éviter la fixation aspécifique des anticorps est effectuée pendant 5h à 4°C dans un tampon PBS, Tween20 0,3% et 5% d'agent bloquant (Amersham ECL blocking agent). La membrane est ensuite lavée avec du tampon PBS 1X, Tween20 0,3% durant 30 min à 4°C, puis incubée la nuit à 4°C en présence d'anticorps primaire dilué dans du tampon PBS 1X, Tween20 0,3%, agent bloquant 0,25%. La membrane est lavée 5 fois 10 min avec du tampon PBS 1X, Tween20 0,3%, agent bloquant 0,25% avant d'incuber à l'obscurité durant 3h en présence des anticorps secondaires (Ig-Cy5-Anti rabbit Amersham, dilué 1000 fois). La membrane est alors lavée 3 fois avec du tampon PBS 1X, Tween20 0,3%, lait 0,25%, puis 2 fois 10 min dans du tampon PBS1X, Tween20 0,3%, et enfin une dernière fois dans du PBS 1X. Après séchage, la fluorescence de la membrane peut être révélée. Nous utilisons au laboratoire l'appareil PharosFX Molecular Imager de BIO-RAD pour la révélation. Nous utilisons le logiciel Quantity One en mode « basic » pour quantifier le signal de fluorescence. Avec l'option « rect tool » nous traçons un cadre autour des bandes à quantifier ainsi qu'un cadre ne contenant aucune bande, afin d'obtenir le signal de bruit de fond. Le signal de fluorescence à l'intérieur de chaque cadre est alors quantifié. Les valeurs ainsi obtenues sont rentrées dans le logiciel Excel afin de réaliser un traitement des données.

B.2 Mesure de l'activité peptide deformylase

L'activité des enzymes PDF est mesurée par un test cinétique spectrophotométrique ²³¹. La réaction catalysée par l'enzyme PDF est couplée à la réaction catalysée par l'enzyme formate déshydrogénase (FDH) selon les deux réactions suivantes :

Peptide déformylase

N-formyl-Met-X + $H_2O \rightarrow formate + Met-X$

puis

Formate dehydrogenase

$\underline{Formate} + NAD^+ + H_2O \rightarrow H_2CO_3 + NADH$

où N-formyl-Met-X (ou fMX) est un peptide synthétique de longueur variable et possédant une méthionine initiatrice formylée, NAD⁺ est le produit de la réaction de déformylation (la nicotinamide adénine dinucléotide sous forme oxydée) et le NADH sous forme réduite (produit de la réaction de la formate déhydrogenase). Le peptide couramment utilisé au laboratoire est le N-formyl-Met-Ala-Ser ou fMAS.

La quantité de peptide déformylé est proportionnelle à la quantité de NADH formé, avec une stoechiométrie 1:1. La mesure de l'absorbance du NADH à 340 nm au cours du temps permet donc de mesurer directement le taux de déformylation de la méthionine et donc l'activité de l'enzyme. $A_{340} = \dot{\epsilon}^{\text{NADH-340nm}} x$ [PDF] x l où $\dot{\epsilon}$ est le coefficient d'extinction molaire du NADH ($\dot{\epsilon}^{\text{NADH-340nm}} = 6220 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$ ou M⁻¹.cm⁻¹) et l la longueur du trajet optique de la cuve (1 cm). Ainsi, cette équation permet le calcul théorique de la variation d'absorbance observable pour une concentration en substrat donnée. Une gamme de concentration en fMAS allant de 0 mM à 10 mM est ainsi réalisée afin de mesurer la vitesse initiale de réaction (v_i) de Vp16PDF en fonction de la concentration en substrat ($v_i = A_{340}.\text{min}^{-1}$). La courbe $v_i = f([fMAS])$ est alors tracée grâce au module Kinetics de SigmaPlot selon l'équation de Michaëlis-Menten et/ou Lineweaver-Burke. Cela permet de déterminer les constantes V_{max} (A_{340}/min) et K_m (mM). Le k_{cat} est ensuite calculé selon l'équation $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / ([PDF] x 60 x \dot{\epsilon}^{\text{NADH-340nm}})$.

1) Matériel et solutions

Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz de 200 µL préalablement nettoyées avec de l'acide sulfochromique. La longueur du trajet optique est de 1 cm. Le spectrophotomètre Ultraspec2100Pro (GE Healthcare) utilisé possède un portoir de 6 cuves à effet Peltier ainsi qu'une unité de contrôle de la température. Le spectrophotomètre est contrôlé par le logiciel SWIFT II.

Les solutions stocks utilisées pour le mélange réactionnel sont : 1M Hepes-KOH pH 7,5 ; 10 mg/mL BSA (pour limiter la fixation aspécifique de l'enzyme sur les parois de la cuve); NAD⁺ 32 mM (Roche) ; 180 U/mL FDH (Sigma, ref F8649-250UN) ; 200 mM fMAS (Bachem, ref H-6210 250 mg) ; 10 mM NiCl₂. Toutes les solutions sont préparées dans de l'eau. L'enzyme *Vp*16PDF est conservée à -20°C, dans un tampon 50 mM MES-KOH pH4 ; 80 mM NiCl₂; 50% glycérol. Une dilution intermédiaire de la PDF à 2-5 μ M dans un tampon 50 mM MES-KOH pH4, 80 mM NiCl₂ est préparée extemporanément et conservée dans la glace pour la journée. L'enzyme conservée dans le tampon 50 mM MES pH5,5 et 5 mM NiCl₂ a également été testée, après avoir réalisé une dilution intermédiaire à 2-5 μ M.

2) Protocole

Chaque mélange réactionnel de 200 µL est préparé dans un tube Eppendorf contenant: HEPES-KOH 50 mM pH 7,5, NiCl₂ 1 mM, NAD⁺ 12 mM, FDH 4,5 U/mL, *Vp*16PDF 100 nM (pour les tests réalisés avec les extraits brut, 10 µL de fraction soluble à 0,5 µg/µl sont ajoutés) . Le mélange réactionnel est ensuite transvasé dans une cuve, laquelle est insérée dans le spectrophotomètre préalablement chauffé à 37°C ; 6 conditions expérimentales peuvent être testées en même temps grâce au portoir de cuves contenant 6 emplacements. La réaction est déclenchée par l'ajout du substrat fMAS après 2 min d'incubation dans le spectrophotomètre (le tripeptide est remplacé par de l'eau pour le blanc) et l'absorbance à 340 nm est mesurée pendant 10 min à 37°C. Une gamme de concentration en fMAS allant de 0 mM à 10 mM est réalisée afin de mesurer la vitesse initiale de réaction (*v*_i) de *Vp*16PDF en fonction de la concentration en substrat. La courbe *v*_i = f([fMAS]) est alors tracée selon l'équation de Michaëlis-Menten et/ou Lineweaver-Burke. On détermine ainsi les constantes *V*_{max} (mmol/min) et *K*_m (mM). Le *k*_{cat} est ensuite calculé selon l'équation *k*_{cat} = *V*_{max} / ([PDF] x 60 x $\dot{\epsilon}^{NADH-340nm}$) avec $\dot{\epsilon}^{NADH-340nm} = 6220 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3) Test d'inhibition de Vp16PDF en présence d'actinonine

L'inhibition de *Vp*16PDF par l'actinonine a été mesurée par le test d'activité décrit cidessus, selon un protocole légèrement modifié : les concentrations en PDF et substrat sont constantes, l'actinonine (resuspendue dans de l'éthanol 100%) est ajoutée à des concentrations variables et la réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout du substrat. Pour déterminer les valeurs d'IC₅₀ et de K_{I^*app} : Le mélange réactionnel contenant *Vp*16PDF et l'actinonine est incubé 10 min à 37°C puis transféré dans une cuve, laquelle est alors insérée dans le spectrophotomètre maintenu à 37°C. Après 2 min d'incubation, le substrat est ajouté et la cinétique mesurée par la détection de l'absorbance à 340 nm. La gamme de concentration d'actinonine testée s'étend de 0 à 800 nM.

Pour déterminer la valeur du K_{I} , on utilise le même protocole que le test d'activité décrit précédemment, mais l'actinonine est ajoutée au mélange réactionnel. Aucune préincubation du

complexe enzyme/inhibiteur n'a lieu. Le mélange contient d'abord le substrat et l'inhibiteur, l'enzyme est ajoutée ensuite pour déclencher la réaction. La gamme de concentration d'actinonine testée s'étend de 0 à 800 nM.

B.3 Etudes sur les conséquences in vivo de l'expression de Vp16PDF

1) Souches

Les souches d'E. coli utilisées dans cette partie sont répertoriées dans le Tableau MM-8.

Tableau MM-8 : Souches utilisées pour les tests de complémentation fonctionnelle, test de croissance et extraction d'agrégats.

Souche	Génotype	Source
Complémentation fonctionnelle		
PAL421Tr	galK rpsL fms∆1 recA56 srl-300 ::Tn10	Meinnel <i>et al.</i> , 1994 226
Extraction des agrégats et tests de	croissance	
W3110	F ⁻ lambda ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 rph-1	P. Genevaux
MG1655	"wild type" K-12 strain : $F^{-}\lambda^{-}ilvG$ - rfb-50 rph-1	P. Genevaux
MG1655∆secB	$F^{-}\lambda^{-}$ ilvG- rfb-50 rph-1 $\Delta SecB$	P. Genevaux
MG1655∆ <i>tig</i>	$F^{-}\lambda^{-}$ ilvG- rfb-50 rph-1 Δ tig	P. Genevaux
MG1655 $\Delta tig/\Delta secB$	$F^{-}\lambda^{-}$ ilvG- rfb-50 rph-1 Δ SecB/ Δ tig	P. Genevaux
A1119	W3110 Delta protéases Lon, ClpP, ClpQY	P. Genevaux
A722 Jm101Tr	W3110 wild type	P. Genevaux
	F' traD36 pro A^+B^+ lac $I^q \Delta(lacZ)M15/\Delta(lac-proAB)$ glnV thi recA56 srl-300 ::Tn10	Hirel <i>et al</i> , 1988

2) Complémentation fonctionnelle

Le principe de la complémentation fonctionnelle de Vp16PDF est d'utiliser une souche de bactérie *E. coli* dont le gène *def* codant *Ec*PDF a été délété, et de le remplacer par le gène codant la déformylase de Vp16T via un plasmide pBAD inductible à l'arabinose, afin d'observer si l'enzyme exprimée permet aux bactéries de survivre, et donc de restaurer la croissance. La souche de bactérie utilisée pour les expériences de complémentation est la souche PAL421Tr, dont le gène chromosomique de déformylase est délété, et qui contient un plasmide pMAK-705-*Ec*PDF contenant le gène de déformylase endogène. Ce plasmide est thermosensible, ce qui permet de contrôler sa capacité à se répliquer, en fonction de la température. Cette souche est alors transforméeavec un plasmide pBAD/*Myc*-HisA contenant le gène codant la protéine d'intérêt.

Une culture liquide de 100 mL de bactéries PAL421Tr transformée avec l'une ou l'autre des différentes constructions contenues dans un plasmide pBAD/Myc-HisA est réalisée en milieu LB contenant de l'ampicilline à 25 µg/mL, et incubée à 30°C jusqu'à ce que la densité optique des cultures soit $DO^{600} = 1$. On prélève alors 10 mL de chaque échantillon dans un tube Falcon (dans le cas où de légères variations de densité optique seraient observées entre des souches transformées avec des constructions différentes, on dilue avec du milieu LB liquide les cultures de façon à ce qu'elles possèdent toutes exactement la même DO⁶⁰⁰ dans les 10mL). Les échantillons sont alors centrifugés à 4400 rpm durant 15 min à 4°C, de façon à obtenir un culot. Ce culot est alors resuspendu dans 1 mL de milieu LB liquide. Pour chacune des souches, on réalise alors une série de dilutions successives au dixième sur une plaque 96 puits (Figure MM-1). On dépose, par la suite, sur un milieu nutritif LB gélosé une goutte de 10 µL de chacune des dilutions, pour chacune des souches utilisées, afin de déposer de moins en moins de bactéries au fil des dilutions (Figure MM1). Le dépôt des gouttes se fait sur boîte LB agar supplémenté avec 0,5% de glucose (pour inhiber l'expression du pBAD) et en parallèle sur boîtes supplémentées avec des concentrations d'arabinose allant de 0,2% à 2%, et cultivées à 30°C ou 42°C (voir Figure MM-1).

Matériels et Méthodes

A-Préparation des cellules bactériennes



Figure MM-1 : Expérience de complémentation fonctionnelle. A) Culture de bactéries PAL421Tr transformées avec un plasmide pBAD contenant le gène de la PDF d'intérêt. **B**) Préparation des dilutions de culture. **C**) Dépôt des gouttes sur boîte et incubation.

2) Effet de l'expression de Vp16PDF sur la croissance des bactéries

Cette expérience a pour objectif d'observer si l'expression de la protéine Vp16PDF modifie la cinétique de croissance des bactéries, en fonction de la souche bactérienne testée et de la température d'incubation utilisée. Pour cela, différentes souches de bactéries d'expression (voir tableau MM-8) ont été transformées (soit avec un plasmide pBAD vide, soit avec le plasmide pBAD/*EcPDF*, soit avec le plasmide pBAD/*Vp*16PDF) et étalées sur boîtes LB agar avec 100 µg/mL d'ampicilline, et incubées durant la nuit à 37°C. Des précultures de 5mL de LB sont inoculées avec un clone et mises en incubation à 37°C durant la nuit sous agitation, dans un milieu LB avec ampicilline (pour chaque construction transformée, un clone est testé). Le lendemain, des fioles contenant 100 mL de milieu 2YT sont inoculées avec 200 µL de préculture, et cela pour chaque construction. On ajoute le ou les antibiotiques appropriés, ainsi qu'une concentration finale de 2% d'arabinose (permet l'induction de la protéine exprimée par le pBAD) pour chaque culture. Les cultures bactériennes sont alors mises à incuber à différentes températures (28°C, 30°C ,37°C ou 42°C). Une mesure de l'absorbance à 600 nm est réalisée toutes les heures afin de pouvoir tracer une cinétique de croissance bactérienne.

3) Extraction d'agrégats des cellules bactériennes

Les agrégats de protéines ont été isolés en utilisant la méthode de Tomoyasu ²⁶⁸.

NB : l'ensemble des étapes de ce protocole doit être effectué dans un mélange d'eau froide et de glace.

Tampons nécessaires pour l'extraction des agrégats :

Tampon A : 10 mM KH₂PO₄ pH6,5 (à partir d'un stock à 0,5 M), 1 mM EDTA, 20% sucrose, 2 mg/mL de lysozyme. La solution est préparée le jour même.

Tampon B : 10 mM KH₂PO₄ pH6,5 ; 1 mM EDTA.

Protocole d'extraction des agrégats à partir de différentes souches de bactéries

Les souches utilisées sont présentées dans le tableau MM-8 (la souche Jm101Tr n'a pas été utilsée pour l'extraction des agrégats mais seulement pour les tests de croissance) ; elles sont toutes transformées avec le plasmide pBAD ou pBAD/*Vp*16PDF ou pBAD/*Ec*PDF.

Les bactéries sont mises en préculture dans 4 mL de milieu LB avec 0,5% de glucose, durant la nuit à 30°C, sous agitation constante (180 rpm). Cette préculture est utilisée pour ensemencer 50 mL de milieu LB avec une DO⁶⁰⁰ initiale de 0,04, le milieu contenant de l'ampicilline (50 μ g/mL) et 2% arabinose. La culture se fait à 30°C, sous agitation constante (180 rpm). Lorsque
la DO⁶⁰⁰ atteint 1 unité d'absorbance ou après 6h, la culture est mise 15-20 min dans un mélange eau/glace. On prélève ensuite la quantité nécessaire de bactéries pour avoir une DO⁶⁰⁰ égale à 1 en suivant la formule suivante : $1 / DO^{600} x 16 =$ volume à prélever (mL).

L'échantillon est centrifugé 15 min à 6000 g (4°C), dans des tubes Falcon de 50 mL. On évacue le surnageant et on resuspend le culot dans 120 μ L de tampon A, puis on laisse reposer 30 min dans l'eau/glace. Par la suite, 1080 μ L de tampon B sont ajoutés, la solution est mélangée par retournement, puis transférée dans un tube Eppendorf de 2 mL. La solution de bactéries est alors déposée dans un bécher contenant un mélange glace/eau et lysée par sonication en réalisant deux cycles de 10 pulsations par échantillon, avec une minute de repos entre chaque série de pulsation (en utilisant 50% de puissance avec l'appareil Sonifier cell disruptor 200 de Branson). L'échantillon est soumis à deux sonications, avec une minute de repos dans la glace entre les deux sessions de pulsations. La solution de lyse est ensuite centrifugée 15 min à 2000 g (4°C). Le surnageant est transféré dans un autre tube Eppendorf (un aliquote de 100 μ L est prélevé afin de réaliser un dosage des protéines (voir dosage par la méthode de Bradford) et une analyse sur gel SDS-PAGE, afin de vérifier que les différents échantillons testés contiennent la même quantité de protéines. Le surnageant est alors centrifugé 25 min à 14000g (4°C), le surnagent éliminé, puis le culot est centrifugé encore 2 min pour éliminer le reste de surnagent. Enfin le culot est congelé à -80°C pour la nuit.

Le lendemain, le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon B, puis soniqué suivant les mêmes conditions que pour la lyse. L'échantillon est alors centrifugé 25 min à 14000 g (4°C), puis le culot est resuspendu dans 960 μ L de tampon B. La suspension est de nouveau soniquée suivant les conditions décrites précédemment, mais en utilisant cette fois deux sessions de 8 pulsations. On ajoute 240 μ L de solution NonidetP-40 10% puis on vortexe.

Les tubes sont mis à centrifuger 35 min à 14000 g, puis le culot est resuspendu dans 960 μ L de tampon B et soniqué deux fois avec 8 pulsations. On ajoute à nouveau 240 μ L de solution NonidetP-40 à 10%, puis on vortexe. On centrifuge une dernière fois l'échantillon durant 35 min à 14000 g (4°C). Le culot est alors resuspendu dans 40 μ L de tampon de charge 1X et utilisé pour diffèrent expériences. En général, 20 μ L sont analysés sur gel SDS-PAGE 15%, avec coloration au bleu de Coomassie ou Sypro Ruby pour visualisation des protéines globales des agrégats. Les échantillons peuvent également être analysés par Western-blot afin de visualiser spécifiquement la présence de certaines protéines. Dans ce cas, il faut également charger 20 μ L par puits d'échantillon sur un gel SDS-PAGE 15%. On réalise ensuite le

protocole du Western-blot (voir partie Western-blot), avec des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt.

4) Préparation des échantillons d'agrégats protéiques pour une analyse en spectrométrie de masse : digestion trypsique d'échantillons issus d'un gel SDS-PAGE.

L'objectif de cette expérience est d'identifier les espèces protéiques présentes dans un échantillon d'agrégats cellulaires. Sur les 40 μ L d'échantillon obtenus après extraction des agrégats, 20 μ L sont analysés sur gel SDS-PAGE 15% pour visualisation des protéines globales des agrégats, et le gel est coloré avec du SYPRO Ruby (Thermofisher). Pour chaque échantillon déposé sur gel, le profil de migration est analysé et les bandes révélées sont minutieusement découpées pour ensuite être traitées pour une analyse en spectrométrie de masse.

La découpe des bandes se fait sur une plaque de révélation UV, préalablement recouverte de film plastique pour éviter toute forme de contamination. Il est nécessaire d'utiliser des tubes Eppendorf préalablement traités à l'acétonitrile (afin de dissoudre les éventuels contaminants) pour récupérer les échantillons. Il est également important de se munir de gants propres et d'une charlotte pour éviter les contaminations par la kératine. Pour chaque bande découpée, un scalpel propre doit être utilisé.

Solutions utilisées :

- Solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM (solution AB) : 198 g de bicarbonate d'ammonium; 50 mL d'eau pour HPLC (ne pas utiliser d'eau MQ).
- Solution de DTT à 10 mM : diluer le DTT (stock à 1 M, masse moléculaire = 154,25 g/mol) dans 1mL de solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM.
- Solution d'iodoacétamide (55 mM): diluer l'iodoacétamide (stock à 100 mM) dans une solution de bicarbonate d'ammonium à 50 mM.
- Solution de bicarbonate d'ammonium avec 5% d'acétonitrile : diluer 50 μ L d'acétonitrile pur dans 950 μ L de bicarbonate d'ammonium à 50 mM.
- Solution de trypsine : Trypsine PROMEGA (20 μg) dilué dans 400 μL de solution de réhydratation PROMEGA (Ref V5280).

Protocole :

Pour un échantillon migré sur gel SDS-PAGE, chaque bande protéique est découpée. Chacune des bandes est déposée dans un tube Eppendorf puis découpée en cubes de 1-2mm x 1-2mm x 1mm à l'aide d'une lame de scalpel. On ajoute alors 20 à 100 µL d'acétonitrile 100% Matériels et Méthodes

durant 10 min pour déshydrater le gel, puis on retire le liquide. S'en suit une étape de réduction des échantillons, durant laquelle on ajoute 20 à 100 µL (suivant le volume de la bande découpée) de solution de bicarbonate d'ammonium (50 mM) contenant 10 mM de DTT durant 1h à 37°C, en agitant les tubes occasionnellement mais vigoureusement. Le liquide est ensuite évacué. On poursuit sur une étape d'alkylation, où l'on va ajouter une solution d'iodoacétamide (55 mM) en utilisant le même volume que celui ajouté lors de l'étape de réduction. Puis, les échantillons sont incubés 30 à 60 min à l'abri de la lumière, en prenant soin d'agiter occasionnellement et énergiquement. On évacue ensuite le liquide. On recommence l'étape de déshydratation, en ajoutant 20-100 µL de solution d'acétonitrile durant 10 min, puis on évacue le surnageant. On peut alors réhydrater les échantillons en les laissant reposer durant 20 min dans 20-100 µL de solution AB, suivi d'une nouvelle déshydratation avec 20-100 µL d'acétonitrile 100% durant 10 min. On évacue ensuite le liquide. Les morceaux de gel sont alors lavés dans 50-200 µL de solution de bicarbonate d'ammonium, et le liquide est retiré. Les échantillons sont de nouveau déshydratés durant 10 min avec 50-200 µL d'acétonitrile, puis on évacue les résidus d'acétonitrile en plaçant les échantillons durant 30 min à 1h dans un SpeedVac (cela permet d'évacuer les résidus d'acétonitrile, néfastes pour l'étape de digestion à la trypsine). Les échantillons sont ensuite digérés avec 2 µL de solution de trypsine, en laissant le temps aux morceaux de gel de se réhydrater, à 0°C.

Lorsque les échantillons ont absorbé la solution de trypsine, on ajoute 10-100 µL de solution de bicarbonate d'ammonium contenant 5% d'acétonitrile pour réhydrater complètement les morceaux de gel. Les tubes sont mis à incuber durant 15 min (on peut ajouter plus de solution, le but étant que les morceaux de gel soient complètement réhydratés, en évitant d'avoir un surplus de surnageant). L'étape de digestion se déroule ensuite durant 1 à 2h à 37°C dans un thermomixeur à 600 rpm. A l'issue de la digestion, on ajoute 2-10 µL de solution 1% FA (acide formique) ou 0,1% TFA (acide trifluoroacétique), dilué dans de l'eau, si l'extraction doit être faite le lendemain. Sinon, on passe directement à l'étape de première extraction, qui consiste à récupérer le surnageant et le transférer dans un nouveau tube, auquel on ajoute 10-50 µL d'une solution 1% FA. On incube l'échantillon durant 20-30 min à température ambiante en agitant occasionnellement. On réalise ensuite la seconde extraction, qui consiste à ajouter 10-50µL de solution 80% acétonitrile, 0,1% FA et on incube durant 20-30 min à température ambiante en agitant occasionnellement et vigoureusement. On récupère alors le surnageant que l'on ajoute à la fraction précédente. On garde les morceaux de gel jusqu'à ce que les analyses de spectrométrie de masse aient été effectuées. Les tubes contenant le surnageant sont mis dans

un concentrateur SpeedVac, afin d'évaporer le liquide et sécher les échantillons (pas de chauffage requis). On ajoute alors 10 μ L d'eau pour resuspendre le matériel, et on replace les tubes dans la centrifugeuse sous vide afin d'obtenir seulement 2 μ L de liquide dans le tube. Pour finir, on resuspend l'échantillon dans 10-50 μ L de solvant A (5% acétonitrile, 0,1% FA).

B.4 Etudes des interactions avec le ribosome

1) Préparation de ribosomes 70S d'E. coli

Matériel et Solutions

-Centrifuge Beckman rotor JA20

-Rotors : rotor 70Ti ou 50.2Ti pour ultracentrifugeuse (Beckman Coulter ref 337922)

-Tubes pour l'ultracentrifugation en polycarbonate aluminium (ref 355618 Beckman) adaptés aux rotors 70Ti (Beckman Coulter) et 50.2Ti

-La paillasse et les pipettes sont nettoyées avec une solution anti-RNAse (Ambion #9780).

Composition des différents tampons et milieu de culture

-Tous les tampons sont préparés au plus tôt quelques jours en avance, filtrés sur des filtres de $0.22 \ \mu m$ et stockés à 4°C.

-7 Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 8,000 Wet in 0.1% sodium azide (no ref. 734-0614, VWR)

-Ammonium chloride A9434-1KG (Sigma)

-Lysozyme 62970-5G-F (Sigma)

-Potassium chloride P9541-500G (Sigma)

-Sucrose molecular biology grade RNase-free S0389-1KG (Sigma)

-Complete, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Cat. No. 11 873 580 001 (20

tablets) or Cat. No. 05 056 489 001 (3x20 tablets) (Roche)

-DNase I FPLC pure, Product number: 27-0514 (Amersham Biosciences)

-PBS 10X sterile Molecular biology: biosolve CAT N° 16232321

Composition après dilution

-PBS 1X : 10 mM sodium phosphate ; 1,8 mM potassium phosphate ; 137 mM sodium chloride;

2,7 mM potassium chloride ; pH 7,4 (25°C). Filtré avec filtres de 0,22 $\mu m.$

Tampons RSP	Tris-HCl	MgCl ₂	NH4Cl	KCl	Sucrose	Autre
RSP	25 mM	10 mM	50 mM			7 mM β-mercaptoethanol (ajouté à la dernière minute)
RSP-10%	25 mM	10 mM	50 mM		10%	1 mM pefabloc + 0,5 mg/mL lysozyme (Roche)
RSP-18% A	25 mM	10 mM	0,5 M		18%	
RSP-18% B	25 mM	10 mM	1 M		18%	
RSP-low Mg	50 mM	1 mM	30 mM	30 mM		
RSP-20%	50 mM	0,5 mM	30 mM	30 mM	20%	
RSP-30%	50 mM	13 mM	30 mM	30 mM	30%	

Tableau MM-9 : Composition des tampons RSP pour la purification des ribosomes 70S d'E. coli.

Protocole de purification des ribosomes d'E. coli

La souche de bactéries *E. coli* MRE600 (souche déficiente en RNase, voir ²⁶⁹) est utilisée pour cette purification. Cette souche ne contenant pas de plasmide portant une résistance à un antibiotique, il est très important de prendre des précautions lors de la culture afin de ne pas avoir de contamination.

La souche MRE600 (conservée en glycérol à -80°C) est mise en préculture (7 mL) pendant 12h, à 37°C et sous agitation constante (180 rpm). Cette préculture est utilisée pour ensemencer 3,2 L de milieu LB répartis dans 4 erlens de 3L (1mL de préculture à $DO^{600} \sim 5$ -6 pour 800 mL de milieu), qui sont ensuite mis sous agitation constante (180pm) à 37°C. Lorsque la DO^{600} atteint 2,7 à 2,9 unités d'absorbance (il est important de ne pas dépasser ces valeurs, pour que la culture soit en phase exponentielle), la culture est arrêtée en mettant les erlens dans la glace durant 20 min (run on) puis centrifugée pendant 30 min à 6000 rpm à 4°C (JA10, Beckman); entre 10 et 12 g de bactéries sont ainsi récoltées. Les culots bactériens sont lavés délicatement avec ~7 volumes de PBS 1X froid pour 1g de cellules. La resuspension se fait avec une pipette de 10 mL en évitant de faire des bulles. Généralement, on ajoute 50 mL de tampon dans le premier tube et après resuspension on transfert dans le deuxième tube, et ainsi de suite jusqu'au dernier tube. Tous les tubes, de manière séquentielle, sont enfin lavés avec le reste de tampon, que l'on ajoute à la solution initiale. Les bactéries et les solutions doivent être maintenues constamment dans la glace. Les cellules resuspendues sont distribuées dans deux tubes Falcons de 50 mL puis centrifugées 10-20 min à 6000 rpm 4°C (rotor « swinging centrifuge »).

Le culot bactérien est resuspendu dans la glace (en utilisant une tige de verre arrondie) dans 15 mL de tampon RSP-10%. Pour faciliter la resuspension les cellules sont mises à agiter

doucement dans une chambre froide jusqu'à complète suspension. La solution de bactéries (~25mL) est additionnée de tampon RSP-10% sucrose jusqu'à un volume final de 50 mL.

Deux méthodes de lyse ont été utilisées. La plupart des purifications de ribosomes ont été obtenues par sonication des cellules mais l'utilisation d'un « cell distruptor (voir ci-dessous) a également été essayée.

Sonication

La lyse est effectuée par Sonication (Branson Digital Sonifer). Pour 50 mL de cellules resuspendues on utilise un bécher de 100 mL en plastique (nettoyé avec de l'éthanol) et déposé dans un bécher en verre de 1 L contenant un mélange d'eau et de glace.

Les conditions de sonication sont les suivantes:

Temps	3'
Température max	11°C
Amplitude	60%
Pulsation	5"
Intervalle	30"
Température pulsation	7°C
Température sonde	3°C

Dans le cas où nous avons utilisé le Sonicator (Sonifier cell disruptor 200 de Branson) dont nous ne pouvons pas contrôler tous les paramètres, la sonication a été effectuée par des pulsations de 5 sec avec des intervalles de 55 sec pour un temps total de pulsation de 3 min (donc 36 pulsations de 5 sec d'intervalle avec des pauses de 55 sec).

- Lyse des cellules avec le Cell Distruptor

Dans les cas où nous avons utilisé le Cell Distruptor, nous avons effectué 8 passages de l'échantillon dans le microfluidizer, avec une pression de 20 kpsi (après chaque passage, on récupère l'échantillon puis on le réinjecte dans la machine).

L'échantillon est ensuite centrifugé dans deux tubes, 30 min à 19000 rpm 4°C (Beckman rotor JA20) pour éliminer les membranes. Le surnageant est collecté dans un tube de 50 mL auquel on ajoute de la DNase à 1 mg/mL final (moitié d'une petite spatule, ne pas doser car très volatile) ; partagé dans deux tubes froids d'ultracentrifugeuse de 25 mL (no ref 355618

Beckman – les tubes sont adaptés pour les rotors type 70 Ti et type 50.2 Ti) et centrifugé 3h30 à 50000 rpm 4°C (rotor 70 Ti).

- Lavage I

Les culots sont resuspendus sous agitation douce (ne pas essayer d'obtenir une solution homogène) à 4°C pendant 30 min dans 20 mL de tampon RSP, puis déposés au fond du tube. On ajoute ensuite au fond du tube une solution RSP-18% A (le tout est réparti dans 2 tubes). Plus précisément, en utilisant une seringue à pointe plate contenant 13 mL de solution pour éviter des bulles et positionnée au fond du tube. Les tubes sont équilibrés avec du tampon RSP + 1mM Pefabloc et centrifugés pendant 16h à 25000 rpm ou 4h à 45000 rpm 4°C (Optima 70 Ti). Le surnageant est éliminé ainsi que la couche marron proche du culot.

- Lavage II

Les culots sont ensuite resuspendus sous agitation douce 30 min avec une tige de verre ou la nuit (shaking platform à 100-150 rpm) à 4°C dans 10 mL de tampon RSP, puis centrifugés 20 min à 17000 rpm (4°C); cette étape de centrifugation est répétée 2-3 fois. Dans un tube, 10 mL de surnageant sont alors déposés suivi par 12,5 mL d'une solution RSP-18% sucrose contenant 1M NH₄Cl. La même procédure que celle décrit dans « lavage I » est utilisée pour charger. Centrifuger 3h à 50000 rpm (ou 3h30 à 40 000 rpm) dans un rotor 70 Ti (Optima), 4°C.

Les culots sont resupendus dans 10 mL de tampon RSP sous agitation douce (sans chercher à obtenir une solution homogène) pendant 30 min ou la nuit à 4°C (shaker 150 rpm).

- Lavage III (facultatif)

Le surnageant est centrifugé 20 min à 18000 rpm (JA20, Beckman), puis on le dépose au fond d'une solution RSP-18% B, comme dans le lavage I. Centrifuger a 40000 rpm 3h30 ou 24000 rpm la nuit à 4°C.

Les culots sont resupendus 30 min (150 rmp) à 4°C dans 3 mL de tampon RSP low Mg (ne pas essayer d'obtenir une solution homogène). On centrifuge alors à 18000 rpm 20 min (JA20 Beckman, 4°C).

Le surnageant est ensuite déposé sur une bicouche de sucrose (couche supérieure composée de 12,5 mL de tampon RSP-20%; couche inférieure composée de 5 mL de tampon RSP-30%). Le dépôt de l'échantillon et des deux couches se fait dans l'ordre suivant : 1) échantillon, 2) tampon RSP-20% et 3) tampon RSP-30%. Après une centrifugation de 5h à 50000 rpm ou la nuit à 28000 rpm (4°C), les culots sont repris délicatement dans 3mL de tampon 50 mM Tris-

HCl, 50 mM NH₄Cl, 50 mM MgCl₂, 7 mM β -mercaptoethanol. La resuspension se fait avec une tige de verre et une agitation douce à 150 rpm la nuit à 4°C si besoin. Enfin, les ribosomes resuspendus sont dialysés la nuit à 4°C contre environ 100 mL de tampon contenant 50% de glycérol, 50 mM Tris-HCl, 10 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 7mM β -mercaptoethanol ou 2 mM DTT.

La concentration de ribosomes purifiés est mesurée avant et après la dialyse (après dialyse l'échantillon est dilué au moins 1000-1500 fois pour le dosage) par mesure d'absorbance à 260 nm dans 1 mL, en utilisant les données suivantes : 15 unités d'absorbance (^{A260}) correspondent à 1 mg de 70S, 1 A²⁶⁰ correspond à 25 pmol/mL de 70S.

La concentration de ribosome typique est entre 10 et 20 $\mu M.$

2) Préparation de ribosomes 70S de Thermus thermophilus

Matériel et Solutions

Les tampons utilisés pour la purification des ribosomes de *T. thermophilus* (listés cidessous) sont préparés le matin du premier jour.

L'indice de réfraction de chacune des solutions est mesuré avec un réfractomètre ATAGO Abbe, ce qui permet de vérifier que la composition des tampons est exactement la même d'une purification à une autre.

<u>Tampon A</u> (500mL): 100mM NH₄Cl; Mg(CH₃COO)₂, 10,5 mM; 20 mM HEPES-KOH pH7.5 ; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mM benzamidine; ajouter un peu de PMSF dissout dans 100 μ L d'acétone, juste avant la lyse.

<u>Tampon B</u> (200 mL) (Indice de réfraction : 1,394) : 1,1 M Sucrose; 0,5 M KCl; 10,5 mM Mg(CH₃COO)₂; 0,5 mM EDTA; 20 mM HEPES-KOH pH 7,5 ; 1mM DTT.

<u>Tampon C</u> (1,5 L) (Indice de réfraction : 1,365): 1,5 M Ammonium sulfate; 10 mM Mg(CH₃COO)₂; 400 mM KCl; 20 mM HEPES-KOH pH 7,5 ; 1mM DTT.

<u>Tampon D</u> (1 L) (Indice de réfraction : 1,338): Mg(CH₃COO)₂ 10 mM; 400 mM KCl; 20 mM HEPES-KOH pH7,5; 20 mM DTT.

Tampon E 5X (250mL): 250 mM KCl; 50mM NH₄Cl, 51,25mM MgAcetate; 1,25 mM EDTA; 50 mM HEPES-KOH pH7,5 ; 5 mM DTT.

Solution à 5% de sucrose (300 mL) (Indice de réfraction : 1,3413): 30 mL de sucrose 50% + 60 mL de tampon E 5X (60 mL) + 210 mL d'H₂O.

Solution à 20% de sucrose (300 mL) (Indice de réfraction : 1,3630):): 120 mL de sucrose 50% + 60 mL de tampon E 5X (60 mL) + 120 mL d'H₂O.

<u>Tampon G</u> (100mL) : 10 mM Mg(CH₃COO)₂; 50 mM KCl; 10 mM NH₄Cl; 50 mM HEPES-KOHpH7,5 ; 1 mM DTT.

Protocole de purification des ribosomes de T. thermophilus

Les ribosomes de *T. thermophilus* ont été purifiés selon le protocole utilisé dans l'équipe de Marat Yusupov ²³⁹.

Les bactéries *T. thermophilus* HB8 sont achetées auprès du service Bioexpression & Fermentation Facility (University of Georgia, Athens GA, USA) qui réalise les cultures par fermenteur (culture réalisée à 70°C jusqu'à $DO^{600} = 2$), puis nous fournit les cellules sous forme d'un unique bloc de culot sec de 250g stocké dans un pot en plastique, lequel est conservé tel quel à -80°C.

Environ 25g de bactéries *T. thermophilus* HB8 sont prélevés du bloc de culot sec en utilisant un tournevis et un marteau pour en détacher des morceaux. Les bactéries sont alors décongelées lentement durant 1 à 2 h à température ambiante dans du tampon A, en utilisant 1,5 mL de tampon par gramme de bactéries. Les bactéries resuspendues sont transvasées dans une éprouvette de 50 mL en les filtrant à travers de la gaze pour éliminer les éventuels morceaux de plastique. Le volume est ajusté à 90 mL avec du tampon A puis de la DNase est ajoutée (à raison de 2 μ L de DNase à 1 U/ μ L par gramme de cellules). La lyse des bactéries est effectuée avec un disrupteur de cellules (Cell Disrupteur de Constant Systems LTD), par 3 passages successifs à une pression de 1,5 kbar, à 4°C.

Les bactéries lysées sont centrifugées 1 h à 13500 rpm (4°C). On complète ensuite à 160 mL avec du tampon A, et l'échantillon est réparti à la surface de 4 tubes (Nalgene, ref 355622) contenant chacun 25 mL de tampon B. Les échantillons sont centrifugés à 45000 rpm durant 17 h à 4°C. Les surnageants sont soigneusement éliminés et chaque culot est lavé délicatement avec 2 mL de tampon C. Les culots sont alors resuspendus avec 4 mL de tampon C par tube, sous agitation légère à 4°C en utilisant des barreaux aimantés de 1,5 cm de longueur. Les culots resuspendus, d'un volume total de 20-25 mL, sont rassemblés et la quantité de ribosomes est estimée en mesurant la DO²⁶⁰ d'un aliquote dilué 10 fois (1 mg/mL de 70S donne une DO²⁶⁰ = 15). On fait ensuite une centrifugation de 10 min à 10000 rpm, à 4°C dans un seul tube de 50 mL.

Une chromatographie d'interactions hydrophobes est ensuite réalisée à 4°C avec une colonne contenant 200 mL de résine Butyl-650S (Tosoh Bioscience) ; le débit est de 6 mL/min

pour chaque étape. L'échantillon est injecté sur la colonne préalablement équilibrée avec 2 volumes de colonnes (VC) de tampon C puis la colonne est lavée avec 2VC de tampon D à 50%. L'élution est réalisée grâce à un gradient inverse de sulfate d'ammonium, allant de 50% de tampon D à 100% de tampon D; des fractions de 4 mL sont récoltées à chaque étape. La DO^{260} de chacune des fractions est mesurée par un spectrophotomètre Nanodrop en utilisant 5 µL non dilués ; les valeurs sont reportées sur une courbe « DO^{260} en fonction du numéro de fraction », afin de sélectionner les fractions contenant les ribosomes 70S. Les fractions dont la DO^{260} est comprise entre DO_{max} et $DO_{max} / 2$, correspondant aux ribosomes 70S, sont rassemblées (Figure MM-2A) ; cette étape de chromatographie permet l'élimination de nombreux contaminants, notamment la protéine S1. La DO^{260} de ce pool est mesurée (sans dilution), permettant à nouveau d'estimer la quantité de ribosomes. Après avoir complété le volume à 120 mL avec du tampon E, l'échantillon est centrifugé 16h à 45000 rpm, à 4°C.



Figure MM-2 : A) Suivi du gradient inverse en sulfate d'ammonium au cours de la chromatographie d'interactions hydrophobes (absorbance à 260nm en fonction des fractions collectées). **B)** Analyse de l'absorbance à 260nm dans les différentes fractions des gradients (seul le premier gradient est représenté). Pour chacune des deux étapes, les fractions comprises entre les deux traits verticaux ont été rassemblées et soumises à l'étape suivante du protocole de purification.

Les ribosomes sont ensuite purifiés sur des gradients de sucrose ; le protocole prévoit normalement d'utiliser 12 gradients de sucrose répartis dans deux ultracentrifugeuses mais, pour des raisons techniques, nous n'avons pu utiliser qu'une seule série de 6 gradients. Les gradients de sucrose (20%-5%) sont préparés durant l'étape de chromatographie : il s'agit de mettre 17,5 mL de solution à 5% de sucrose dans chaque tube puis d'ajouter au fond du tube, en passant à travers la solution à 5%, 17,5 mL de solution à 20% de sucrose. Les gradients sont ensuite formés avec un formeur de gradient puis conservés en chambre froide durant la nuit.

Les culots obtenus par ultracentrifugation sont rincés avec du tampon E (1 mL par culot), puis resuspendus lentement dans du tampon E, à raison de 1 mL de tampon par culot (2h sous agitation lente en chambre froide, avec des barreaux aimantés de 0,6-0,7 cm). Les culots ainsi resuspendus sont rassemblés et la DO^{260} est mesurée (après dilution 1/500). A cette étape, la concentration typique est de 35-45 mg/mL, et une perte de ribosomes de 25 à 30% est observée par rapport à l'étape précédente. Les échantillons sont alors délicatement déposés à la surface de chacun des gradients, à raison de 7 à 8 mg de ribosomes par gradient. Après centrifugation à 15400 rpm et à 4°C durant 17h avec un rotor SW28, les gradients sont fractionnés du bas vers le haut, à l'aide d'une pompe péristaltique, par fractions de 1 mL (débit de 2 mL/min et à une température de 4°C). La DO²⁶⁰ de chacune des fractions issues du premier gradient est mesurée et la courbe représentant la DO²⁶⁰ en fonction du numéro de la fraction est tracée. Les fractions correspondant au pic (Figure MM-2B) sont rassemblées (~30 mL) puis on mesure le volume et la DO²⁶⁰ du pool avec un Nanodrop. Ensuite on dilue le pool avec du tampon E pour le répartir dans 2 tubes ; la concentration, mesurée au Nanodrop, ne doit pas être inférieure à 0,6-1 mg/mL. Une centrifugation est effectuée durant 16h à 45000 rpm à 4°C, avec un rotor 70Ti. On évacue le surnageant et on rince les culots avec 1 mL de tampon G par tube. On évacue le tampon, puis on resuspend lentement les culots dans 250 µL de tampon G par tube, avec un barreau aimanté (0,6-0,7 cm) en chambre froide. On dépose les culots resuspendus dans un tube de 1,5 mL et on mesure le volume exact ainsi que la DO^{260} (perte typique de 10 mg). Si nécessaire on dilue l'échantillon avec le tampon G pour obtenir une concentration finale de 23-25 mg/mL dans un volume de 800 µL (environ 10 µM). Ce protocole permet d'obtenir ~50 mg de ribosome à partir de 25g de bactéries. Enfin on filtre la solution finale de ribosomes sur des tubes Eppendorf équipés d'un filtre 0,22 µm par centrifugation à 4°C, quelques minutes, à 10000 g.

Enfin, les échantillons sont aliquotés, congelés rapidement à l'azote liquide et stockés à -80°C. Une analyse de suivi de la purification peut être réalisée sur gel SDS-PAGE à partir d'aliquot prélevés à chaque étape de la purification (voir Figure MM-3).



Figure MM-3: Analyse des différentes étapes de purification des ribosomes 70S de *T. thermophilus* **sur gel SDS-PAGE 15%.** 1 : Surnageant de lyse ; 2 : Culot resuspendu après étape du coussin de sucrose ;3 : Après étape de centrifugation à 10000 rpm ; 4 : Pool après la chromatographie HIC ; 5 : Culot après l'ultracentrigation sur la nuit ; 6 : Pool après étape de centrifugation de l'échantillon sur gradient de sucrose ; 7 : ribosomes purifiés

Mesure de l'activité des ribosomes

L'activité des ribosomes 70S est considérée comme la capacité à synthétiser des chaînes poly-phénylalanines *in vitro* (on mesure ainsi l'activité d'élongation). On mesure l'incorporation de la phénylalanine tritiée dans la chaîne polypeptidique dépendant de l'ARNm synthétique, poly(U), en présence de tous les éléments nécessaires pour le processus d'élongation ^{270–274} et un excès de phénylalanine froid.

Tampons nécessaires pour le test d'activité

<u>Tampon D</u> (pour dilution des ribosomes, 500µL): 40 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 7 mM MgCl₂; 80 mM NH₄Cl; 1 mM DTT.

<u>Tampon C (tampon de réaction 10X, 500μL)</u>: 400 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 70 mM MgCl₂; 800 mM NH₄Cl; 5mM DTT; 10mM ATP; 5mM GTP; phosphoenolpyruvate, 10 mM PEP-K (C₃H₄O₆P-K).

 $\underline{\text{Tampon B (340 \mu L)}}: 0,041 \ \mu\text{g/mL PK}; 0,147 \text{mg/mL ARN Poly(U)}; 0,453 \ \mu\text{M EF-Ts}; 0,46 \ \mu\text{M EF-G}; 0,71 \ \mu\text{M EF-Tu}, \text{préparé dans du tampon C 1X}.$

<u>Tampon A</u> (mélange contenant les ARNt Phe, 180 μ L) : tARN^{Phe} chargé; 175 μ g/ μ L ARNt totaux; 0,167 μ g/ μ L PK ; 13,8 μ Ci/mL ³H-Phe soit environ 31.10⁶ dpm/mL ; 24,4 μ M Phe, préparé dans du tampon C 1X.

Mesure d'activité des ribosomes d'E. coli MRE600 et de T. thermophilus HB8

On dilue les ribosomes purifiés comme décrit précédemment dans du tampon D pour avoir les trois concentrations suivantes : 1,96 µM ; 0,98 µM et 0,49 µM, que l'on incube 1 min à 30°C. On prépare le tampon A pour la réaction de chargement des ARNt et on incube 30 min à 30°C. On mélange 20 µL de tampon B avec 5µL de solution de ribosomes dilués et on préchauffe 10 min à 30°C. La réaction de synthèse protéique est démarrée en ajoutant 10 µL de tampon A au mélange tampon B et la solution de ribosomes préparée précédemment. On incube les échantillons 6 min à 30°C. La réaction est arrêtée en mettant 28 µL du mélange réactionnel sur un filtre GFC puis on plonge immédiatement chaque filtre dans du TCA 10% froid durant 15 min (pour précipiter l'ensemble des macromolécules). Pour le lavage, on dépose le filtre dans du TCA 5% à ébullition durant 15 min, pour éliminer ARNt, acides aminés, chaînes peptidiques inférieures à 3 résidus. Après cette étape, le filtre est lavé par trempage durant 1 min dans du TCA 5%. Enfin, on lave les filtres deux fois 10 min dans une solution éthanol/éther (élimine le TCA qui « quenche » le comptage), puis une dernière fois 10 min dans de l'éther à température ambiante. Les filtres sont séchés sous la sorbonne. Pour déterminer la radioactivité liée aux filtres, on dépose ces filtres dans 4 mL de solution de scintillation (ECOLITE(+) Liquid scintillation cocktail de MP Biomedicals), on agite 30 min et les produits de la réaction fixés à la membrane sont quantifiés par un compteur à scintillation. Les résultats obtenus sont analysés avec le tableur Excel et représentés graphiquement par les picomoles de phénylalanine incorporés en fonction de la concentration de ribosomes.

Nous avons constaté que les préparations de références R1 et M1, préalablement réalisées au laboratoire, sont actives, alors que les préparations M3 et T4 sont 37 fois moins actives. Il est probable qu'un problème survenu lors de la purification a abouti à une déstructuration des ribosomes d'*E. coli* dans la préparation M3. Concernant le protocole de purification de *T. thermophilus*, le protocole implique une étape qui aboutit à la perte de protéines ribosomales, notamment la protéine S1, nécessaires pour l'activité de traduction, ayant pour conséquence une quantité de phénylalanine incorporée très faible.



Figure MM-4 : Test d'incorporation *in vitro* de la phénylalanine tritiée en fonction de la concentration en ribosomes **70S.** Les purifications R1, M1 et M3 sont des préparations de ribosomes 70S d'*E. coli* MRE600. La purification T4 est une préparation de ribosomes 70S de *T. thermophilus*. L'activité d'élongation est mesurée de façon comparative avec la préparation de référence R1.

3) Production de ribosomes bloqués en cours de traduction (« stalled ribosomes »)

Principe

L'objectif de ce protocole est la production de ribosomes bloqués en cours de traduction, en contrôlant précisément la longueur de la chaîne peptidique synthétisée. Ainsi, il est possible d'obtenir des chaînes de longueurs variables, dont l'extrémité est confinée à l'intérieur du tunnel de sortie du ribosome, ou au contraire qui émerge de ce tunnel. Le protocole utilise les propriétés de la séquence SecM (séquence $F_{150}XXXXWIXXXGIRAGP_{166}$), naturellement présente dans des protéines d'*E. coli* destinées à être exportées²⁴⁰. La séquence SecM contenue dans la protéine induit naturellement une pause du processus de traduction. Les mécanismes qui induisent une pause du ribosome avec la séquence SecM sont encore en cours d'investigation ²⁴. Cette séquence est couramment utilisée pour produire des ribosomes bloqués en cours de traduction et qui ne se dissocient pas (aussi appelés « stalled ribosomes », ou RNC pour « ribosome nascent chain »).

Les ribosomes bloqués en cours de traduction ont été produits avec le kit « PURExpress in *vitro* Protein Synthesis Kit » de chez New England Biolabs. Ce kit contient tous les composants pour transcrire un gène d'intérêt en ARNm (facteurs de transcription, nucléotides...) ainsi que les composants nécessaires à la traduction de l'ARNm synthétisé (ribosomes, facteurs de traduction, ARNt, acides aminés...). La transcription ainsi que la traduction se déroulent dans le même mélange réactionnel.

La composition exacte des solutions A et B n'est pas précisée dans le kit mais d'après le livre Cell-free Protein Purification chapitre 2 du Dr Takuya Ueda, les compositions sont:

- <u>Solution A</u>: 0,2 mM de chacun des 20 acides aminés, 108 DO^{260}/mL *E. coli* tRNA mixtures, 4 mM ATP, 4 mM GTP, 2 mM CTP, 2 mM UTP, 40 mM creatine phosphate, 20 μ g/mL formyl donor, 100 mM Hepes-KOH pH 7,6, 200 mM potassium glutamate, 26 mM magnesium acetate, 4 mM spermidine, 2 mM DTT.

- <u>Solution B</u>: 690 µg/mL alanyl-tRNA synthetase, 20 µg/mL arginyl-tRNA synthetase, 220 µg/mL asparaginyl-tRNA synthetase, 80 µg/mL asparate-tRNA synthetase, 12 µg/mL cysteinyl-tRNA synthetase, 38 µg/mL glutaminyl-tRNA synthetase, 126 µg/mL glutamyl-tRNA synthetase, 96 µg/mL glycyl-tRNA synthetase, 8 µg/mL histidyl-tRNA synthetase, 400 µg/mL isoleucyl-tRNA synthetase, 40 µg/mL leucyl-tRNA synthetase, 64 lysyl-tRNAsynthetase, 21 µg/mL methionyl-tRNA synthetase, 170 µg/mL phenylalanyl-tRNA synthetase, 100 µg/mL prolyl-tRNA synthetase, 19 µg/mL seryl-tRNA synthetase, 63 µg/mL threonyl-tRNA synthetase, 11 µg/mL tryptophanyl-tRNA synthetase, 6 g/mL tyrosyl-tRNA synthetase, 18 µg/mL valyl-tRNA synthetase, 200 µg/mL methionyl-tRNA formyltransferase, 100 µg/mL initiation factor 1 (IF1), 400 µg/mL initiation factor 2 (IF2), 100 µg/mL initiation factor Tu (EF-Tu), 500 µg/mL elongation factor Ts (EF-Ts), 100 µg/mL release factor 1 (RF1), 100 µg/mL ribosome recycling factor (RRF), T7 ARN polymerase, ribosomes 70S *E. coli* souche A19 13 µM ²⁷⁵.

Il est intéressant de noter que la solution B contient une méthionyl-tRNA formyltransférase et la solution A du donneur de formyle. Cela permet l'incorporation d'une Met initiatrice sous forme formylée. Ainsi le complexe ribosome / chaîne peptidique se trouve dans un état permettant le recrutement de la peptide déformylase.

Ne sachant pas si l'enzyme *Ec*PDF est présente dans les solutions du kit, j'ai réalisé un Western-blot suivi d'une immunodétection en utilisant les anticorps anti-*Ec*PDF. De même, j'ai cherché à savoir si le kit contient le trigger factor *Ec*TF. J'ai ainsi montré que le kit contient du TF, mais pas *Ec*PDF (Figure MM-5).



Figure MM-5 : Analyse de la présence d'*Ec*PDF et *Ec*TF dans les solutions A et B du kit de ribosome « PURExpress in *vitro* Protein Synthesis Kit » de chez New England Biolabs par Western-blot. Dépôt de $10 \ \mu$ L de solution A et 7,5 μ L de solution B sur gel SDS-PAGE 14%. La partie haute de la membrane a été incubée avec des anticorps anti-*Ec*TF et la partie basse avec des anticorps anti-*Ec*PDF.

Description de la séquence génomique utilisée :

Nous avons choisi de fusionner la séquence d'arrêt SecM en C-terminal de la protéine β galacosidase d'*E. coli*. Cependant le N-terminus MTM a été modifié en MSL afin de ne contenir qu'une seule méthionine, ce qui sera important pour déterminer le ratio de ribosomes bloqués. De plus, le reste de la séquence est également optimisé de façon à ne contenir qu'une méthionine, la méthionine initiatrice. Cela permet ainsi de pouvoir compter le ratio de ribosomes bloqués à l'issue de la réaction (en utilisant de la ³⁵S-L-Methionine). La séquence génomique

(5'TTCAGCACGCCCGTCTGGATAAGCCAGGCGCAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCG TAG-3'),

correspondant à la séquence d'arrêt de SecM (FSTPVWISQAQGIRAGPP), inclut un codon proline ainsi qu'un codon stop en 3', permettant d'optimiser le blocage du ribosome ^{276,277}. La séquence d'arrêt SecM optimisée a été fusionnée en C-terminal de différentes séquences de β -galactosidase, de longueurs variables. Les constructions, présentées dans le tableau MM-10, correspondent à des protéines recombinantes de 20, 25, 35, 42, 53, 71, 95, 105 et 256 acides aminés au total. L'ensemble des constructions a été inséré dans le plasmide d'expression pET-22b(+).

Tableau MM-10 : Liste des séquences génomiques et protéiques des différentes constructions β-gal-SecM disponibles.

SecM20	ATGAGCCTGTTCAGCACGCCCGTCTGGATAAGCCAGGCGCAAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCGCCGTAG				
Secivizu	MSL <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>				
SeeM25	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGTTCAGCACGCCCGTCTGGATAAGCCAGGCGCAAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCGCCGTAG				
Secivi25	MSLITDSL <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>				
SecM35	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAATTCAGCACGCCCGTCTGGATAAGCCAGGCGCAAGGCATCC GTGCTGGCCCTCCGCCGTAG				
	MSLITDSLAVVLQRRDWE <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>				
SecM42	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCaattATTCAGCACGCCCGTCTGGATA AGCCAGGCGCAAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCGCCGTAG				
	MSLITDSLAVVLQRRDWENPGVTQL <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>				
SecM53	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAATTGAATCGCCTTGCAGCACATC CCCCTTTCGctagTTTCAGCACGCCCGTCTGGATAAGCCAGGCGCAAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCGCCGTAG				
	MSLITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFAS <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>				
SecM71	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAATTGAATCGCCTTGCAGCACATC CCCCTTTCGCTAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAATCGCCCTTCCCAGCAGTTACGCAGCTTCAGCACGCCCGTCTGGATAAGCCA GGCGCAAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCGCCGTAG				
	MSLITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTNRPSQQLRS <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>				

SecM95	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAATTGAATCG CCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCTAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAATCGCCCTTCCCAGCAGTTGCGCA GCCTGAATGGTGAGTGGCAATTTGTCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTTCCGGAAAGCTGGCTG
	MSLIIDSLAVVLQRRDWENPGVIQLNRLAAHPPFASWRNSEEARINRPSQQLRSLNGEWQFVWFPAPEAVPESWLECD <u>FSIPVWISQAQGIRAGPP</u>
SecM105	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAATTGAATCGCCTTGCAGCACATC CCCCTTTCGCTAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAATCGCCCTTCCCAGCAGTTGCGCAGCCTGAATGGTGAGTGGCAATTTGTCTG GTTTCCGGCACCAGAAGCGGTTCCGGAAAGCTGGCTGGAATGCGATCTTCCTGACGCCGATACTGTCGTGgtacCCTTCAGCACGCCCGTCTGGAT AAGCCAGGCGCAAGGCATCCGTGCTGGCCCTCCGCCGTAG
	MSLITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTNRPSQQLRSLNGEWQFVWFPAPEA <i>VP</i> ESWLECDLPDADTVV <i>VP<u>FSTPVWISQ</u> <u>AQGIRAGPP</u></i>
SecM256	ATGAGCCTGATTACAGATTCACTGGCCGTCGTATTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAATTGAATCGCCTTGCAGCACATC CCCCTTTCGCTAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAATCGCCCTTCCCAGCAGTTGCGCAGCCTGAATGGTGAGTGGCAATTTGTCTG GTTTCCGGCACCAGAAGCGGTTCCGGAAAGCTGGCTGGAATGCGGATCTTCCTGACGCCGATACTGTCGTGGTACCCTCAAACTGGCAGATGCAC GGTTACGACGCGCCATCTACACCAACGTGACATATCCCATTACGGTCAATCCGCCGATACTGTCCCACGGAGAATCCGACCGGCTGGTTGTTACTCGC CACATTTAACGTCGACGACAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGGAATTATTTTTGATGGCGTGAATTCGGCGTTACTGTGGTGCAACGGG CGCTGGGTCGGTTATGGCCAGGACAGTCGTTTGCTGTCTGAATTGGCGGGATGAGCGGCATTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGG CGCTGGGCTGG
	DAPIYTNVTYPITVNPPF <i>VP</i> TENPTGCYSLTFNVDESWLQEGQTRIIFDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQDSRLLSEFDLSAFLRAGENRLAVMVLRWSD GSYLEDQDMWRMSGIFRDVSLLHKPTTQISDFHVATLFNDDFSRA <u>FSTPVWISQAQGIRAGPP</u>

Les séquences soulignées correspondent à la séquence de SecM permettant le blocage du ribosome.

Matériels et Méthodes

Le mélange réactionnel pour obtenir 2,4 μ M de ribosomes bloqués dans 25 μ L final est le suivant: dans un tube Eppendorf, on dépose 10 μ L de solution A puis 7,5 μ L de solution B ainsi que 0,5 μ L d'inhibiteur de RNAse (RNAse inhibitor murine de New England Biolabs, 40,000 unités/mL) et le plasmide pET-22b/SecM à une concentration finale de 5 à 25 ng/ μ L (voir tableau MM-11). On complète à 25 μ L avec de l'eau milliQ. Le mix est alors doucement agité puis mis à incuber dans un thermomixeur à 37°C durant 150 min (un bain-marie à 37°C peut également être utilisé). Il faut faire attention de ne jamais vortexer la solution ni produire de bulles, afin de ne pas entraîner une dissociation des ribosomes. A l'issue de la réaction, les ribosomes bloqués en cours de traduction sont prêts à être utilisés.

	Tableau Mini-11. Col		t temps u	Incubation	optimaux pour	obtenni	ues mosonies	bioques
avec	les constructions Sec	M25, SecM42	2, SecM53	, SecM71 et	SecM105.			

Tableau MM 11 · Concentration at terms d'incubation antimaux neur abtenir des ribesames blaqués

Constructions	Concentration optimale de plasmides	Temps optimal d'incubation	
SecM25	5 ng/µL	120 min	
SecM42	15 à 25 ng/μL	120 min	
SecM53	5 ng/μL	150 min	
SecM71	5 ng/μL	120 min	
SecM105	15 ng/μL	120 min	

Vérification du ratio de ribosomes bloqués produits

Le rendement d'obtention de ribosomes bloqués en cours de traduction est mesuré en préparant les ribosomes selon le protocole décrit ci-dessus, et en utilisant de la méthionine radioactive. Les ribosomes ainsi produits sont isolés sur une colonne Sephacryl S-300 et la radioactivité contenue dans le mélange est mesurée. La β -galactosidase utilisée ne contenant qu'une seule Met (voir l'optimisation de séquence décrite ci-dessus), la quantité de radioactivité incorporée est directement liée à la quantité de ribosomes bloqués.

La réaction de synthèse est réalisée selon le même protocole que décrit précédemment, en ajoutant 2 μ L de méthionine marquée (EasyTag methionine, ³⁵S-Met, de Perkin Helmer référence NEG709A, à 1,4 μ g/mL et 10,25 mCi/mL) dans le mélange réactionnel.

Dans une réaction de 25 μ L, nous avons 60 pmol de ribosomes (2,4 μ M). Comme chaque ribosome bloqué n'incorpore qu'une seule méthionine (en N-terminal), 100% de ribosomes

bloqués incorporent donc 60 pmol de méthionine marquée. Nous utilisons 5 μ L de mélange réactionnel pour le comptage de radioactivité, soit 12 pmol de ribosomes marqués au maximum. La gamme étalon de méthionine marquée s'étend donc de part et d'autre de cette valeur. La gamme est réalisée dans un tampon 50 mM Hepes-KOHpH7,5 ; 10 mM Mg(Ac)₂et 75 mM KAc.

On dépose 1 mL de résine Sephacryl S-300 high resolution (GE Healthcare) sur une colonne Mobicole classique (MoBiTec) après avoir mis un filtre. Une fois l'incubation des ribosomes terminée, on dépose le mélange réactionnel au centre de la colonne (max 50 μ L/colonne) et on centrifuge l'échantillon 2 min à 0,5 rcf. Le filtrat contient alors les ribosomes bloqués, alors que la résine retient les méthionines marquées libres, qui n'ont pas été incorporées durant la synthèse peptidique.

Pour le comptage, nous déposons 100 μ L d'eau, 5 μ L de solution de ribosomes bloqués et 5 mL de liquide de scintillation dans un tube de comptage. On peut alors réaliser les mesures.

On réalise également une gamme de concentration de ³⁵S-L-Methionine afin de définir le nombre de coups comptés en fonction de la quantité de méthionine marquée présente dans la solution. Ainsi, le nombre de coups mesurés dans la solution de ribosomes bloqués nous indique la quantité de méthionine présente et donc la quantité de ribosomes bloqués ayant incorporé une méthionine.

Tampon utilisé pour la gamme: 50 mM HEPES-KOHpH 7,5, 10 mM Mg(Ac)₂, 75 mM KAc.

Nous ajoutons ensuite la méthionine marquée au tampon. Pour les comptages de radioactivité, du liquide de scintillation (ECOLITE(+) Liquid scintillation cocktail de MP Biomedicals) est alors ajouté.

Une fois la gamme effectuée, on attend la fin de l'incubation de la réaction de synthèse des « stalled ribosomes ». Le comptage de la radioactivité de la gamme et des échantillons est effectué avec un compteur à scintillation.

4) Test de sédimentation

L'interaction ribosome:PDF a été mesurée grâce à un test de sédimentation sur couche de sucrose, selon un protocole publié ⁹⁴.

La PDF d'intérêt (5 μ M) est incubée en présence de concentrations croissantes de ribosomes bloqués (de 0,2 μ M à 2 μ M) dans un mélange réactionnel de 60 μ L contenant du tampon

d'interaction (50 mM HEPES-KOHpH7,5 ; 100 mM NH4OAc; 20 mM MgCl₂ et 1 mM TCEP). Un extrait cellulaire S150 (contenant l'ensemble des protéines bactériennes solubles mais pas les ribosomes, voir ci-dessous) est ajouté de façon à diminuer les interactions aspécifiques de la PDF avec le ribosome. Le mélange réactionnel est incubé 30 min dans la glace puis centrifugé à 16100 g durant 10 min (4°C) afin d'éliminer les éventuelles protéines précipitées. Le surnageant (60 μ L) est alors délicatement déposé sur 120 μ L de couche de sucrose 20% (50 mM HEPES-KOHpH7,5 ; 100 mM NH4OAc; 20 mM MgCl₂ et 1 mM TCEP, 20% sucrose), dans des tubes pour rotor TLA 100. Les tubes sont alors centrifugés à 245000 g durant 30 min à 4°C (rotor TLA100). A l'issue de la centrifugation, un culot légèrement jaune est visible. On élimine le surnageant et on lave le culot 2 fois à la pipette avec le tampon d'interaction en faisant couler le tampon le long de la paroi du tube, de façon à ne pas perturber le culot. Le culot est ensuite resuspendu dans 20 μ L de tampon de charge 1X et les échantillons sont analysés par Western-blot.

5) Pontage chimique

• Préparation de l'extrait S150 (d'après ^{278–280})

Une culture de bactéries E. coli MRE600 est réalisée dans 1 L de milieu de culture contenant 5,6 g KH₂PO₄; 28,9 g K₂HPO₄; 10 g extrait de levure auquel on ajoute 1% de glucose et 10 mg de thiamine après autoclavage. Elle est incubée à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à obtenir une $DO^{600} = 0.8$. On place alors rapidement la culture dans la glace pour stopper la croissance cellulaire. On centrifuge les cellules 20 min à 8000 g afin d'obtenir un culot qui est alors lavé deux fois avec un tampon TMP (10 mM Tris-acetatepH 8,0; 15 mM magnésium acetate; 60 mM potassium acetate; 1 mM DTT; 75 µg/mL pMSF). Pour 1 L de culture on obtient un culot de environ 2,5 g que l'on resuspend après rinçage dans 10 mL de tampon TMP (le volume final après resuspension est donc environ 12 mL). La lyse des cellules est réalisée avec un sonicateur Branson, en faisant 3 cycles de 1 min de pulsation, avec 1 min de pause entre chaque pulsation. On centrifuge alors l'échantillon à 30000 g (26000 rpm) dans un rotor TLA 100.3 à 4°C durant 30 min. On récupère le surnageant et on le centrifuge de nouveau dans les mêmes conditions. On mesure la concentration de protéines par la méthode de Bradford et on ajuste la concentration à 15 mg/mL avec le tampon TMP. Le lysat est ensuite dialysé contre 1L du tampon TMP à 4°C durant 3h. On réalise alors de nouveau une centrifugation à 150000 g (65000 rpm) avec le rotor TLA 100.3 durant 24 min à 4°C. Le surnageant S150 est collecté, aliquoté dans des tubes de 100 µL puis est rapidement congelé dans de l'azote liquide afin d'être stocké à -80°C.

La centrifugeuse utilisée est la Beckman TL-100, le rotor TLA 100.3 et les tubes Ultra-Clear tubes $\frac{1}{2}$ x 2, 13 x 51 mm (référence 344057 chez Beckman).

• Tampon pour le protocole de pontage chimique:

Cross-linking buffer : 100 mM HEPES-KOH; 100mM KCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,6.

Binding buffer: 20 mM HEPES-KOH; 100mM NH₄OAc; 20 mM MgCl₂; 1 mM TCEP; pH 7,4.

Quenching buffer: 1 M NH4OAc; 1M Tris-HCl pH 7,4.

Dissociation buffer: 20 mM HEPES-KOH; 100 mM NH₄OAc; 0,3 mM MgCl₂; pH 7,4

Strep-Tactin lysis buffer: 20 mM HEPES-KOH; 150 mM KCl; pH 7,5.

• Protocole du pontage chimique

Le pontage chimique avec l'EDC permet de lier covalemment deux protéines dont les résidus aspartate/glutamate et lysine se retrouvent proches dans l'espace (Figure MM-6).



Figure MM-6: Réaction de pontage chimique entre l'EDC et les groupements carboxyle et amine primaire de deux protéines.

On incube 5 μ M de ribosome avec 25 μ M de strep-PDF dans le « cross-linking buffer » dans un volume total de 23,75 μ L. On incube alors l'échantillon durant 30 min à 25°C. On ajoute ensuite de l'EDC à une concentration finale de 50 mM, de façon à obtenir un volume final de 25 μ L. On incube 30 min à 25°C. On ajoute alors 2,75 μ L de « quenching buffer ». L'échantillon est ensuite dilué avec le « binding buffer » pour obtenir un volume final de 50 μ L. On ajoute alors 100 μ L d'extrait S150 et on charge l'échantillon sur 2 mL d'une couche de sucrose à 20% (réalisée dans du « binding buffer »). On centrifuge l'échantillon dans un rotor TLA55 à 55000 rpm durant 3,5 h à 4°C (ou 55000 rpm durant 2,5 h à 4°C dans un rotor TLA

100.3). Le culot est ensuite lavé deux fois avec 300 μ L de « dissociation buffer » froid. Le culot est alors resuspendu dans 20 μ L de « dissociation buffer ». Une mesure de la concentration de ribosome est effectuée à 260 nm. En parallèle, on équilibre la résine Strep-Tactin-Sepharose avec 30 μ L de « dissociation buffer », puis une fois équilibrée, on ajoute la résine au culot de ribosome resuspendu. On ajoute alors de la Bovine pancratic RNase A (Roche) à une concentration finale de 5 μ g/mL. L'échantillon est incubé la nuit à 4°C. Le lendemain, on transfère l'échantillon (incluant la résine) dans un tube « filter spin column (MoBiTec) » de 1 mL. On centrifuge 30 s à 100 g à 4°C. On récupère les protéines non accrochées en lavant la résine 3 fois avec 100 μ L de « Strep-Tactin lysis buffer ». On élue ensuite les protéines accrochées à la colonne avec 25 μ L de tampon de charge 1X et on incube l'échantillon à 95°C durant 10 min. On centrifuge ensuite durant 2 min à 16000 g afin de récupérer les protéines. Les échantillons sont alors prêts à être analysés sur gel SDS-PAGE et/ou Western-blot .



Figure MM-7: Principe du pontage chimique entre 70S E. coli et Strep-Vp16PDF avec EDC.

B.5 Cristallisation de complexes 70S/facteurs NME

Les ribosomes de *T. thermophilus* ont été cristallisés selon le protocole utilisé dans l'équipe de Marat Yusupov ^{18,239}, par la technique de diffusion de vapeur en réalisant des gouttes assises dans des boîtes 24 puits.

Les cristaux de ribosomes seuls sont obtenus en mélangeant 2 μ L de ribosomes à 13 μ M et 2 μ L de solution de puits contenant 3,8 à 4,3% de PEG-20000, 3,8 à 4,3% de PEG-550 MME,

100 mM de KSCN et 100 mM de Tris-acétate pH7. Les réservoirs contiennent 400 µL de solution de cristallisation. L'échantillon de ribosomes contient 185 pmol d'ARNt^{fMet} préalablement activé 2 min à 55°C ainsi que 2,8 mM final de DBC (deoxy big chap). Les protéines PDF ou MetAP ont été cocristallisées avec les ribosomes, en préparant des échantillons contenant un excès molaire 6X de protéine par rapport aux ribosomes. Les boîtes sont incubées à 24°C durant 2 à 3 semaines.

Les cristaux obtenus sont soumis à un protocole de cryoprotection, 24h avant les expériences de diffraction des rayons X. Pour cela, la solution de cristallisation d'un puits est transvasée dans un tube où l'on ajoute du MgCl₂ à une concentration finale de 10 mM. 600 µL de 60% MPD sont ajoutés dans les puits ainsi vidés et 10 µL de solution de cristallisation contenant 10mM de MgCl₂ sont alors ajoutés dans chacune des gouttes de cristallisation. Les boîtes de cristallisation ainsi préparées sont mises à équilibrer 24h à 24°C. Une fois sur la ligne de lumière, soit 24h après le début du protocole de cryoprotection, la solution des gouttes de cristallisation est échangée par 3 ajouts successifs de 45 µL de solution de cryoprotection (ajout de solution puis élimination sans toucher aux cristaux, 3 fois de suite), constituée typiquement de 4,5% PEG-20000, 4,5% PEG-550 MME, 0,1M KSCN pH7,0, 10 mM MgAcetate, 30% MPD. Les cristaux sont alors montés sur une boucle et congelés directement dans le flux d'azote sur la tête goniométrique.

Les expériences de diffraction ont été réalisées au synchrotron SOLEIL sur la ligne de lumière PROXIMA1.

Carte des vecteurs vides

➢ pET-16b



pBAD/Myc-HisA



➢ pET-22b



Constructions en pET-16b :





A Created with SnapGene*



> Construction des chimères en pBAD/Myc-HisA





Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

- Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. Protein elongation, co-translational folding and targeting. J. Mol. Biol. (2016). doi:10.1016/j.jmb.2016.03.022
- 2. Bremer, H. & Dennis, P. P. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates. *EcoSal Plus* **3**, (2008).
- 3. Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
- 4. Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4341–4367 (2015).
- 5. Ringquist, S. *et al.* Translation initiation in Escherichia coli: sequences within the ribosomebinding site. *Mol. Microbiol.* **6**, 1219–1229 (1992).
- 6. Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**, 1234–1242 (2009).
- Breiman, A., Fieulaine, S., Meinnel, T. & Giglione, C. The intriguing realm of protein biogenesis:
 Facing the green co-translational protein maturation networks. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* doi:10.1016/j.bbapap.2015.11.002
- Agrawal, R. K. & Sharma, M. R. Structural aspects of mitochondrial translational apparatus.
 Curr. Opin. Struct. Biol. 22, 797–803 (2012).
- 9. Kaushal, P. S., Sharma, M. R. & Agrawal, R. K. The 55S mammalian mitochondrial ribosome and its tRNA-exit region. *Biochimie* **114**, 119–126 (2015).
- Amunts, A. *et al.* Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science* 343, 1485–1489 (2014).
- Brown, A. *et al.* Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science* 346, 718–722 (2014).
- Manuell, A. L., Quispe, J. & Mayfield, S. P. Structure of the chloroplast ribosome: novel domains for translation regulation. *PLoS Biol.* 5, e209 (2007).

- 13. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution. *Science* **289**, 905–920 (2000).
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science* 289, 920–930 (2000).
- 15. Malkin, L. I. & Rich, A. Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J Mol Biol* **26**, 329–346 (1967).
- 16. Picking, W. D., Picking, W. L., Odom, O. W. & Hardesty, B. Fluorescence characterization of the environment encountered by nascent polyalanine and polyserine as they exit Escherichia coli ribosomes during translation. *Biochemistry (Mosc.)* **31**, 2368–2375 (1992).
- 17. Voss, N. R., Gerstein, M., Steitz, T. A. & Moore, P. B. The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *J Mol Biol* **360**, 893–906 (2006).
- Selmer, M. *et al.* Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**, 1935–1942 (2006).
- Lu, J. & Deutsch, C. Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. J Mol Biol 384, 73–86 (2008).
- 20. Lu, J., Kobertz, W. R. & Deutsch, C. Mapping the electrostatic potential within the ribosomal exit tunnel. *J Mol Biol* **371**, 1378–1391 (2007).
- Nilsson, O. B. *et al.* Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel. *Cell Rep.* 12, 1533–1540 (2015).
- Knoops, K., Schoehn, G. & Schaffitzel, C. Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes in cotranslational folding, targeting, and translocation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 429–441 (2012).
- 23. Woolhead, C. A., Johnson, A. E. & Bernstein, H. D. Translation arrest requires two-way communication between a nascent polypeptide and the ribosome. *Mol Cell* **22**, 587–598 (2006).
- 24. Zhang, J. *et al.* Mechanisms of ribosome stalling by SecM at multiple elongation steps. *eLife* 4, (2015).
- Mitra, K. *et al.* Elongation arrest by SecM via a cascade of ribosomal RNA rearrangements. *Mol. Cell* 22, 533–543 (2006).
- 26. Cymer, F., Hedman, R., Ismail, N. & von Heijne, G. Exploration of the Arrest Peptide Sequence Space Reveals Arrest-enhanced Variants. *J. Biol. Chem.* **290**, 10208–10215 (2015).
- 27. Nakamori, K., Chiba, S. & Ito, K. Identification of a SecM segment required for export-coupled release from elongation arrest. *FEBS Lett.* **588**, 3098–3103 (2014).
- 28. Yang, Z., Iizuka, R. & Funatsu, T. Nascent SecM chain outside the ribosome reinforces translation arrest. *PloS One* **10**, e0122017 (2015).
- 29. Bischoff, L., Berninghausen, O. & Beckmann, R. Molecular basis for the ribosome functioning as an L-tryptophan sensor. *Cell Rep.* **9**, 469–475 (2014).
- 30. Sohmen, D. *et al.* Structure of the Bacillus subtilis 70S ribosome reveals the basis for speciesspecific stalling. *Nat. Commun.* **6**, 6941 (2015).
- 31. Arenz, S. *et al.* Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide. *Nat. Commun.* **5**, 3501 (2014).
- 32. Cruz-Vera, L. R., Sachs, M. S., Squires, C. L. & Yanofsky, C. Nascent polypeptide sequences that influence ribosome function. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 160–166 (2011).
- Lovett, P. S. & Rogers, E. J. Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol. Rev.* 60, 366–385 (1996).
- Ramu, H., Mankin, A. & Vazquez-Laslop, N. Programmed drug-dependent ribosome stalling. Mol. Microbiol. 71, 811–824 (2009).
- Carter, A. P. *et al.* Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit.
 Science 291, 498–501 (2001).
- Kisselev, L. L. & Buckingham, R. H. Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* 25, 561–566 (2000).
- 37. Brandt, F. The native 3D organization of bacterial polysomes. Cell 136, 261–271 (2009).

- Schippers, J. H. M. & Mueller-Roeber, B. Ribosomal composition and control of leaf development. *Plant Sci.* 179, 307–315 (2010).
- Tiller, N. & Bock, R. The translational apparatus of plastids and its role in plant development.
 Mol. Plant 7, 1105–1120 (2014).
- 40. Zhang, J. *et al.* Plastid ribosomal protein S5 is involved in photosynthesis, plant development, and cold stress tolerance in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **67**, 2731–2744 (2016).
- Kuzmenko, A. V. *et al.* Protein biosynthesis in mitochondria. *Biochem. Mosc.* **78**, 855–866 (2013).
- 42. Greber, B. J. & Ban, N. Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* (2016). doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014343
- Bonissone, S., Gupta, N., Romine, M., Bradshaw, R. A. & Pevzner, P. A. N-terminal protein processing: a comparative proteogenomic analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 12, 14–28 (2013).
- 44. Hu, L. I., Lima, B. P. & Wolfe, A. J. Bacterial protein acetylation: the dawning of a new age. *Mol. Microbiol.* 77, 15–21 (2010).
- 45. Jones, J. D. & O'Connor, C. D. Protein acetylation in prokaryotes. *Proteomics* 11, 3012–3022 (2011).
- 46. Ouidir, T., Jarnier, F., Cosette, P., Jouenne, T. & Hardouin, J. Characterization of N-terminal protein modifications in Pseudomonas aeruginosa PA14. *J. Proteomics* **114**, 214–225 (2015).
- 47. Giglione, C., Fieulaine, S. & Meinnel, T. N-terminal protein modifications: Bringing back into play the ribosome. *Qual. Control Protein Synth.* **114**, 134–146 (2015).
- 48. Mackay, D. T., Botting, C. H., Taylor, G. L. & White, M. F. An acetylase with relaxed specificity catalyses protein N-terminal acetylation in Sulfolobus solfataricus. *Mol. Microbiol.* **64**, 1540–1548 (2007).

- 49. Arnesen, T. *et al.* Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Oncogene* 25, 4350–4360 (2006).
- 50. Yi, C. H. *et al.* Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell* **146**, 607–620 (2011).
- 51. Lee, K.-E., Heo, J.-E., Kim, J.-M. & Hwang, C.-S. N-Terminal Acetylation-Targeted N-End Rule Proteolytic System: The Ac/N-End Rule Pathway. *Mol. Cells* **39**, 169–178 (2016).
- 52. Forte, G. M. A., Pool, M. R. & Stirling, C. J. N-terminal acetylation inhibits protein targeting to the endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **9**, e1001073 (2011).
- Scott, D. C., Monda, J. K., Bennett, E. J., Harper, J. W. & Schulman, B. A. N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* 334, 674– 678 (2011).
- 54. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852–1858 (2002).
- 55. Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a004390 (2010).
- 56. Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. & Bukau, B. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**, 693–696 (1999).
- 57. Teter, S. A. *et al.* Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**, 755–765 (1999).
- Hesterkamp, T., Deuerling, E. & Bukau, B. The amino-terminal 118 amino acids of Escherichia coli trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes.
 J. Biol. Chem. 272, 21865–21871 (1997).
- 59. Hoffmann, A., Bukau, B. & Kramer, G. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1803**, 650–661 (2010).

- 60. Merz, F. The C-terminal domain of E. coli Trigger factor represents the central module of its chaperone activity. *J Biol Chem* **42**, 31963–31971 (2006).
- Genevaux, P. *et al.* In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor.
 EMBO Rep. 5, 195–200 (2004).
- 62. Kramer, G. Functional dissection of Escherichia coli Trigger factor: unraveling the function of individual domains. *J Bacteriol* **186**, 3777–3784 (2004).
- 63. Ferbitz, L. Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* **431**, 590–596 (2004).
- 64. Merz, F. Molecular mechanism and structure of Trigger factor bound to the translating ribosome. *EMBO J* **27**, 1622–1632 (2008).
- 65. Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N. & Bukau, B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 589–597 (2009).
- Sherman, M. Y. & Qian, S.-B. Less is more: improving proteostasis by translation slow down.
 Trends Biochem. Sci. 38, 585–591 (2013).
- 67. Bhushan, S. *et al.* alpha-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 313–317 (2010).
- 68. Evans, M. S., Sander, I. M. & Clark, P. L. Cotranslational folding promotes [beta]-helix formation and avoids aggregation in vivo. *J Mol Biol* **383**, 683–692 (2008).
- Lu, J. & Deutsch, C. Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 1123– 1129 (2005).
- Ziv, G., Haran, G. & Thirumalai, D. Ribosome exit tunnel can entropically stabilize alpha-helices.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102,** 18956–18961 (2005).
- 71. Cabrita, L. D. *et al.* A structural ensemble of a ribosome-nascent chain complex during cotranslational protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **advance online publication,** (2016).

- 72. Zückert, W. R. Secretion of Bacterial Lipoproteins: Through the Cytoplasmic Membrane, the Periplasm and Beyond. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* **1843**, 1509–1516 (2014).
- Grudnik, P., Bange, G. & Sinning, I. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol. Chem.* **390**, 775–782 (2009).
- Pool, M. R. Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review).
 Mol. Membr. Biol. 22, 3–15 (2005).
- 75. Bibi, E. Early targeting events during membrane protein biogenesis in Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* 1808, 841–850 (2011).
- Huber, D. *et al.* Use of thioredoxin as a reporter to identify a subset of Escherichia coli signal sequences that promote signal recognition particle-dependent translocation. *J. Bacteriol.* 187, 2983–2991 (2005).
- Schaffitzel, C. *et al.* Structure of the E. coli signal recognition particle bound to a translating ribosome. *Nature* 444, 503–506 (2006).
- 78. Adams, H., Scotti, P. A., De Cock, H., Luirink, J. & Tommassen, J. The presence of a helix breaker in the hydrophobic core of signal sequences of secretory proteins prevents recognition by the signal-recognition particle in Escherichia coli. *Eur. J. Biochem. FEBS* **269**, 5564–5571 (2002).
- Peterson, J. H., Woolhead, C. A. & Bernstein, H. D. Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle. *J. Biol. Chem.* 278, 46155–46162 (2003).
- Lange, S. *et al.* Structural analysis of a signal peptide inside the ribosome tunnel by DNP MAS NMR. *Sci. Adv.* 2, e1600379 (2016).
- Driessen, A. J. M. & Nouwen, N. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 643–667 (2008).
- 82. Rapoport, T. A. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**, 663–669 (2007).
- 83. Beckwith, J. The Sec-dependent pathway. Res. Microbiol. 164, 497–504 (2013).

- Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. & Wickner, W. The purified E. coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* 62, 649–657 (1990).
- Erlandson, K. J., Or, E., Osborne, A. R. & Rapoport, T. A. Analysis of polypeptide movement in the SecY channel during SecA-mediated protein translocation. *J. Biol. Chem.* 283, 15709–15715 (2008).
- Ball, L. A. & Kaesberg, P. Cleavage of the N-terminal formylmethionine residue from a bacteriophage coat protein in vitro. *J Mol Biol* 79, 531–537 (1973).
- 87. Housman, D., Gillespie, D. & Lodish, H. F. Removal of formyl-methionine residue from nascent bacteriophage f2 protein. *J. Mol. Biol.* **65**, 163–166 (1972).
- Pine, M. J. Kinetics of maturation of the amino termini of the cell proteins of Escherichia coli.
 Biochim Biophys Acta 174, 359–372 (1969).
- 89. Takeda, M. & Webster, R. E. Protein chain initiation and deformylation in B. subtilis homogenates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **60**, 1487–1494 (1968).
- Meinnel, T. & Blanquet, S. Enzymatic properties of Escherichia coli peptide deformylase. J. Bacteriol. 177, 1883–1887 (1995).
- 91. Bingel-Erlenmeyer, R. *et al*. A peptide deformylase-ribosome complex reveals mechanism of nascent chain processing. *Nature* **452**, 108–111 (2008).
- 92. Meinnel, T., Lazennec, C., Dardel, F., Schmitter, J.-M. & Blanquet, S. The C-terminal domain of peptide deformylase is disordered and dispensable for activity. *FEBS Lett.* **385**, 91–95 (1996).
- 93. Giglione, C., Fieulaine, S. & Meinnel, T. Cotranslational processing mechanisms: towards a dynamic 3D model. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 417–426 (2009).
- 94. Sandikci, A. *et al.* Dynamic enzyme docking to the ribosome coordinates N-terminal processing with polypeptide folding. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 843–850 (2013).

- Vetro, J. A. & Chang, Y. H. Yeast methionine aminopeptidase type 1 is ribosome-associated and requires its N-terminal zinc finger domain for normal function in vivo. *J Cell Biochem* 85, 678– 688 (2002).
- 96. Raue, U., Oellerer, S. & Rospert, S. Association of protein biogenesis factors at the yeast ribosomal tunnel exit is affected by the translational status and nascent polypeptide sequence.
 J Biol Chem 282, 7809–7816 (2007).
- 97. Addlagatta, A., Quillin, M. L., Omotoso, O., Liu, J. O. & Matthews, B. W. Identification of an SH3binding motif in a new class of methionine aminopeptidases from Mycobacterium tuberculosis suggests a mode of interaction with the ribosome. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 7166–7174 (2005).
- Addlagatta, A., Hu, X., Liu, J. O. & Matthews, B. W. Structural basis for the functional differences between type I and type II human methionine aminopeptidases. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 14741–14749 (2005).
- 99. Kramer, G. L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* 419, 171–174 (2002).
- 100. Schlunzen, F. The binding mode of the Trigger factor on the ribosome: implications for protein folding and SRP interaction. *Structure* **13**, 1685–1694 (2005).
- 101. Baram, D. Structure of Trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its chaperone action. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 12017–12022 (2005).
- 102. Horwich, A. Cell biology: sight at the end of the tunnel. Nature 431, 520–522 (2004).
- 103. Deckert, A. *et al.* Structural characterization of the interaction of α -synuclein nascent chains with the ribosomal surface and trigger factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5012–5017 (2016).
- 104. Nilsson, O. B., Müller-Lucks, A., Kramer, G., Bukau, B. & von Heijne, G. Trigger Factor Reduces the Force Exerted on the Nascent Chain by a Cotranslationally Folding Protein. J. Mol. Biol. 428, 1356–1364 (2016).

- 105. Oh, E. *et al.* Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *Cell* **147**, 1295–1308 (2011).
- 106. Kaiser, C. M. Real-time observation of Trigger factor function on translating ribosomes. *Nature*444, 455–460 (2006).
- Raine, A., Lovmar, M., Wikberg, J. & Ehrenberg, M. Trigger factor binding to ribosomes with nascent peptide chains of varying lengths and sequences. *J Biol Chem* 281, 28033–28038 (2006).
- 108. Rutkowska, A. Dynamics of Trigger factor interaction with translating ribosomes. *J Biol Chem*283, 4124–4132 (2008).
- Halic, M. *et al.* Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* **312**, 745–747 (2006).
- 110. Jomaa, A., Boehringer, D., Leibundgut, M. & Ban, N. Structures of the E. coli translating ribosome with SRP and its receptor and with the translocon. *Nat. Commun.* **7**, 10471 (2016).
- 111. von Heijne, G. Protein targeting signals. Curr. Opin. Cell Biol. 2, 604–608 (1990).
- 112. Zhang, X. & Shan, S. Fidelity of cotranslational protein targeting by the signal recognition particle. *Annu. Rev. Biophys.* **43**, 381–408 (2014).
- 113. Bornemann, T., Jockel, J., Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. Signal sequence-independent membrane targeting of ribosomes containing short nascent peptides within the exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 494–499 (2008).
- 114. Flanagan, J. J. *et al.* Signal recognition particle binds to ribosome-bound signal sequences with fluorescence-detected subnanomolar affinity that does not diminish as the nascent chain lengthens. *J. Biol. Chem.* **278**, 18628–18637 (2003).
- 115. Holtkamp, W. *et al.* Dynamic switch of the signal recognition particle from scanning to targeting. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1332–1337 (2012).
- 116. Siegel, V. & Walter, P. The affinity of signal recognition particle for presecretory proteins is dependent on nascent chain length. *EMBO J.* **7**, 1769–1775 (1988).

- 117. Elvekrog, M. M. & Walter, P. Dynamics of co-translational protein targeting. *Energy Mech. Biol.* 29, 79–86 (2015).
- 118. Kuhn, P. *et al.* Ribosome binding induces repositioning of the signal recognition particle receptor on the translocon. *J. Cell Biol.* **211**, 91–104 (2015).
- 119. Zito, C. R. & Oliver, D. Two-stage binding of SecA to the bacterial translocon regulates ribosome-translocon interaction. *J. Biol. Chem.* **278**, 40640–40646 (2003).
- 120. Chun, S. Y. & Randall, L. L. In vivo studies of the role of SecA during protein export in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **176**, 4197–4203 (1994).
- 121. Eisner, G., Koch, H.-G., Beck, K., Brunner, J. & Muller, M. Ligand crowding at a nascent signal sequence. *J. Cell Biol.* **163**, 35–44 (2003).
- 122. Karamyshev, A. L. & Johnson, A. E. Selective SecA association with signal sequences in ribosome-bound nascent chains: a potential role for SecA in ribosome targeting to the bacterial membrane. J. Biol. Chem. 280, 37930–37940 (2005).
- 123. Huber, D. *et al.* SecA Interacts with Ribosomes in Order to Facilitate Posttranslational Translocation in Bacteria. *Mol. Cell* **41**, 343–353 (2011).
- 124. Singh, R. *et al.* Cryo-electron Microscopic Structure of SecA Protein Bound to the 70S Ribosome.*J. Biol. Chem.* **289**, 7190–7199 (2014).
- 125. Fedyukina, D. V. & Cavagnero, S. Protein folding at the exit tunnel. *Annu. Rev. Biophys.* 40, 337–359 (2011).
- 126. Gloge, F., Becker, A. H., Kramer, G. & Bukau, B. Co-translational mechanisms of protein maturation. *Fold. Bind. Nucleic Acids Their Protein Complexes* **24**, 24–33 (2014).
- 127. Selmer, M. & Liljas, A. Exit Biology: Battle for the Nascent Chain. Structure 16, 498–500 (2008).
- 128. Kramer, G. *et al.* L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature*419, 171–174 (2002).

- 129. Solbiati, J., Chapman-Smith, A., Miller, J. L., Miller, C. G. & Cronan, J. E. Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal. *J. Mol. Biol.* **290**, 607–614 (1999).
- Ragusa, S., Mouchet, P., Lazennec, C., Dive, V. & Meinnel, T. Substrate recognition and selectivity of peptide deformylase. similarities and differences with metzincins and thermolysin
 J. Mol. Biol. 289, 1445–1457 (1999).
- 131. Frottin, F. *et al.* The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol. Cell. Proteomics MCP*5, 2336–2349 (2006).
- 132. Bornemann, T., Holtkamp, W. & Wintermeyer, W. Interplay between trigger factor and other protein biogenesis factors on the ribosome. *Nat. Commun.* **5**, 4180 (2014).
- 133. Lin, K.-F. *et al.* Cotranslational Protein Folding within the Ribosome Tunnel Influences Trigger-Factor Recruitment. *Biophys. J.* **102**, 2818–2827 (2012).
- Buskiewicz, I. *et al.* Trigger factor binds to ribosome-signal-recognition particle (SRP) complexes and is excluded by binding of the SRP receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7902–7906 (2004).
- 135. Raine, A., Ivanova, N., Wikberg, J. E. S. & Ehrenberg, M. Simultaneous binding of trigger factor and signal recognition particle to the E. coli ribosome. *Biochimie* **86**, 495–500 (2004).
- 136. Eisner, G., Moser, M., Schäfer, U., Beck, K. & Müller, M. Alternate recruitment of signal recognition particle and trigger factor to the signal sequence of a growing nascent polypeptide.
 J. Biol. Chem. 281, 7172–7179 (2006).
- 137. Ullers, R. S. *et al.* Sequence-specific interactions of nascent Escherichia coli polypeptides with trigger factor and signal recognition particle. *J. Biol. Chem.* **281**, 13999–14005 (2006).
- 138. Schibich, D. *et al.* Global profiling of SRP interaction with nascent polypeptides. *Nature* 536, 219–223 (2016).
- 139. Chartron, J. W., Hunt, K. C. L. & Frydman, J. Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. *Nature* **536**, 224–228 (2016).

- Bienvenut, W. V., Giglione, C. & Meinnel, T. Proteome-wide analysis of the amino terminal status of Escherichia coli proteins at the steady-state and upon deformylation inhibition.
 Proteomics 15, 2503–2518 (2015).
- 141. Barends, S., Bink, H. H. J., van den Worm, S. H. E., Pleij, C. W. A. & Kraal, B. Entrapping ribosomes for viral translation: tRNA mimicry as a molecular Trojan horse. *Cell* 112, 123–129 (2003).
- 142. Giglione, C., Boularot, A. & Meinnel, T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci*61, 1455–1474 (2004).
- 143. Németh, A. L. *et al.* Unconventional translation initiation of human trypsinogen 4 at a CUG codon with an N-terminal leucine. A possible means to regulate gene expression. *FEBS J.* 274, 1610–1620 (2007).
- 144. Sasaki, J. & Nakashima, N. Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 1512–1515 (2000).
- 145. Meinnel, T. & Giglione, C. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications.*Proteomics* 8, 626–649 (2008).
- 146. Randhawa, H. *et al.* Overexpression of peptide deformylase in breast, colon, and lung cancers. *BMC Cancer* **13**, 321 (2013).
- 147. Ross, S., Giglione, C., Pierre, M., Espagne, C. & Meinnel, T. Functional and developmental impact of cytosolic protein N-terminal methionine excision in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137, 623–637 (2005).
- 148. Selvakumar, P. *et al.* Expression of methionine aminopeptidase 2, N-myristoyltransferase, and N-myristoyltransferase inhibitor protein 71 in HT29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1012–1017 (2004).
- 149. Pasamontes, A. & Garcia-Vallve, S. Use of a multi-way method to analyze the amino acid composition of a conserved group of orthologous proteins in prokaryotes. *BMC Bioinformatics* 7, 257 (2006).

- 150. Rajagopalan, P. T., Datta, A. & Pei, D. Purification, characterization, and inhibition of peptide deformylase from Escherichia coli. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 13910–13918 (1997).
- 151. Luo, S. & Levine, R. L. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 464–472 (2009).
- Moskovitz, J., Berlett, B. S., Poston, J. M. & Stadtman, E. R. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9585– 9589 (1997).
- 153. Kim, G., Weiss, S. J. & Levine, R. L. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 901–905 (2014).
- 154. Gibbs, D. J., Bacardit, J., Bachmair, A. & Holdsworth, M. J. The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends Cell Biol.* **24**, 603–611 (2014).
- 155. Giglione, C., Vallon, O. & Meinnel, T. Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J.* **22**, 13–23 (2003).
- 156. Varshavsky, A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **20**, 1298–1345 (2011).
- 157. Mogk, A., Schmidt, R. & Bukau, B. The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol.* **17**, 165–172 (2007).
- 158. Escobar-Alvarez, S. *et al.* Structure and activity of human mitochondrial peptide deformylase, a novel cancer target. *J. Mol. Biol.* **387,** 1211–1228 (2009).
- 159. Giglione, C. & Meinnel, T. Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends Plant Sci.* **6**, 566–572 (2001).
- 160. Arya, T., Kishor, C., Saddanapu, V., Reddi, R. & Addlagatta, A. Discovery of a new genetic variant of methionine aminopeptidase from Streptococci with possible post-translational modifications: biochemical and structural characterization. *PloS One* **8**, e75207 (2013).

- 161. Yang, G. *et al.* Steady-state kinetic characterization of substrates and metal-ion specificities of the full-length and N-terminally truncated recombinant human methionine aminopeptidases (type 2). *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 10645–10654 (2001).
- 162. Datta, B., Datta, R., Ghosh, A. & Majumdar, A. The binding between p67 and eukaryotic initiation factor 2 plays important roles in the protection of eIF2alpha from phosphorylation by kinases. *Arch. Biochem. Biophys.* **452**, 138–148 (2006).
- 163. Datta, R. *et al.* Protection of translation initiation factor eIF2 phosphorylation correlates with eIF2-associated glycoprotein p67 levels and requires the lysine-rich domain I of p67. *Biochimie* 83, 919–931 (2001).
- 164. Boissel, J. P., Kasper, T. J. & Bunn, H. F. Cotranslational amino-terminal processing of cytosolic proteins. Cell-free expression of site-directed mutants of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*263, 8443–8449 (1988).
- Huang, S. *et al.* Specificity of cotranslational amino-terminal processing of proteins in yeast.
 Biochemistry (Mosc.) 26, 8242–8246 (1987).
- 166. Moerschell, R. P., Hosokawa, Y., Tsunasawa, S. & Sherman, F. The specificities of yeast methionine aminopeptidase and acetylation of amino-terminal methionine in vivo. Processing of altered iso-1-cytochromes c created by oligonucleotide transformation. *J. Biol. Chem.* 265, 19638–19643 (1990).
- 167. Chang, Y. H., Teichert, U. & Smith, J. A. Molecular cloning, sequencing, deletion, and overexpression of a methionine aminopeptidase gene from Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* 267, 8007–8011 (1992).
- 168. Dummitt, B., Micka, W. S. & Chang, Y.-H. N-terminal methionine removal and methionine metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell. Biochem.* **89**, 964–974 (2003).
- 169. Griffith, E. C. *et al.* Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. *Chem. Biol.* **4**, 461–471 (1997).

- 170. Griffith, E. C. *et al.* Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagillin and ovalicin by methionine aminopeptidase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15183–15188 (1998).
- 171. Sin, N. *et al.* The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6099–6103 (1997).
- 172. Ingber, D. *et al.* Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* **348**, 555–557 (1990).
- 173. Selvakumar, P., Lakshmikuttyamma, A., Dimmock, J. R. & Sharma, R. K. Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1765**, 148–154 (2006).
- 174. Shimizu, H., Yamagishi, S., Chiba, H. & Ghazizadeh, M. Methionine Aminopeptidase 2 as a Potential Therapeutic Target for Human Non-Small-Cell Lung Cancers. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 25, 117–128 (2016).
- 175. Joharapurkar, A. A., Dhanesha, N. A. & Jain, M. R. Inhibition of the methionine aminopeptidase
 2 enzyme for the treatment of obesity. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 7, 73–84
 (2014).
- 176. Dirk, L. M., Williams, M. A. & Houtz, R. L. Eukaryotic peptide deformylases. Nuclear-encoded and chloroplast-targeted enzymes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**, 97–107 (2001).
- 177. Giglione, C., Serero, A., Pierre, M., Boisson, B. & Meinnel, T. Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J.* **19**, 5916–5929 (2000).
- Serero, A., Giglione, C., Sardini, A., Martinez-Sanz, J. & Meinnel, T. An Unusual Peptide
 Deformylase Features in the Human Mitochondrial N-terminal Methionine Excision Pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 52953–52963 (2003).
- 179. Mazel, D., Coïc, E., Blanchard, S., Saurin, W. & Marlière, P. A survey of polypeptide deformylase function throughout the eubacterial lineage. *J. Mol. Biol.* **266**, 939–949 (1997).

- 180. Meinnel, T., Lazennec, C., Villoing, S. & Blanquet, S. Structure-function relationships within the peptide deformylase family. Evidence for a conserved architecture of the active site involving three conserved motifs and a metal ion1. *J. Mol. Biol.* **267**, 749–761 (1997).
- 181. Guilloteau, J.-P. *et al.* The Crystal Structures of Four Peptide Deformylases Bound to the Antibiotic Actinonin Reveal Two Distinct Types: A Platform for the Structure-based Design of Antibacterial Agents. *J. Mol. Biol.* **320**, 951–962 (2002).
- 182. Smith, K. J. *et al.* Structural variation and inhibitor binding in polypeptide deformylase from four different bacterial species. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **12**, 349–360 (2003).
- 183. Margolis, P. *et al.* Resistance of Streptococcus pneumoniae to deformylase inhibitors is due to mutations in defB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2432–2435 (2001).
- 184. Margolis, P. S. *et al.* Peptide deformylase in Staphylococcus aureus: resistance to inhibition is mediated by mutations in the formyltransferase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1825–1831 (2000).
- 185. Serero, A., Giglione, C. & Meinnel, T. Distinctive features of the two classes of eukaryotic peptide deformylases. *J. Mol. Biol.* **314**, 695–708 (2001).
- 186. Adams, J. M. On the release of the formyl group from nascent protein. *J Mol Biol* 33, 571–574 (1968).
- 187. Fry, K. T. & Lamborg, M. R. Amidohydrolase activity of Escherichia coli extracts with formylated amino acids and dipeptides as substrates. *J Mol Biol* **28**, 423–433 (1967).
- Martinez, A. Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes.
 Proteomics 8, 2809–2831 (2008).
- 189. Fieulaine, S. *et al.* The Crystal Structure of Mitochondrial (Type 1A) Peptide Deformylase
 Provides Clear Guidelines for the Design of Inhibitors Specific for the Bacterial Forms. *J. Biol. Chem.* 280, 42315–42324 (2005).
- Becker, A. *et al.* Iron center, substrate recognition and mechanism of peptide deformylase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 5, 1053–1058 (1998).

- 191. Chan, M. K. *et al.* Crystal structure of the Escherichia coli peptide deformylase. *Biochemistry* (*Mosc.*) **36**, 13904–13909 (1997).
- 192. Groche, D. *et al.* Isolation and crystallization of functionally competent Escherichia coli peptide deformylase forms containing either iron or nickel in the active site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 342–346 (1998).
- 193. Rajagopalan, P. T. R. & Pei, D. Oxygen-mediated Inactivation of Peptide Deformylase. *J. Biol. Chem.* **273**, 22305–22310 (1998).
- 194. Ragusa, S., Blanquet, S. & Meinnel, T. Control of peptide deformylase activity by metal cations
 1. J. Mol. Biol. 280, 515–523 (1998).
- 195. Rajagopalan, P. T., Grimme, S. & Pei, D. Characterization of cobalt(II)-substituted peptide deformylase: function of the metal ion and the catalytic residue Glu-133. *Biochemistry (Mosc.)*39, 779–790 (2000).
- 196. Hao, B. *et al.* Structural basis for the design of antibiotics targeting peptide deformylase.
 Biochemistry (Mosc.) 38, 4712–4719 (1999).
- 197. Giglione, C., Pierre, M. & Meinnel, T. Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol. Microbiol.* **36**, 1197–1205 (2000).
- 198. Pei, D. Peptide deformylase: a target for novel antibiotics? *Expert Opin. Ther. Targets* 5, 23–40 (2001).
- 199. Yuan, Z., Trias, J. & White, R. J. Deformylase as a novel antibacterial target. *Drug Discov. Today*6, 954–961 (2001).
- 200. Chen, D. Z. *et al.* Actinonin, a naturally occurring antibacterial agent, is a potent deformylase inhibitor. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 1256–1262 (2000).
- 201. Van Aller, G. S. *et al.* Mechanism of time-dependent inhibition of polypeptide deformylase by actinonin. *Biochemistry (Mosc.)* **44,** 253–260 (2005).

- 202. Grujić, M. & Renko, M. Aminopeptidase inhibitors bestatin and actinonin inhibit cell proliferation of myeloma cells predominantly by intracellular interactions. *Cancer Lett.* 182, 113–119 (2002).
- 203. Lee, M. D. *et al.* A new human peptide deformylase inhibitable by actinonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 309–315 (2003).
- 204. Lee, M. D. *et al.* Human mitochondrial peptide deformylase, a new anticancer target of actinonin-based antibiotics. *J. Clin. Invest.* **114**, 1107–1116 (2004).
- 205. Xu, Y., Lai, L. T., Gabrilove, J. L. & Scheinberg, D. A. Antitumor activity of actinonin in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **4**, 171–176 (1998).
- 206. Apfel, C. *et al.* Hydroxamic acid derivatives as potent peptide deformylase inhibitors and antibacterial agents. *J. Med. Chem.* **43**, 2324–2331 (2000).
- 207. Goemaere, E. *et al.* New peptide deformylase inhibitors and cooperative interaction: a combination to improve antibacterial activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1392–1400 (2012).
- 208. Mamelli, L. *et al.* New antibiotic molecules: bypassing the membrane barrier of gram negative bacteria increases the activity of peptide deformylase inhibitors. *PloS One* **4**, e6443 (2009).
- Duroc, Y., Giglione, C. & Meinnel, T. Mutations in three distinct loci cause resistance to peptide deformylase inhibitors in Bacillus subtilis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1673–1678 (2009).
- 210. Nilsson, A. I. *et al.* Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6976–6981 (2006).
- 211. Zorzet, A., Pavlov, M. Y., Nilsson, A. I., Ehrenberg, M. & Andersson, D. I. Error-prone initiation factor 2 mutations reduce the fitness cost of antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* 75, 1299–1313 (2010).
- 212. Escobar-Alvarez, S. *et al.* Inhibition of human peptide deformylase disrupts mitochondrial function. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5099–5109 (2010).

- 213. Nguyen, K. T. *et al.* Characterization of a human peptide deformylase: implications for antibacterial drug design. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 9952–9958 (2003).
- 214. Antczak, C. *et al.* High-throughput identification of inhibitors of human mitochondrial peptide deformylase. *J. Biomol. Screen.* **12**, 521–535 (2007).
- 215. Umezawa, H. *et al.* Production of actinonin, an inhibitor of aminopeptidase M, by actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)* **38**, 1629–1630 (1985).
- Supuran, C. T., Carta, F. & Scozzafava, A. Metalloenzyme inhibitors for the treatment of Gramnegative bacterial infections: a patent review (2009-2012). *Expert Opin. Ther. Pat.* 23, 777–788 (2013).
- 217. Xu, Z.-Q., Flavin, M. T. & Flavin, J. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin. Investig. Drugs* **23**, 163–182 (2014).
- Seguritan, V., Feng, I.-W., Rohwer, F., Swift, M. & Segall, A. M. Genome sequences of two closely related Vibrio parahaemolyticus phages, VP16T and VP16C. *J. Bacteriol.* 185, 6434–6447 (2003).
- 219. Sharon, I. *et al.* Comparative metagenomics of microbial traits within oceanic viral communities. *ISME J.* **5**, 1178–1190 (2011).
- 220. Sharon, I. *et al.* Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. *Nature* 461, 258–262 (2009).
- 221. Meinnel, T., Blanquet, S. & Dardel, F. A new subclass of the zinc metalloproteases superfamily revealed by the solution structure of peptide deformylase. *J. Mol. Biol.* **262**, 375–386 (1996).
- 222. Becker, A., Schlichting, I., Kabsch, W., Schultz, S. & Wagner, A. F. V. Structure of Peptide
 Deformylase and Identification of the Substrate Binding Site. *J. Biol. Chem.* 273, 11413–11416
 (1998).
- 223. Meinnel, T. Peptide Deformylase of Eukaryotic Protists: A Target for New Antiparasitic Agents? *Parasitol. Today* **16**, 165–168 (2000).

- 224. Bouzaidi-Tiali, N. *et al.* Type 3 peptide deformylases are required for oxidative phosphorylation in Trypanosoma brucei. *Mol. Microbiol.* **65**, 1218–1228 (2007).
- 225. Frank, J. A. *et al.* Structure and function of a cyanophage-encoded peptide deformylase. *ISME J.*7, 1150–1160 (2013).
- 226. Meinnel, T. & Blanquet, S. Characterization of the Thermus thermophilus locus encoding peptide deformylase and methionyl-tRNA(fMet) formyltransferase. J. Bacteriol. **176**, 7387–7390 (1994).
- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P. & Kushner, S. R. New method for generating deletions and gene replacements in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 171, 4617–4622 (1989).
- 228. Kreusch, A. *et al.* Structure analysis of peptide deformylases from Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Thermotoga maritima and Pseudomonas aeruginosa: snapshots of the oxygen sensitivity of peptide deformylase. *J. Mol. Biol.* **330**, 309–321 (2003).
- 229. Meinnel, T. & Blanquet, S. Enzymatic properties of Escherichia coli peptide deformylase. *J. Bacteriol.* **177**, 1883–1887 (1995).
- 230. Ragusa, S., Blanquet, S. & Meinnel, T. Control of peptide deformylase activity by metal cations
 1. J. Mol. Biol. 280, 515–523 (1998).
- 231. Lazennec, C. & Meinnel, T. Formate dehydrogenase-coupled spectrophotometric assay of peptide deformylase. *Anal. Biochem.* **244**, 180–182 (1997).
- 232. Bracchi-Ricard, V. *et al.* Characterization of an eukaryotic peptide deformylase from Plasmodium falciparum. *Arch. Biochem. Biophys.* **396,** 162–170 (2001).
- 233. Wei, Y. & Pei, D. Continuous spectrophotometric assay of peptide deformylase. *Anal. Biochem.*250, 29–34 (1997).
- 234. Fieulaine, S., Desmadril, M., Meinnel, T. & Giglione, C. Understanding the highly efficient catalysis of prokaryotic peptide deformylases by shedding light on the determinants specifying

the low activity of the human counterpart. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **70**, 242–252 (2014).

- 235. Fieulaine, S. *et al.* Trapping conformational states along ligand-binding dynamics of peptide deformylase: the impact of induced fit on enzyme catalysis. *PLoS Biol.* **9**, e1001066 (2011).
- 236. The physical and chemical properties of ribosomes, Mary L.Peterman, 1964.
- 237. Stojko, J. *et al.* Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *The Analyst* 140, 7234–7245 (2015).
- 238. Boularot, A. *et al.* Discovery and refinement of a new structural class of potent peptide deformylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **50**, 10–20 (2007).
- 239. Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G. & Yusupov, M. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1072–1078 (2010).
- 240. Nakatogawa, H. & Ito, K. Intraribosomal Regulation of Expression and Fate of Proteins. *ChemBioChem* **5**, 48–51 (2004).
- 241. Nakatogawa, H. & Ito, K. The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* **108**, 629–636 (2002).
- 242. Muto, H., Nakatogawa, H. & Ito, K. Genetically encoded but nonpolypeptide prolyl-tRNA functions in the A site for SecM-mediated ribosomal stall. *Mol Cell* **22**, 545–552 (2006).
- 243. Gumbart, J., Schreiner, E., Wilson, D. N., Beckmann, R. & Schulten, K. Mechanisms of SecM-Mediated Stalling in the Ribosome. *Biophys. J.* **103**, 331–341 (2012).
- 244. Peil, L. *et al.* Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15265–15270 (2013).
- 245. Woldringh, C. L. & van Iterson, W. Effects of treatment with sodium dodecyl sulfate on the ultrastructure of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **111**, 801–813 (1972).

- 246. Castanié-Cornet, M.-P., Bruel, N. & Genevaux, P. Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.*1843, 1442–1456 (2014).
- 247. Vorderwülbecke, S. *et al.* Low temperature or GroEL/ES overproduction permits growth of Escherichia coli cells lacking trigger factor and DnaK. *FEBS Lett.* **559**, 181–187 (2004).
- Ullers, R. S., Ang, D., Schwager, F., Georgopoulos, C. & Genevaux, P. Trigger Factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3101–3106 (2007).
- 249. Sala, A., Bordes, P. & Genevaux, P. Multitasking SecB chaperones in bacteria. *Front. Microbiol.*5, (2014).
- Pechmann, S., Willmund, F. & Frydman, J. The Ribosome as a Hub for Protein Quality Control.
 Mol. Cell 49, 411–421 (2013).
- 251. Lee, H. C. & Bernstein, H. D. Trigger factor retards protein export in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **277**, 43527–43535 (2002).
- 252. Sakr, S. *et al.* Lon Protease Quality Control of Presecretory Proteins in Escherichia coli and Its Dependence on the SecB and DnaJ (Hsp40) Chaperones. *J. Biol. Chem.* 285, 23506–23514 (2010).
- 253. Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403–405 (1998).
- 254. Crummett, L. T., Puxty, R. J., Weihe, C., Marston, M. F. & Martiny, J. B. H. The genomic content and context of auxiliary metabolic genes in marine cyanomyoviruses. *Virology* 499, 219–229 (2016).
- 255. Lindell, D., Jaffe, J. D., Johnson, Z. I., Church, G. M. & Chisholm, S. W. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* **438**, 86–89 (2005).
- 256. Clokie, M. R. J. & Mann, N. H. Marine cyanophages and light. *Environ. Microbiol.* 8, 2074–2082 (2006).

- 257. Thompson, L. R. *et al.* Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, E757-764 (2011).
- 258. Enav, H., Mandel-Gutfreund, Y. & Béjà, O. Comparative metagenomic analyses reveal viralinduced shifts of host metabolism towards nucleotide biosynthesis. *Microbiome* **2**, 9 (2014).
- 259. Kelly, L., Ding, H., Huang, K. H., Osburne, M. S. & Chisholm, S. W. Genetic diversity in cultured and wild marine cyanomyoviruses reveals phosphorus stress as a strong selective agent. *ISME J.*7, 1827–1841 (2013).
- Ullers, R. S. *et al.* SecB is a bona fide generalized chaperone in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 7583–7588 (2004).
- 261. Nichols, R. J. et al. Phenotypic landscape of a bacterial cell. Cell 144, 143–156 (2011).
- 262. Young, R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56, 430–481 (1992).
- Wang, I. N., Smith, D. L. & Young, R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections.
 Annu. Rev. Microbiol. 54, 799–825 (2000).
- 264. Wang, W., Li, M., Lin, H., Wang, J. & Mao, X. The Vibrio parahaemolyticus-infecting bacteriophage qdvp001: genome sequence and endolysin with a modular structure. *Arch. Virol.* 161, 2645–2652 (2016).
- 265. Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G. & Kutter, E. M. Phage treatment of human infections.
 Bacteriophage 1, 66–85 (2011).
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
- 267. Hirel, P. H. *et al.* Genetic engineering of methionyl-tRNA synthetase: in vitro regeneration of an active synthetase by proteolytic cleavage of a methionyl-tRNA synthetase--beta-galactosidase chimeric protein. *Biochimie* **70**, 773–782 (1988).
- 268. Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. & Bukau, B. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the Escherichia coli cytosol. *Mol. Microbiol.* **40**, 397–413 (2001).

- 269. Kurylo, C. M. *et al.* Genome Sequence and Analysis of Escherichia coli MRE600, a Colicinogenic, Nonmotile Strain that Lacks RNase I and the Type I Methyltransferase, EcoKI. *Genome Biol. Evol.*8, 742–752 (2016).
- 270. Chinali, G. & Parmeggiani, A. Properties of the elongation factors from Escherichia coli.
 Exchange of elongation factor G during elongation of polypeptide chain. *Eur. J. Biochem. FEBS*32, 463–472 (1973).
- Crechet, J. B., Canceill, D., Bocchini, V. & Parmeggiani, A. Characterization of the elongation factors from calf brain. 1. Purification, molecular and immunological properties. *Eur. J. Biochem. FEBS* 161, 635–645 (1986).
- 272. Fasano, O., Bruns, W., Crechet, J. B., Sander, G. & Parmeggiani, A. Modification of elongationfactor-Tu . guanine-nucleotide interaction by kirromycin. A comparison with the effect of aminoacyl-tRNA and elongation factor Ts. *Eur. J. Biochem. FEBS* **89**, 557–565 (1978).
- 273. Swart, G. W., Parmeggiani, A., Kraal, B. & Bosch, L. Effects of the mutation glycine-222---- aspartic acid on the functions of elongation factor Tu. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 2047–2054 (1987).
- 274. Wolf, H., Chinali, G. & Parmeggiani, A. Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 4910–4914 (1974).
- 275. Shimizu, Y. *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* **19**, 751–755 (2001).
- 276. Hayes, C. S. & Sauer, R. T. Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol. Cell* **12**, 903–911 (2003).
- 277. Hayes, C. S., Bose, B. & Sauer, R. T. Proline residues at the C terminus of nascent chains induce SsrA tagging during translation termination. *J. Biol. Chem.* **277**, 33825–33832 (2002).
- 278. Choy, H. E. Regulated transcription in a complete ribosome-free in vitro system of Escherichia coli. *Methods Enzymol.* **274**, 3–8 (1996).

- 279. Fritz, B. R. & Jewett, M. C. The impact of transcriptional tuning on in vitro integrated rRNA transcription and ribosome construction. *Nucleic Acids Res.* **42**, 6774–6785 (2014).
- 280. Jewett, M. C., Fritz, B. R., Timmerman, L. E. & Church, G. M. In vitro integration of ribosomal RNA synthesis, ribosome assembly, and translation. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 678 (2013).

Titre : Caractérisation structurale et fonctionnelle de la peptide deformylase du phage Vp16T

Mots clés : modification co-traductionnelle, ribosome, déformylation, NME, enzymes, phages

Résumé : Les protéines en cours de synthèse subissent des modifications très précoces de leur extrémité N-terminale, dès lors que celle-ci émerge du tunnel de sortie du ribosome. La première modification est l'excision de la méthionine initiatrice, assurée par une méthionine aminopeptidase (MetAP), précédée de sa déformylation par une enzyme peptide déformylase (PDF) chez les bactéries et dans les mitochondries et chloroplastes. Ce processus est ubiquitaire et essentiel, et a été décrit dans tout le règne du vivant. Chez les bactéries, les PDFs de type 1B se fixeraient au ribosome à proximité de l'extrémité du tunnel de sortie du peptide naissant, via son hélice α C-terminale. Or des analyses métagénomiques récentes ont révélé la présence insoupconnée de gènes codant des PDFs putatives chez des virus marins. De manière inattendue, toutes les PDF virales présentent des séquences C-terminales très courtes et dépourvues de l'hélice α 3. L'identification de ces PDFs atypiques soulève alors de nouvelles questions quant à leur possible interaction au ribosome et à leur fonction biologique. L'objectif de ma thèse a donc été de réaliser la caractérisation complète et intégrée de la peptide déformylase du bactériophage Vp16T, dont la séquence est l'une des plus courtes connues à ce jour. J'ai montré que le phage Vp16T code une protéine active, in vivo et in vitro, et qu'elle peut se lier au ribosome malgré l'absence d'hélice α Cterminale. La caractérisation structure-fonction de Vp16PDF a révélé des caractéristiques uniques qui pourraient alors expliquer sa fonction au cours de la réplication du phage. Ainsi j'ai montré que l'expression de Vp16PDF chez E. coli modifie la structure de l'enveloppe, induit l'accumulation d'agrégats et finalement inhibe la croissance bactérienne. De plus, l'étude de souches bactériennes mutantes a montré que Vp16PDF interfère spécifiquement avec le repliement et l'adressage de protéines membranaires. Cette dernière fonction pourrait permettre de déstabiliser la membrane de l'hôte et ainsi favoriser la libération des particules virales.

Title : Structural and functional characterization of peptide deformylase from Vp16T phage

Keywords : co-translational modification, ribosome, déformylation, NME, enzymes, phages

Abstract : Being synthesized proteins undergo very early changes in their N-terminal end, since it emerges from the outlet channel of the ribosome. The first modification is the excision of the initiator methionine, provided by a methionine aminopeptidase (MetAP), preceded by its deformylating enzyme peptide deformylase (PDF) in bacteria and in mitochondria and chloroplasts. This process is ubiquitous and essential, and has been described in the kingdom of life. In bacteria, Type 1B PDFs would bind to the ribosome near the end of the outlet tunnel of the nascent peptide via its C-terminal helix α . But recent metagenomic analyzes revealed the unexpected presence of genes encoding putative PDFs in marine viruses. Unexpectedly, all viral PDF have very short C-terminal sequences and lacking the $\alpha 3$ helix. The identification of these atypical PDFs then raises new questions about their possible interaction with ribosome and their biological function. The aim of my thesis was therefore to achieve the complete and integrated characterization of peptide deformylase bacteriophage $V_p 16T$, the sequence is one of the shortest known to date. I showed that the phage Vp16T code an active protein in vivo and in vitro, and can bind to the ribosome despite the absence of the C-terminal helix α . The structure-function characterization V_p 16PDF revealed unique features that could then explain its function in the replication of the phage. Thus I have shown that expression in E. coli Vp16PDF modifies the envelope structure, induces accumulation of aggregates and ultimately inhibits bacterial growth. In addition, the study of mutant bacterial strains showed that Vp16PDF specifically interfere with the folding and addressing of membrane proteins. This latter function could help destabilize the membrane of the host and thereby promote release of viral particles.